

INDICE

INDICE	i
1.1 Introduzione.....	1
1.2 Risposta immunitaria.....	2
1.3 Immunoglobuline	9
1.4 Cenni storici, generazione dei frammenti “scFv” single chain fragment variable.	14
1.4 Librerie anticorpali	18
1.5 Anticorpi ricombinanti.....	21
CAPITOLO SECONDO	26
2.1 Introduzione.....	26
2.2 Il Phage display	28
2.3 Il Ribosomal display	31
2.4 Bacterial yeast display.....	33
2.5 Doppio Ibrido	35
CAPITOLO TERZO	39
3.1 Introduzione.....	39
3.2 Fago Filamentoso	40
3.3 La replicazione del fago filamentoso	41
3.5 Il fago lambda.....	45
3.6 La replicazione del fago lambda	46
3.7 Applicazioni sperimentali del fago lambda	49
3.8 Il fago T4 e applicazioni sperimentali	55
3.9 Il Fago T7	59
3.10 La replicazione del fago T7	60
3.11 I vettori d’esposizione derivati da T7	60
SCOPO DEL LAVORO.....	63
MATERIALI E METODI	65
1. Apparecchiature e reagenti	65
2. Reagenti di base.....	66
3. Terreni di coltura.....	66
4. Ceppi batterici	67
5. Libreria fagica anticorpale “Human Single Fold scFv Libraries Tomlinson I+J”.	67
6. Preparazione del costrutto da amplificare: crescita e concentrazione delle librerie.....	71

7. Amplificazione Libreria scFv-VH tramite PCR.....	72
8. Elettroforesi su gel d'agarosio.....	75
9. Digestione degli amplificati scFv-VH.....	76
10. Vettore utilizzato.....	77
11. Le cellule ospite di T7:BLT5615.....	78
12. Digestione del vettore T7.....	79
13. Ligazione della libreria scFV-VH al vettore T7	80
14. Impacchettamento del DNA (packaging).....	81
15. Amplificazione della Libreria.	82
16. Selezione	83
17. Screening su piastra.	84
18. Screening delle placche fagiche tramite PCR.....	84
19. Saggio ELISA.....	86
RISULTATI.....	90
1. Amplificazione Libreria scFv-VH tramite PCR.....	90
2. Digestione della Libreria scFv-VH.....	91
3. Digestione del vettore T7.....	92
4. Ligazione della libreria scFV-VH al vettore T7	94
5. Impacchettamento del DNA.....	96
6. Amplificazione della Libreria	96
7. Complessità della libreria.	97
8. Il processo di selezione.....	98
9. Saggio ELISA.....	100
DISCUSSIONE.....	102
CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI	111
BIBLIOGRAFIA.....	112

CAPITOLO PRIMO

RISPOSTA IMMUNITARIA E GENERAZIONE DEGLI ANTICORPI RICOMBINANTI

SOMMARIO: 1.1. Introduzione. – 1.2. Risposta immunitaria. – 1.3. Immunoglobuline. – 1.4. Cenni storici, generazione dei frammenti "scFv" single chain fragment variable. – 1.5. Librerie anticorpali. – 1.6. Anticorpi ricombinanti

1.1 Introduzione

E' un assioma della genetica che la costituzione genetica creata nello zigote dalla combinazione di spermatozoo e uovo venga ereditata da tutte le cellule dell'organismo. Per spiegare i diversi fenotipici particolari cellule somatiche pensiamo a un controllo differenziale dell'espressione genetica e non a modificazioni del contenuto di DNA.

Eppure esistono situazioni eccezionali in cui la riorganizzazione di certe sequenze del DNA è usata per regolare l'espressione dei geni o per crearne nuovi. Il sistema immunitario rappresenta un caso sorprendente ed esteso di cambiamento del contenuto genomico, in cui la ricombinazione crea geni attivi nei linfociti (Lewin B; 1997).

Per iniziare illustreremo brevemente le caratteristiche generali della risposta immunitaria, la struttura e funzione delle immunoglobuline, la

generazione dei frammenti “scFv” e i sistemi d’espressione, le librerie anticorpali fino alla generazione degli anticorpi ricombinanti.

1.2 Risposta immunitaria

La **risposta immunitaria** dei vertebrati fornisce un sistema protettivo che distingue le proteine estranee dalle proteine dello stesso organismo. Il materiale estraneo (o parte di esso) viene riconosciuto come **antigene**, innescando la produzione di una risposta immunitaria che riconosce specificatamente l’antigene e lo distrugge. Le reazioni immunitarie dipendono dai globuli bianchi -linfocito B e T e i macrofagi. Nei mammiferi, le **cellule B** maturano nel midollo osseo (*bone marrow*), mentre le **cellule T** maturano nel timo mentre i linfociti prendono il nome dai tessuti che li producono e ciascuna classe di essi usa il riarrangiamento del DNA come meccanismo per produrre le proteine che le permettono di partecipare alla risposta immunitaria.

Il sistema immunitario ha molti modi di distruggere un invasore antigenico e questo può dipendere in parte dalla natura dell’antigene. Per comodità possiamo suddividerli in due gruppi principali.

La prima, **risposta umorale** dipende dalle cellule B ed è mediata dalla secrezione di **anticorpi**, che sono **immunoglobuline** proteiche. La

produzione di una immunoglobulina specifica per una molecola estranea è l'evento primario responsabile del riconoscimento di un antigene. Il riconoscimento richiede che l'anticorpo si leghi a una piccola regione o struttura dell'antigene così da formare complessi antigene-anticorpo che vengono poi rimossi dal flusso circolatorio da macrofagi o sono direttamente attaccati da proteine del complemento.

La seconda, **risposta cellulo-mediata** dipende da una classe di linfociti T chiamati **cellule T citotossiche (killer)**. Questa risposta è tipicamente scatenata da un parassita intracellulare, come un virus. Come risultato dell'infezione virale, antigeni estranei (virali) sono presentati sulla superficie cellulare, attraverso una proteina cellulare che è membro dell'*MHC (complesso maggiore di istocompatibilità)*. La proteina MHC ha una fessura sulla sua superficie, nella quale si lega un frammento peptidico derivato dall'antigene estraneo. La combinazione del frammento peptidico e della proteina MHC viene riconosciuta dal recettore delle cellule T. Ogni individuo possiede un insieme caratteristico di proteine MHC, sono di particolare importanza nelle reazioni dei trapianti; un trapianto di tessuto da un individuo ad un altro viene rigettato per la differenza tra le proteine MHC del donatore e quelle del ricevente. Il riconoscimento del bersaglio è la specifica prerogativa delle immunoglobuline delle cellule B e dei recettori delle cellule T.

Un aspetto importante della loro funzione è la capacità di distinguere fra “self” (l’organismo di cui fanno parte) e “nonself” (antigeni estranei). I bersagli estranei devono essere *completamente distrutti* a differenza delle cellule e proteine del proprio organismo che non devono *mai* essere attaccate, la proprietà di non attaccare il “self” si chiama **tolleranza**, la perdita di questa capacità porta ad una **malattia autoimmune**, in cui il sistema immunitario attacca il corpo stesso, di cui fa parte, spesso con conseguenze disastrose. La tolleranza probabilmente s’instaura in una fase precoce dello sviluppo dei linfociti, quando le cellule B e T che riconoscono antigeni “self” vengono distrutte, questo fenomeno si chiama **delezione clonale** (Lewin B; 1997) o sono persistentemente soppressi **soppressione clonale** o persistentemente inattivi **energia clonale**. Sia la capacità di rispondere a *nonself* che la tolleranza al *self* non sono codificate nei geni della linea germinale, ma vengono acquisite nel corso dello sviluppo somatico (Von Boehmer H. et al., 2003). Un **corollario** della tolleranza è che può essere difficile ottenere anticorpi contro proteine che sono strettamente correlate a quelle dell’organismo stesso. In pratica, ciò vuol dire che può essere difficile usare (per esempio) topi o conigli per ottenere anticorpi contro proteine umane altamente conservate nell’evoluzione dei mammiferi. Infatti, la tolleranza del topo o del coniglio verso le proteine potrebbero estendersi alle proteine umane (Lewin B; 1997).

Le malattie autoimmuni possono essere classificate in malattie organo-specifiche, in cui gli anticorpi e la risposta di cellule T sono dirette verso cellule di un singolo organo bersaglio, come nella tiroidite di Hashimoto, o le cellule delle isole di Langerhans nel diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) e malattie non-organo specifiche, esemplificate dal lupus eritematoso sistemico (LES) in cui le lesioni autoimmuni sono diffuse a numerosi organi. Le malattie autoimmuni sistemiche sono caratterizzate da autoanticorpi specifici per molecole nucleari e citoplasmatiche coinvolte nella replicazione e trascrizione del DNA e nella traduzione di mRNA. Alcune manifestazioni delle malattie autoimmuni sistemiche sono dovute all'effetto diretto di questi autoanticorpi, mentre altre sono dovute alla deposizione, specie nei glomeruli renali, di complessi antigene-anticorpo (Kewalramani R., Singh AK. 2002). Le malattie autoimmuni possono anche essere suddivise in base al meccanismo patogenetico effettore. Fra le malattie organo-specifiche, IDDM (Adorini L. et al., 2002) e sclerosi multipla sono dovute soprattutto all'attività di cellule T CD4+, mentre l'ipertiroidismo (malattia di Graves) e la miastenia grave sono soprattutto mediate da autoanticorpi anti-recettore, rispettivamente anti-recettore per l'ormone tireostimolante e per il recettore acetilcolinico delle giunzioni neuro-muscolari. Una simile distinzione è anche possibile nelle malattie autoimmuni sistemiche.

Ad esempio, la maggior parte delle manifestazioni dell'artrite reumatoide sono dovute a meccanismi effettori mediati da cellule T, mentre la patologia del LES o della pan arterite nodosa è dovuta a deposizione di complessi antigene-anticorpo (Martino G. et al ., 2002).

Rivolgiamo ora lo sguardo alla struttura e funzione anticorpale.

Gli anticorpi sono delle glicoproteine sieriche prodotti da cellule della serie linfoide; appartenenti alla classe delle γ -globuline e, come abbiamo detto in precedenza, sono implicati nella Risposta Immunitaria umorale. La struttura della molecola anticorpale fu identificata da G. Edelman e R.Porter ai quali, per questa scoperta fu conferito il Premio Nobel nel 1972.

Una molecola di anticorpo è costituita da un nucleo strutturale simmetrico composto da due **catene “leggere” (L)** non glicosilate identiche (ciascuna contenente circa 220 amminoacidi) e due **catene “pesanti” (H)** glicosilate, identiche anch'esse (ciascuna contenente in genere circa 440 amminoacidi).

Tutte queste catene sono tenute insieme sia da legami a idrogeno, che da ponti disolfuro (S-S) esattamente localizzati. In questo modo si può assicurare la stabilità della struttura anticorpale. Sia le catene leggere che quelle pesanti contengono una serie di unità omologhe di circa 110 amminoacidi che si ripiegano l'una indipendentemente dall'altra formando

una struttura globulare detta *dominio immunoglobulinico*. Un dominio è costituito da due strati di foglietti β planari.

La simmetria della struttura immunoglobulinica anticorpale assicura la sua stabilità ed efficienza nella risposta immunitaria umorale.

Tutte le molecole di un anticorpo presentano caratteristiche strutturali identiche, ma mostrano un' estrema variabilità nelle regioni che legano l'antigene. Sia le catene pesanti che quelle leggere, infatti, sono suddivise in una parte **“variabile” (V)** ed in una **“costante” (C)**. Rispettivamente la regione variabile è presente nell'estremità N-terminale e quella costante è localizzata nella zona C-terminale.

Solamente i domini delle regioni variabili partecipano al riconoscimento del sito di legame con l'antigene, è proprio questa variabilità che spiega la capacità delle diverse strutture anticorpali di legarsi ad un numero enorme di antigeni strutturalmente differenti (Fig1).

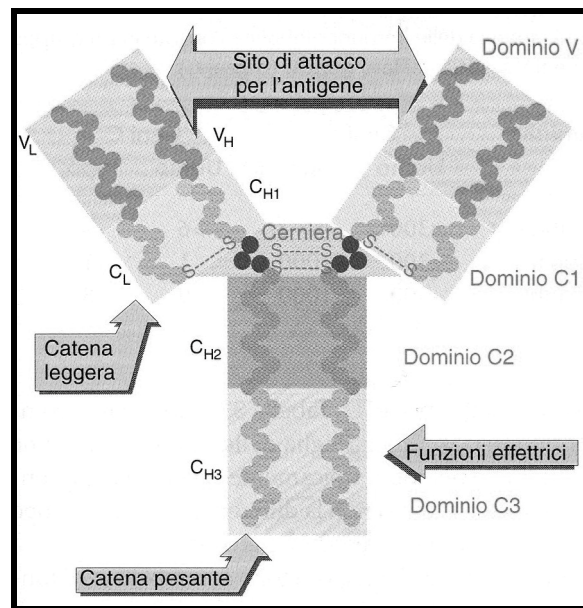


Fig 1: Struttura dell'immunoglobulina

Ogni individuo possiede da 10^7 a 10^9 specie anticorpali ognuna delle quali è in grado di interagire con una sequenza amminoacidica unica presente nell'antigene, che generalmente è composta da cinque a sette residui amminoacidici. Le regioni N-terminali delle catene L e H formano in ciascun anticorpo il sito di riconoscimento dell'antigene.

Il legame dell'antigene da parte dell'anticorpo avviene all'estremità N delle due catene H e delle due catene L dove sono presenti tre "regioni determinanti la complementarità" (CDR) collocate nelle regioni variabili V_H e V_L .

Ciascuna di queste regioni consiste in una sequenza di 10 amminoacidi. Queste sono assemblate l'una con l'altra in una struttura

tridimensionale a formare la regione di legame per il *determinante antigenico*. Le **CDR** (CDR1,CDR2,CDR3) rappresentano la parte della molecola anticorpale che presenta la massima variabilità.

L'efficienza dell'attacco dell'antigene e della formazione dei legami è molto aumentata da una *regione cerniera* flessibile presente nella maggior parte degli anticorpi, che rende variabile la distanza fra i due siti di legame per l'antigene, inoltre l'effetto protettivo degli anticorpi non è dovuto semplicemente alla loro capacità di legare l'antigene, ma una varietà di attività che viene svolta dalla coda della molecola a forma di Y. Infatti ciascun tipo di regione di coda conferisce all'anticorpo proprietà funzionali diverse, come la capacità di attivare il sistema del complemento, di legarsi a cellule fagocitiche o di attraversare la placenta da madre a feto.

1.3 Immunoglobuline

Nei mammiferi ci sono cinque classi di immunoglobuline IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, (Kuby J.1997) con la propria classe di catena pesante (rispettivamente α , δ , ϵ , γ e μ).

Ci sono numerose sottoclassi di immunoglobuline IgG e IgA; per esempio ci sono sottoclassi umane di IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) che hanno rispettivamente catene $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$. Le varie catene pesanti danno una

conformazione distintiva alle regioni cerniera e di coda degli anticorpi, così che ciascuna classe (e sottoclasse) ha proprietà caratteristiche.

La **IgM** è sempre la prima classe di anticorpi prodotta da una cellula B in sviluppo e sono anche la classe principale secreta nel sangue nelle prime fasi di una risposta anticorpale *primaria*, in seguito alla prima esposizione ad un antigene. (A differenza delle IgM, le **IgD** sono secrete soltanto in piccole quantità e sembrano funzionare principalmente da recettori di superficie per l'antigene). Nella sua forma secreta sono pentameri, composte da cinque unità a quattro catene, dando un totale di dieci siti di legame per l'antigene (Fig 2).

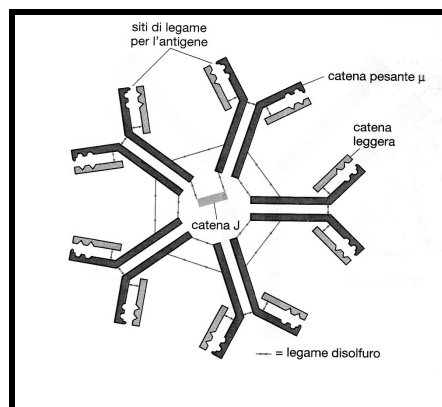


Fig 2: Molecola pentamerica di IgM

La classe principale di immunoglobuline nel sangue è la **IgG**, è un monomero a quattro catene prodotto in grandi quantità durante le risposte

immunitarie *secondarie*. Oltre ad attivare il complemento, la regione di coda di una molecola IgG si lega a recettori specifici su macrofagi e neutrofili. In gran parte per mezzo di questi **recettori per l'Fc** (così chiamati perché le code degli anticorpi sono chiamate regioni *Fc*), queste cellule fagocitiche si attaccano ai microorganismi infestanti rivestiti di anticorpi IgG prodotti in risposta all'infezione, li ingeriscono e li distruggono. Queste molecole sono i soli anticorpi che possono passare dalla madre al feto attraverso la placenta.

Le **IgA** sono la classe principale di anticorpi nelle secrezioni: saliva, lacrime, latte, secrezioni respiratorie e intestinali. Mentre nel sangue le IgA sono un monomero a quattro catene nelle secrezioni sono dimeri a otto catene.

La regione di coda delle **IgE**, che sono monomeri a quattro catene, si lega con affinità molto alta ad un'ulteriore classe di recettori per l'Fc. Questi recettori sono posti sulla superficie delle *mastcellule* nei tessuti (sulle superficie mucose e sierose, nei tessuti linfoidei e connettivali e sono associati al tessuto nervoso, ai vasi sanguigni e al tessuto neoplastico) e nei basofili del sangue. Le molecole IgE attaccate ad essi funzionano da recettori per l'antigene, il quale legame scatena la produzione (da parte di mastcellule o i basofili) di citochine e ammine biologicamente attive, specialmente istamina. Queste molecole fanno dilatare e diventare permeabili i vasi sanguigni, il che a sua volta aiuta i globuli bianchi, gli

anticorpi e i componenti del complemento a penetrare nei siti d'infezione. Le stesse molecole sono anche in gran parte responsabili dei sintomi delle reazioni *allergiche* come asma e orticaria (Albert B. et al., 2002) (Fig3).

Proprietà delle classi principali di anticorpi negli esseri umani					
Proprietà	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
catene pesanti	μ	δ	γ	α	ϵ
catene leggere	k o λ	k o λ	k o λ	k o λ	k o λ
Numero si unità A quattro catene	5	1	1	1 o 2	1
Percentuale delle Ig totali Nel sangue	10	<1	75	15	<1
Attivazione del complemento	++++	–	++	–	–
Attraversamento della placenta	–	–	+	–	–
Legame a macrofagi e neutrofili	–	–	+	–	–
Legame a mastcellule e basofili	–	–	–	–	+

Fig 3: Proprietà delle classi principali di anticorpi negli esseri umani

Il legame antigene-anticorpo ad alta affinità in genere viene descritto come un processo “chiave serratura”, questo legame è

termodinamicamente favorito, ed è accompagnato da una diminuzione di energia libera (Braden BC. Et al., 1998). In generale, il riconoscimento dell'antigene è entalpicamente favorito da forze non covalenti relativamente deboli, come legami idrogeno, forze di van der Waals, e interazioni ioniche, mentre c'è un dispendio entropico nella formazione del complesso anticorpo-antigene, il quale è in parte compensato dal processo di solvatazione. Le molecole di acqua giocano un ruolo importante nella stabilizzazione delle interazioni sia da un punto di vista fisico di riempimento delle cavità non geometricamente complementari sia nella stabilizzazione di legami idrogeno (Bath TN. Et al., 1994).

La risposta anticorpale convenzionale è detta **policlonale** per il fatto che le plasmacellule producono diversi tipi di anticorpi in risposta ai differenti determinanti antigenici che caratterizzano un singolo antigene. Gli anticorpi secreti *in vivo* in risposta alla immunizzazione con uno o più antigeni sono policlonali, per il fatto che vengono stimulate diverse cellule B che riconoscono regioni o *epitopi* differenti sull'antigene immunogeno, si ha, pertanto una risposta anticorpale eterogenea. Le applicazioni *in vivo* degli anticorpi policlonali sono state utilizzate per decine di anni per indurre un' immunizzazione passiva contro malattie infettive e altri agenti dannosi, in particolare tossine.

Ciascun linfocita B di mammifero ha il potere di produrre un singolo clone cellulare che, a sua volta, secerne un unico tipo di anticorpi che sono detti per l'appunto **monoclonali**.

Una risposta anticorpale monoclonale, al contrario di quella policlonale può essere indotta solo artificialmente in un organismo; generalmente viene effettuata con scopi sperimentali, in quanto non potrà mai accadere *in vivo* che la presenza di un antigene stimoli un singolo clone a produrre uno specifico anticorpo monoclonale diretto verso uno dei tanti determinanti antigenici caratterizzanti la molecola antigenica. Queste applicazioni sperimentali nell'utilizzo di anticorpi monoclonali furono possibili grazie alla scoperta di due ricercatori Kohler e Milsten, vedremo nel dettaglio in seguito.

1.4 Cenni storici, generazione dei frammenti “scFv”single chain fragment variable

I progressi delle biotecnologie, l'utilizzo di topi transgenici e *knockout*, la crescita sulle conoscenze impiegate per il DNA ricombinante, hanno posto le basi per la produzione di una grande quantità di molecole anticorpali identiche tra loro e specifiche per un determinante antigenico.

Furono i ricercatori Köhler e Milstein nel 1975 a scoprire questa rivoluzionaria tecnica per cui vinsero il premio Nobel.

I ricercatori furono in grado di dimostrare che la fusione di cellule linfocitarie di topo immunizzato capaci di produrre anticorpi, con cellule di mieloma murino (plasmacellula neoplastica), permetteva di formare una nuova linea cellulare definita come **ibridoma**. Questo ibridoma presentava le seguenti caratteristiche: era in grado di crescere con la stessa efficienza della linea mielomatosa e, di produrre nello stesso tempo, l'anticorpo monoclonale specifico originariamente espresso dal linfocita B; produrre enormi quantità di anticorpo specifico e puro (non inquinato da altri anticorpi); e essere conservato e riutilizzato tutte le volte che era necessario produrre un determinato anticorpo. Un anticorpo con caratteristiche simili è detto monoclonale.

Negli anni successivi, numerosi altri ricercatori hanno effettuato innovazioni per migliorare gli aspetti metodologici che hanno permesso un più preciso e veloce utilizzo di anticorpi e di immuno-reagenti tra questi l'uso di topi trasgenici (topi cioè modificati in cui sono stati inseriti i geni umani che producono le proteine anticorpali) che, esprimendo i geni per le immunoglobuline umane in luogo di quelle di specie, consentono di ottenere anticorpi monoclonali umani, anche da ibridomi murini (Bruggemann M; Taussig MJ. 1997). Questi anticorpi, detti anche anticorpi monoclonali o chimerici, uomo-topo, sono formati dalla regione

variabile d'origine murina e dalla parte costante di origine umana. La specificità antigenica, determinata dalla regione variabile, deriva dal topo, mentre il loro isotipo (classe di immunoglobulina), determinato dalla regione costante, proviene dall'uomo (Fig 4).

Oggi sono molto utilizzati in approcci sperimentali come agenti immunosoppressivi.

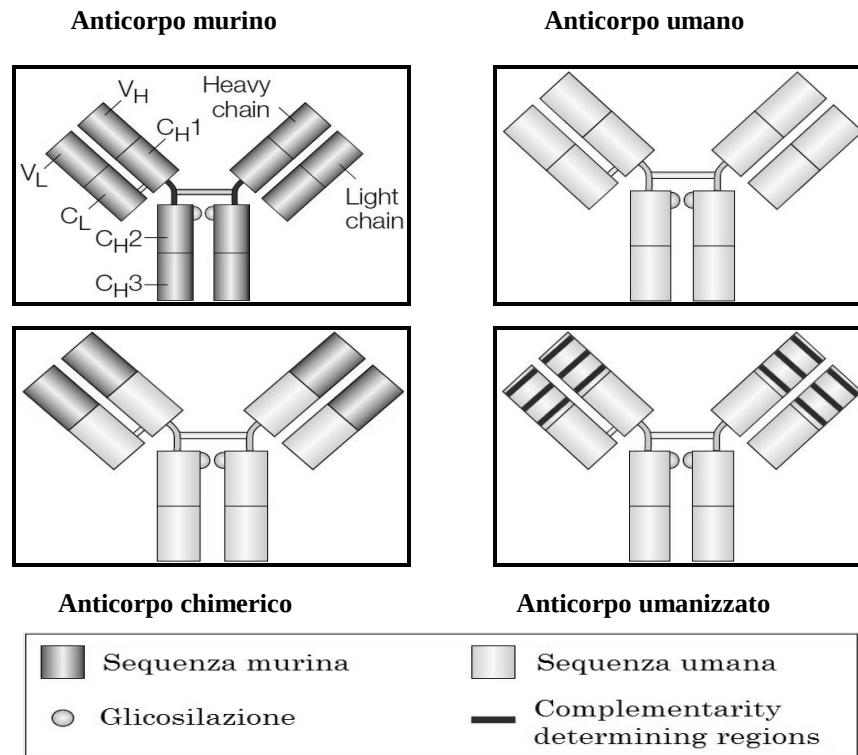


Fig 4: Tipologie di anticorpi

Parallelamente sono stati sperimentati nuovi metodi per l'immortalizzazione *in vitro* di linfociti che includono: l'uso di virus trasformanti (Steinitz M. et al., 1978), la produzione di eteromielomi (uomo per topo) (Siracusano A. et al., 1992), ed infine l'isolamento di cellule ibride mediante *sorting* di determinanti coespressi a seguito della fusione cellulare sull'eterocarionte (Padmanabhan R. et al., 1993).

Tuttavia, a dispetto di queste importanti acquisizioni metodologiche sembrava quasi impossibile ipotizzare fino a qualche anno fa che si sarebbero potute ottenere immunoglobuline specifiche mediante

il solo ricorso a tecniche di ingegneria genetica, rendendo del tutto inutile l'utilizzo di animali e cellule somatiche.

Ora, attraverso il clonaggio e l'espressione su fagi filamentosi di geni VH e VL (McCafferty J. et al., 1990) (Orlandi R. et al., 1989) è possibile ripercorrere *in vitro* tutte le fasi della amplificazione e selezione anticorpale fino all'isolamento di frammenti immunoglobulinici (***single chain fragment variable, scFv***) capaci di legarsi unicamente con l'antigene di interesse (Hudson PJ. 1998).

Mediante questa tecnologia è possibile assemblare delle collezioni di fagi modificati, chiamate **librerie**, ed identificare, mediante cicli di selezione, i ligandi che sono in grado d'interagire con la molecola utilizzata come esca (Cesareni G. et al 1999).

1.4 Librerie anticorpali

Rivolgiamo uno sguardo a come è stato possibile arrivare alla creazione di *librerie anticorpali* e il loro impiego.

I notevoli passi avanti nel campo dell'ingegneria genetica discussi nel capitolo precedente, sono stati possibili raggiungere grazie al contributo di diversi studiosi di Winter (Winter G. et al., 1991) Rader (Rader C; Barbas III CF. 1997) e Hogenboom (Hogenboom HR. 1997), i

quali dimostrarono che era possibile esprimere su fagi filamentosi frammenti immunoglobulinici derivati dal clonaggio di geni VH e VL di linfociti immuni.

Questo ha portato alla creazione di **librerie anticorpali immuni**, (Pini A. et al., 1998) da diverse razze di animali immunizzati come topo (Clackson T. et al., 1991), cammello (Arbabi Ghahroudi M. et al., 1997) pecora (Charlton K. et al., 2001) e uomo (Barbas C. et al., 1993; Cai X., Garen A. 1995).

Queste librerie sono in grado di produrre grande quantità di anticorpi ad alta affinità verso gli antigeni utilizzati per l'immunizzazione, tuttavia questo provoca una serie di limitazioni nel loro utilizzo come ad esempio, l'impossibilità di produrre anticorpi contro tossine o antigeni chimicamente instabili incompatibili con il processo di immunizzazione (Griffiths AD., Duncan AR. 1998).

Un limite nell'utilizzo di questa libreria è rappresentato dalla necessità di costruirla una specifica per ogni tipo di antigene ricercato (Vaughan TJ. et al., 1996; Sheets MD. et al., 1998).

Ulteriori studi hanno reso possibile l'espressione su fagi filamentosi di frammenti immunoglobulinici derivati dal clonaggio di geni VH e VL, provenienti, questa volta, da cellule del sistema eritro-linfopoietico, da donatori non immunizzati, che ha portato alla formazione di **librerie anticorpali naive** (Pini A. et al., 1998).

Queste sono una rappresentazione del repertorio del gene-V. L'mRNA, dell'IgM e/o IgG di cellule B, è stato isolato da linfociti, midollo osseo, tonsille e milza di cadaveri. Attraverso la PCR sono state amplificate le regioni variabili utilizzando un set di primer di oligonucleotidi degenerati, e infine i vari frammenti sono stati clonati in vettori di clonaggio adatti per lo screening, in genere per il phage display (Griffiths AD., Duncan AR. 1998).

Queste librerie vengono usate per isolare anticorpi contro diversi tipi di antigeni e sono soprattutto utili per produrre anticorpi contro antigeni tossici e non immunogenici. L'affinità di mAbs dipende soprattutto dalla grandezza della libreria; che può variare tra 10^9 e 10^{10} membri (Sheets MD et al., 1998).

Infine si è arrivati alla costruzione di **librerie anticorpali sintetiche**, caratterizzate da una variabilità anticorpale estremamente elevata, questo risultato è stato possibile raggiungerlo grazie alla grande flessibilità del sistema fagico, che ha permesso d'introdurre mediante mutagenesi su templati di DNA codificanti per VH e VL, una serie di cambiamenti nei residui amminoacidici delle regioni ipervariabili, CDR1, CDR2 e CDR3 (Pini A. et al., 1998).

Oggi molte librerie anticorpali sintetiche umane sono costruite introducendo mutazioni sulle regioni CDR3, le quali presentano maggior

variabilità e sono principalmente responsabili del legame con l'antigene (Hanes J., Oluckthun A. 1997, Hanes J. et al., 2000). E' comunque possibile migliorare l'affinità degli anticorpi ottenuti da una prima selezione, attraverso la successiva modifica casuale delle CDR1 e/o delle CDR2. Questo permette di ottenere nuovi "sotto-repertori molecolari", da cui è possibile selezionare molecole con maggiore affinità di legame che meglio si adattano all'epitopo riconosciuto (Garrard LJ., Henner DJ. 1993; Soderlind E. et al., 1995).

1.5 Anticorpi ricombinanti

Anticorpi ricombinanti possono essere clonati ed espressi come anticorpi monovalenti Fab (55kDa) frammenti di regioni variabili Fv, V_H (Vu KB. et al., 1997) e scFv (30 kDa) (Bird RE. et al., 1988).

Tutti questi possono essere espressi in diversi sistemi inclusi i batteri (Skerra A., Pluckthun A. 1998) insetti (Bei R. et al., 1995), lievito (Davis GT. et al., 1991), piante (Conrad U., Fiedler U. 1994) e cellule di mammifero (Jost CR. et al., 1994). Il metodo maggiormente utilizzato oggi per l'espressione dei frammenti scFv è quello in batteri E. coli.

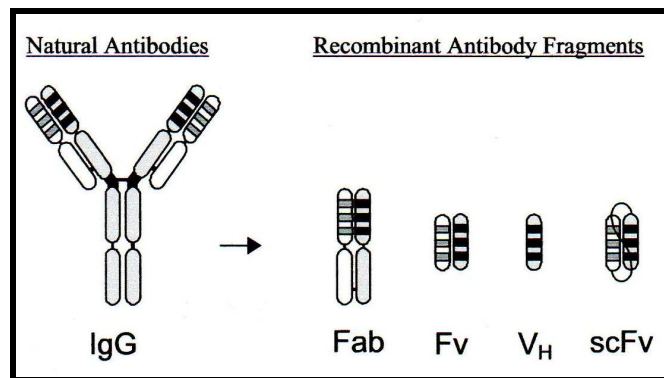


Fig 5: Struttura di un anticorpo convenzionale, molecola di IgG; differenti forme di anticorpi ricombinanti

Gli scFv espressi su fagi sono formati da una sola regione variabile formata da una catena pesante (VH) e una leggera (VL) connesse da un polipeptide flessibile (linker), sono anticorpi specifici, codificati da un singolo gene ed espressi da una singola catena polipetidica e possono essere generati da ibridomi o fagi e da una libreria fagica ribosomiale (ribosomal display libraries) (Blazer D., Celer F.).

Caratteristica importante di un “linker” risiede nella capacità di permettere alla molecola anticorpale una certa flessibilità necessaria per un efficace adattamento all’epitopo riconosciuto. Inoltre deve poter congiungere i due domini variabili senza interferire con il ripiegamento molecolare degli stessi e deve essere resistente alla degradazione proteolitica. Sulla base di queste conoscenze sono stati formati diversi “linker”, il più stabile dei quali si è dimostrato essere quello costituito da

una sequenza di quattro glicine e una serina ripetuto tre volte (Gly4Ser)₃ (Huston *et al.*, 1988).

In questo modo le specificità anticorpali risultano unite insieme per formare una molecola strutturalmente e funzionalmente immunocompetente. In genere nel costrutto viene inserito una sequenza bersaglio (*Tag*) per rendere la reazione anticorpale rilevabile con anticorpi secondari (Fig 6).

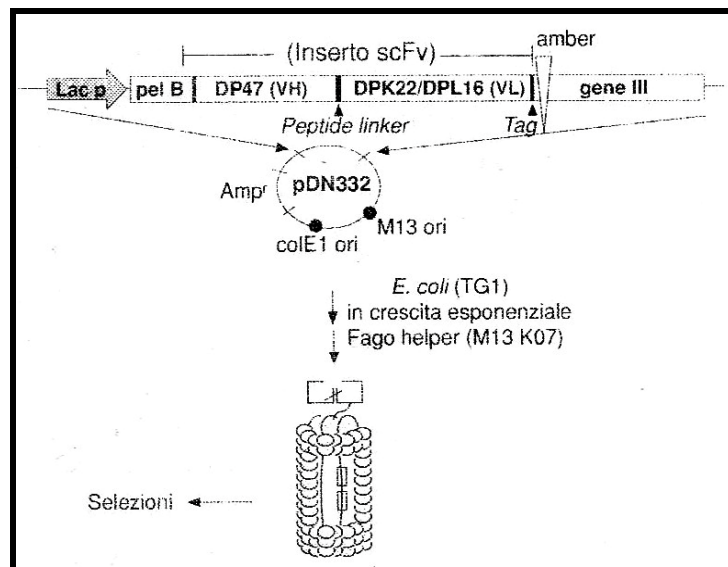


Fig 6: Struttura genetica molecolare dell'inserto plasmidico contenente VH-VL legate insieme da un peptide linker ed espresse come scFv sul batteriofago M13.

Questi frammenti immunoglobulinici ottenuti per via ricombinante, di predeterminata specificità, riducono i molti problemi di sicurezza

associati all'utilizzo clinico di anticorpi monoclonali, prodotti come abbiamo detto mediante ibridomi, infatti, la derivazione umana degli scFv riduce i rischi di reazioni immuni avverse (Tjandra JJ. et al., 1990).

Gli scFv inoltre, diversamente dalle naturali immunoglobuline secrete dalle cellule plasmatiche, le quali svolgono una funzione a livello extracellulare, possono essere prodotti a livello intracellulare in cellule eucariotiche (Munro S., Pelham HR. 1987) e sono in grado di penetrare nei tessuti in modo più rapido (Huston JS., et al 1996).

Inoltre le ridotte dimensioni delle molecole anticorpali, rappresentate anche dall'eliminazione della regione Fc la quale ha un'effettiva funzione non sempre necessaria (Jun S. et al., 1999), consente una rapida *clearance* ematica e tissutale (tempo necessario affinché un certo volume sia "ripulito" da una certa sostanza) e una scarsa captazione epatica o di altri organi (Yokopta T. et al., 1992).

Di estrema importanza sono i tempi di realizzazione estremamente brevi per il loro isolamento (si parla di due o tre settimane); hanno rese di produzione elevate con costi ridotti, dovuti all'utilizzo di batteri in luogo, di cellule somatiche per l'espressione e la secrezione di anticorpi.

Inoltre, come già ribadito prima, presentano una buona affinità di legame per l'antigene, la quale può essere considerevolmente aumentata attraverso processi di mutagenizzazione a carico del DNA codificante per gli scFv (Marks JD. et al., 1991; Viti F. et al 1999).

Sono stati sintetizzati anche complessi di scFv in dimeri (60 kDa *diabody*), trimeri (90 kDa *triabody*) (Atwell J. et al., 1999) o associazioni di quattro scFv in tetrameri (120 kDa *tetrabody*) utilizzando linker peptidici. Presentano una taglia sicuramente più grande e una *clearance* ematica minore, ma la presenza di più siti di legame per l'antigene ne aumenta l'affinità (Le Gall F. et al., 1999) (Fig 7).

Recenti studi concordano sul fatto che anticorpi di 60-120kDa sono altamente funzionali come targeting tumorali (Adams GP. et al., 1998; Viti F. et al., 1999). Dai traguardi raggiunti fino ad oggi, emerge in maniera evidente che siamo di fronte ad un nuovo modo di produrre anticorpi (Marks JD. et al., 1991; Viti F. et al 1999).

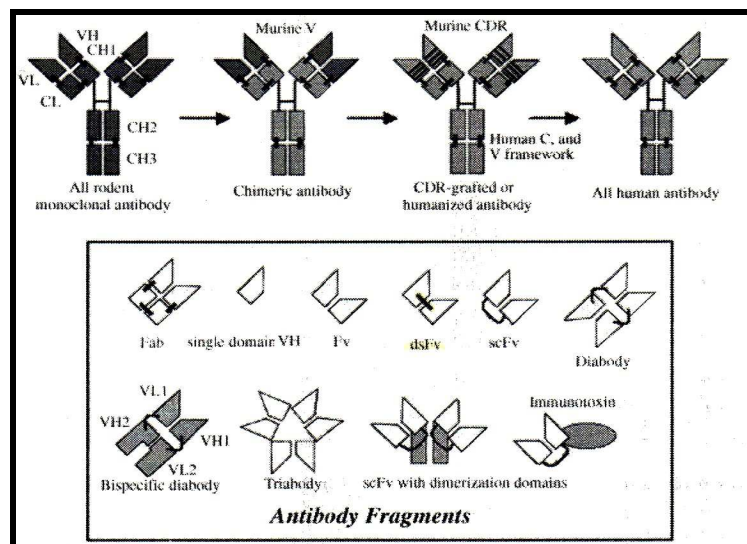


Fig 7: Rappresentazione dei domini anticorpali sintetici oggi utilizzati.

CAPITOLO SECONDO

METODI DI SELEZIONE BASATI SUL PRINCIPIO DEL DISPLAY

SOMMARIO: 2.1. Introduzione. – 2.2. Il phage display. –2.3. Ribosomal display. –2.4.Bacterial yeast display. – 2.5 Doppio ibrido.

2.1 Introduzione

Il concetto del display consente di associare il fenotipo al genotipo. Ogni proteina infatti, espressione fenotipica, “porta” con se la propria informazione genetica, denominata genotipo. Per questo, l’isolamento di una proteina, permette sia di arrivare alla sua informazione genetica che di aumentarne la sua disponibilità.

Il display viene ottenuto in modi diversi: il metodo maggiormente utilizzato, è quello per cui il gene d’interesse è clonato in fusione con quello codificante una proteina di superficie di un vettore che può essere: un batterio o un virus, o su una cellula eucariotica come quella del lievito. L’espressione della proteina chimerica consente di identificare ed isolare il vettore e con esso il gene in questione.

Ulteriori tecniche sono quelle che permettono l'isolamento di complessi di mRNA- proteina, o la tecnica del doppio ibrido.

Nel doppio ibrido i geni di due proteine sono clonati in due vettori diversi *in frame* che codificano per due frammenti di una stessa proteina. L'interazione tra i polipeptidi dei geni d'interesse ricostituisce la proteina sia fisicamente, che nella sua attività, conferendo alla cellula ospite la capacità di essere individuata attraverso o l'acquisizione di un vantaggio selettivo o tramite l'espressione di marcatori.

In questo capitolo andremo ad analizzare alcuni metodi di selezione oggi comunemente utilizzati, basati proprio sul principio del display.

2.2 Il Phage display

Il Phage Display o tecnica di esposizione su batteriofago si avvale della possibilità di esprimere sul capsido di un batteriofago un peptide o una proteina (Smith GP. 1985) senza interferire con le capacità infettive o la vitalità del batteriofago stesso.

L'espressione di frammenti polipeptidici sulla superficie della particella fagica (fago filamentoso come l'M13 l'fd o f1) è ottenuta clonando il suo gene codificante in fusione e *in-frame* con uno dei geni che codificano per una delle proteine del rivestimento del fago.

Il genoma del fago filamentoso è formato da un singolo filamento codificante nove differenti proteine, cinque delle quali responsabili della formazione del "coat" fagico.

Queste sono, la pVIII maggiormente rappresentata (2700 copie per fago), mentre la pIII, pVI, pVII, e pIX sono rappresentate in cinque copie. E' stato dimostrato che l'inserzione di una sequenza amminoacidica dell'ammino-terminale delle proteine pIII e pVIII non impedisce il corretto assemblamento del fago e non ne compromette l'infettività (Smith GP. 1985). L'espressione in copie multiple dei peptidi, in genere avviene in fusione con la proteina maggioritaria del rivestimento del fago pVIII lunga circa 50 amminoacidi, questa condizione aumenta implicitamente l'avidità dell'interazione con il ligando nel corso della

selezione della libreria, mentre repertori artificiali a copia singola sono generalmente espressi sulla proteina minoritaria del rivestimento del fago la pIII (Fig 8).

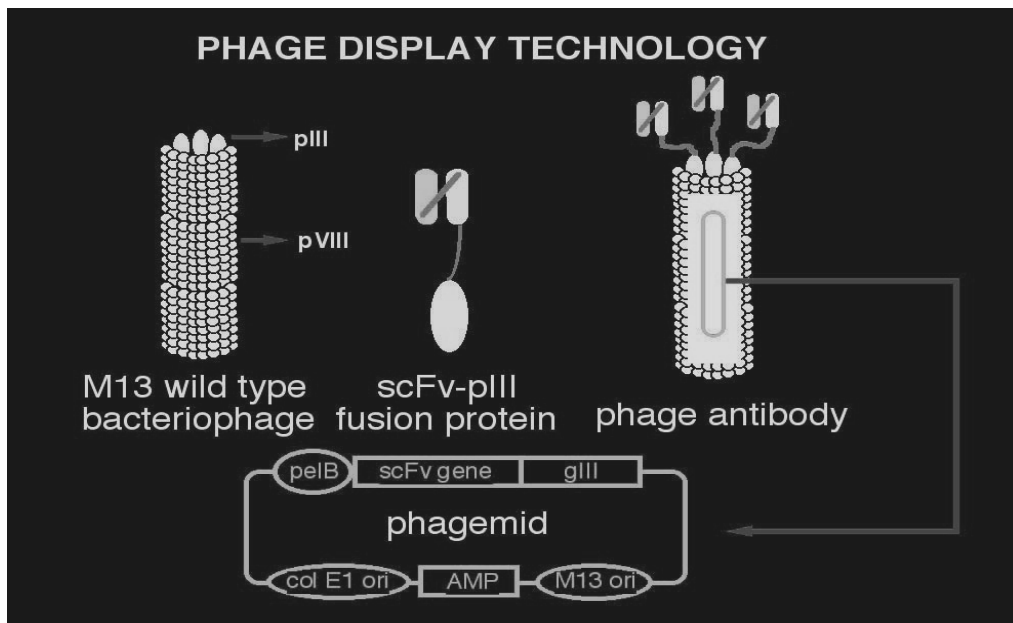


Fig 8: Frammenti scFv espressi sulla superficie del fago M13 come prodotti di fusione con la proteina capsidica pIII. Visualizzazione del vettore fagemide. Una volta che un anticorpo è stato isolato per la specificità di legame con l'antigene, è possibile risalire direttamente al suo genotipo in tempi brevi e senza ulteriori procedure di clonaggio.

Il vettore di clonaggio è costruito in modo tale da poter essere impaccato nella particella fagica. La propagazione delle particelle fagiche avviene tramite infezione in cellule ospiti, generalmente *Escherichia Coli*, all'interno delle quali vengono prodotte tutti gli enzimi necessari per la

produzione e replicazione del materiale genetico fagico fino alla produzione di mille particelle fagiche identiche (Smith GP. 1988) (fig 9).

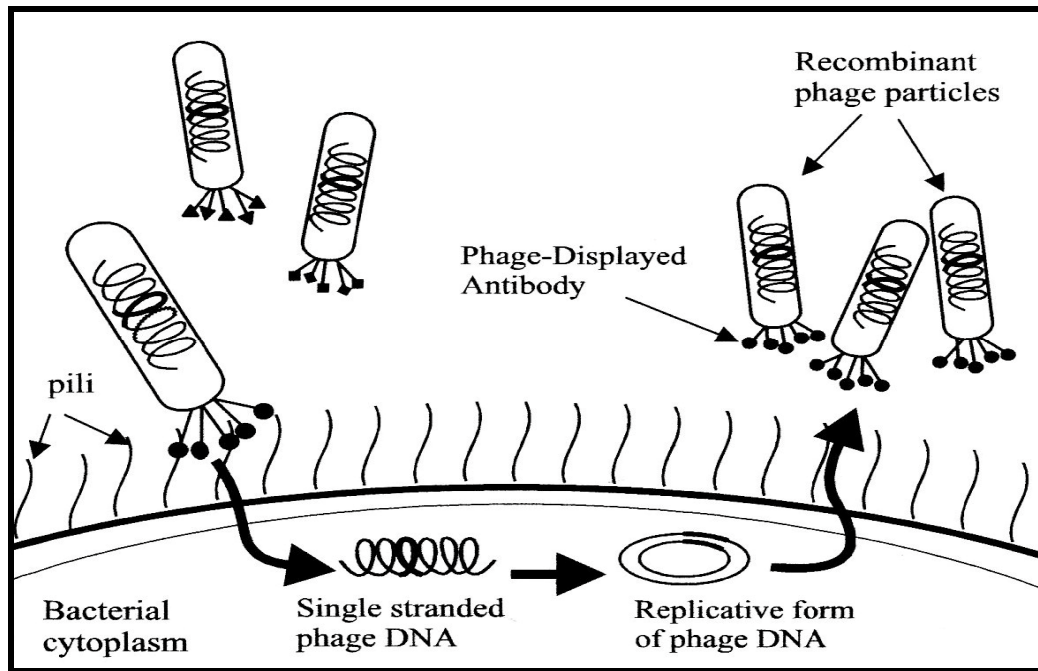


Fig 9: Generazione e amplificazione degli anticorpi per phage display. Le particelle fagiche contenenti anticorpi ricombinanti fusi con la proteina di rivestimento pIII vengono infettate. I fagi attaccano le particelle batteriche E. Coli aderendo al loro pilo, inseriscono il loro DNA virale e singola elica all'interno delle cellule ospiti, il quale viene riconvertito in doppia elica (dsDNA), per la replicazione e l'espressione della proteina virale. ssDNA sintetizzato viene impacchettato in nuove particelle fagiche e espulso fuori dalla cellula ospite

Il processo di selezione delle particelle fagiche che espongono sul caspide le molecole ricombinanti affini all'esca, può essere attuata immobilizzando l'antigene su supporti adeguati come: tubi di plastica,

membrane, microsfere, questo processo è chiamato *coating* (Parmley SF., Smith GP. 1988) o utilizzando una cromatografia per affinità.

Nel processo di cromatografia la miscela contenente i fagi, viene fatta fluire attraverso una colonna in cui è stata legata covalentemente la nostra proteina d'interesse (antigene), più le interazioni con il peptide esposto da fago sono forti e più questo verrà trattenuto.

Ogni eluizione inoltre, è seguita da un ciclo d'infezione in batteri, in maniera tale da ottenere un'amplificazione naturale dei peptici isolati (Marks JD. et al 1992). Nell'ultimo ciclo di eluizione anziché far crescere i virus isolati in terreno liquido, li si coltiva su piastra per poter selezionare i vari cloni con lo scopo d'individuare i singoli peptidi che hanno interagito con la proteina di studio (o antigene). Una volta isolati i fagi che interagiscono con la proteina di studio (antigene), si può procedere alla loro identificazione.

2.3 Il Ribosomal display

Il ribosomal display è un metodo *in vitro* dal quale è possibile direttamente isolare scFv senza l'utilizzo di fagi o organismi batterici. Il DNA della libreria codificante degli scFv è trascritto e tradotto *in vitro* formando un complesso mRNA-ribosoma-proteina scFv utilizzata per

selezionare un antigene immobilizzato (Hanes J., Oluckthun A. 1997, Hanes J. et al., 2000). Nel costrutto l'estremità 3' dell'mRNA lega una molecola di puromicina la quale è un antibiotico che inibisce l'allungarsi della proteina attraverso un legame covalente all'interno del sito A del ribosoma. Una volta formatosi questo legame, il peptide è pronto per la selezione mentre, *nell'mRNA display*, l'mRNA selezionato dal complesso può ulteriormente essere estratto e retrotrascritto, tramite RT-PCR, per rigenerare un pool di dsDNA che possono essere utilizzati per altri cicli di selezione (Robert RW., Ja WW. 1999). Il legame covalente dell'mRNA e del peptide è in grado di resistere a stringenti condizioni di selezione, tuttavia il costrutto necessita di un lavoro intensivo con alta probabilità di degradazione da parte dell'mRNA (Hanes J., Pluckthun A. 1997).

Questi metodi rappresentano un'ulteriore semplificazione per la selezione di piccoli scFv, oggi non molto utilizzati (Hanes J., Oluckthun A. 1997, Hanes J. et al., 2000) (Fig 10).

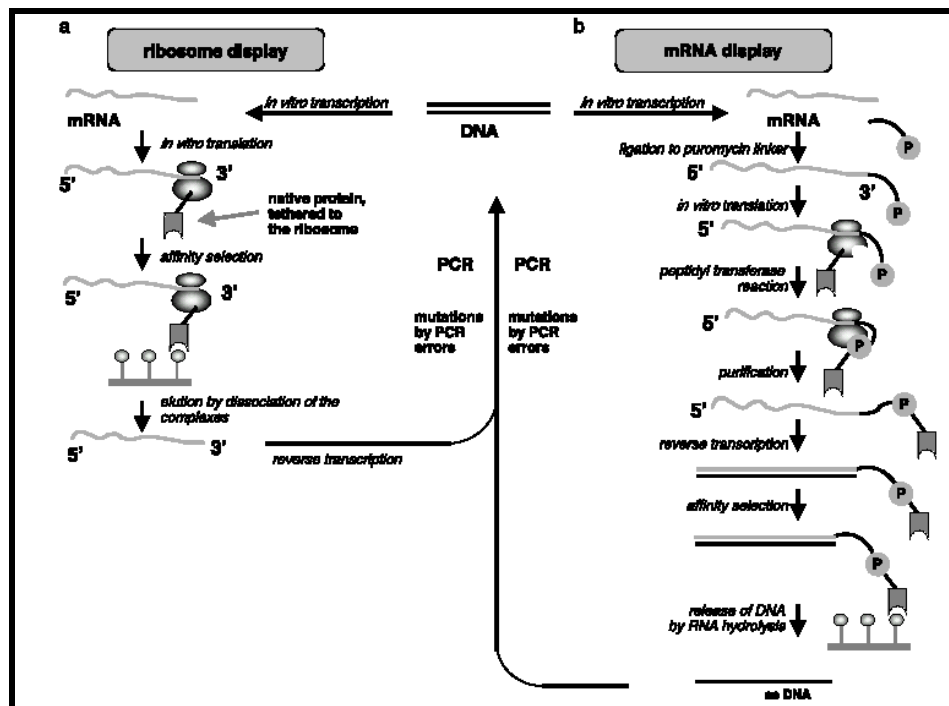


Fig 10: passaggi fondamentali nell'utilizzo del (a) ribosome display (b) mRNA display.

2.4 Bacterial yeast display

Sia nel *bacterial display* che nell'*yeast display* il polipeptide chimérico è espresso sulla superficie di una cellula batterica o di lievito.

Diversi peptidi sono stati esposti con successo sulle superficie di una cellula batterica (Georgiou G. et al., 1993), tra i quali: determinanti antigenici, enzimi, frammenti anticorpali, librerie di peptidi, sia formate da pochi amminoacidi (Agterberg M. et al., 1987) che proteine di 50kDa (Suzuki T. et al., 1995).

Samuelson P. et al nel 2002 hanno portato in rassegna una ampia classe di proteine esposte sia su batteri Gram-positivi, che Gram-negativi. L'ostacolo maggiore per l'esposizione del peptide sulla superficie dei batteri gram-negativi è la presenza di una grande rete di macromolecole all'interno del doppio stato fosfolipidico della parete batterica. Il caso più noto di *bacterial display* è quello della proteina *Omp A*, sulla superficie della membrana batterica E.Coli in uno dei loop della proteina che protrudono nell'ambiente esterno, consentendo l'inserzione della proteina esogena all'estremità C-terminale.

E' stata studiata a lungo l'espressione dei frammenti anticorpali scFv su batteri Gram positivi (*Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus*) (Gunneriusson E. et al., 1996) i quali rispetto ai batteri Gram-negativi, presentano dei vantaggi, il primo dei quali riguarda il fatto che possono presentare l'esposizione di proteine di più grandi dimensioni. La singola membrana dei batteri Gram-positivi inoltre, può permettere un miglior folding proteico, rispetto a quello riscontrato nella membrana dei Gram-negativi. La maggior rigidità della membrana dei batteri Gram-positivi permette alle cellule di resistere anche in condizioni stringenti durante il processo di selezione.

Nell' *yeast display* anticorpale si riscontrano alcuni vantaggi e caratteristiche rivelate nel *bacterial display*. Tra i quali la rigidità della

parete cellulare del lievito permette uno stabile mantenimento dell'esposizione proteica (Georgiou G. et al., 1997).

Nel caso del lievito *Saccaromyces cerevisiae*, la fusione avviene con il gene codificante per una proteina di membrana l'agglutinina, che determina l'adesione cellulare. L'espressione totale delle molecole ricombinanti è di circa 3×10^4 e questo rende possibile la selezione di cellule in cui il ligando interagisca marcando la cellula sulla superficie. Il recupero avviene utilizzando sistemi automatici come il Cell Sorter (FACS) che leggono la fluorescenza e separano le cellule in base a questa. Questa tecnica permette di poter esprimere una grande quantità di proteine eterologhe con appropriate modificazioni post-traduzionali (Wittrup KD. 2001; Yeung YA., Wittrup KD. 2002).

Tuttavia entrambe le tecniche permettono la realizzazione di diverse librerie, sono state costruite library *naive* di anticorpi umani (Feldhaus MJ. et al., 2003).

2.5 Doppio Ibrido

Il sistema del *doppio ibrido* sia in microorganismi che in cellule eucariotiche di lievito, si basano su prodotti di fusione costituiti da due

polipeptidi che interagiscono l'uno con l'altro, come: antigene anticorpo, enzima-substrato; e due metà funzionali di un fattore di trascrizione.

Fattori di trascrizione eucariotici sono organizzati funzionalmente in domini distinti: 1) il dominio legante il DNA (DNA-BD); 2) il dominio di transattivazione (AD). Se separati il DNA-BD e l'AD non interagiscono e non possono attivare la trascrizione. Un' interazione tra una proteina "esca" fusa al DNA-BD e una proteina codificata da una libreria di cDNA fusa al AD ripristina l'attività trascrizionale. L'attivazione di appropriati gene reporter (che permettono la crescita su terreno selettivo e l'espressione del gene per la beta-galattosidasi), rendono l'interazione rilevabile (Fig11). Quando un clone positivo viene identificato, il sistema del doppio ibrido permette accesso immediato al gene candidato responsabile dell'interazione.

L'uso di mutanti di delezione e mutagenesi sito diretta, combinati con il sistema del doppio ibrido, permettono di definire i domini responsabili della interazione.

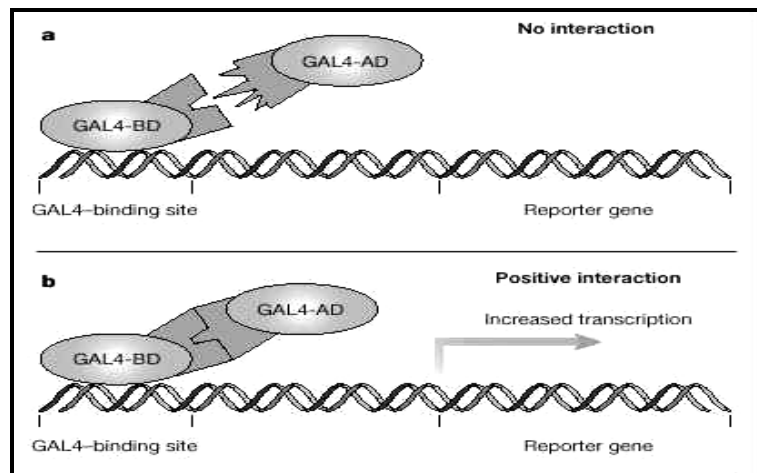


Fig 11: Il “doppio ibrido” si basa sui fattori di trascrizione. Un esempio è il fattore GAL4 di lievito che può essere diviso in due parti: uno si lega al DNA (BD), l’altro attiva la trascrizione quando viene portato in prossimità del DNA (AD). Se la proteina riconosce l’antigene, il dominio AD viene avvicinato al DNA, promuovendo la trascrizione di entrambi i geni reporter di lievito.

Nel doppio ibrido batterico, il principio è lo stesso, con due domini di una proteina fusi con due possibili interattori. La differenza fondamentale è che, in questo caso, vengono usati degli enzimi come la β -lattamasi batterica o il diidrofolato riduttasi eucariotica che garantiscono la resistenza ad un antibiotico e quindi la crescita della colonia batterica in cui l’interazione tra i due geni clonati è avvenuta.

Oggi il sistema del *doppio ibrido*, viene adottato per studiare interazioni proteiche, tra due proteine note, per isolare nuovi partner di interazione da librerie cDNA o. genomiche, stabilire domini proteici che mediano un’interazione e identificare residui specifici coinvolti

nell'interazione proteica, e nella caratterizzazione di nuove proteine (Solmaz S. 2003).

Inoltre, il doppio ibrido in lievito è stato largamente utilizzato nel tentativo di chiarire la mappa delle interazioni proteiche di un intero genoma (Fromont-Racine MJ. et al., 1997).

Nonostante i notevoli risultati ottenuti questa tecnica è stata affiancata da altre tecnologie di screening, una tra queste il phage display, vista la cospicua percentuale di falsi positivi e falsi negativi che questa metodologia porta con se.

Con l'avvento di vari metodi di display per la selezione e il perfezionamento della produzione degli anticorpi ricombinanti, l'immunotecnologia oggi ha raggiunto significativi progressi. L'espressione di anticorpi in sistemi economici ed efficienti hanno portato ad avere una vasta gamma di anticorpi facilmente disponibili, a basso costo, utilizzati in diversi campi che vanno dalla medicina all'agricoltura.

Questo è stato possibile, grazie ai pioneristici studi sugli anticorpi, accennati in precedenza, che hanno posto le basi per l'utilizzo di queste potenti tecnologie (Kerrm YF., 2003).

CAPITOLO TERZO

BATTERIOFAGI

SOMMARIO: 3.1. Introduzione. – 3.2. Fago filamentoso. – 3.3. Replicazione del fago filamentoso. – 3.4. Applicazioni del fago filamentoso. – 3.5. Il fago lambda. – 3.6. Replicazione del fago lambda. – 3.7. Applicazioni sperimentali del fago lambda. 3.8. Il fago T4 e le applicazioni sperimentali. – 3.9. Il fago T7. – 3.10. La replicazione del fago T7. – 3.11. I vettori d'esposizione derivati da T7.

3.1 Introduzione

La trasduzione (letteralmente “passare attraverso”) è un processo nel quale batteriofagi (virus batterici, chiamati per brevità fagi) funzionano da intermediari nel trasferimento dell'informazione batterica da un batterio donatore ad uno ricevente; questi fagi sono chiamati fagi vettori. La maggior parte dei ceppi batterici viene infettata da fagi specifici. La struttura dei fagi è molto semplice, il materiale genetico di un fago (DNA o RNA) è contenuto in un singolo cromosoma, circondato da un involucro proteico. Variazioni nel tipo, nel numero e nell'organizzazione delle proteine conferiscono ai fagi il loro caratteristico aspetto (Lewin B. 2000).

Andremo ad esaminare in dettaglio i batteriofagi oggi utilizzati nei metodi di selezione peptidica e proteica.

3.2 Fago Filamentoso

I fagi filamentosi infettano i batteri Gram negativi aderendo al pilo coniugativo e vengono divisi in quattro gruppi a seconda del tipo di pilo sessuale che prediligono durante l'infezione dell'ospite.

Al gruppo di fagi che infettano i batteri tramite il pilo F appartengono i fagi M13, fd, e f1 (Rasched I., Oberer E.1986), questi fagi sono largamente utilizzati nella tecnologia del phage display.

I fagi filamentosi sono lunghi circa 1μ hanno un diametro di 6-10 nm, quindi estremamente sottili. Una molecola di DNA a singolo filamento di forma circolare è posto all'interno del fago per tutta la sua lunghezza (Model P., RM. 1988) (Fig12).

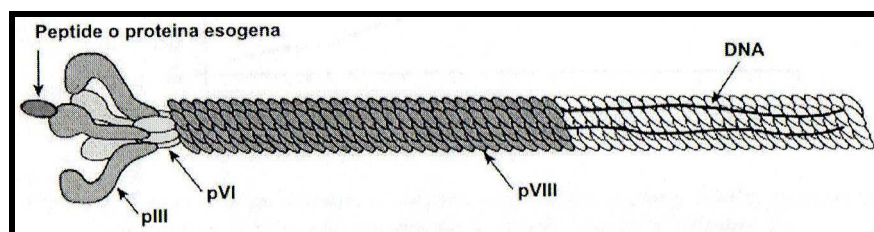


Fig 12: Struttura del fago filamentoso

Il DNA del fago è formato da 6400 basi, codifica per 10 geni differenti, cinque dei quali rappresentano proteine di rivestimento del

casptide che sono: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. La proteina maggiormente rappresentata è la pVIII che è presente in circa 2700 copie e che si assembla fino a formare la struttura cilindrica dove è contenuto il DNA. Le parti terminali del capsido sono costituite da proteine differenti: da una parte sono presenti tre-cinque copie della proteina pVI e cinque copie della proteina pIII, dall'altra parte ci sono le proteine pVII e pIX. La proteina pIII gioca un ruolo chiave nell'iniezione del DNA, in quanto è in grado di riconoscere e legare il pilo F dell'ospite.

3.3 La replicazione del fago filamentoso

Subito dopo l'infezione il DNA a singolo filamento viene replicato in una struttura ad doppio filamento ad opera delle DNA polimerasi dell'ospite batterico e successivamente replicato in più copie tramite l'intervento del prodotto del gene II del fago. Le proteine del capsido vengono accumulate nel citoplasma a ridosso della membrana interna del batterio e via via assemblate intorno al DNA a formare nuovi fagi. Questo processo avviene contemporaneamente all'attraversamento della membrana. E' stato proposto che le proteine pI e la pIV vadano a formare una sorta di tunnel idrofilico nella membrana attraverso il quale possono passare le particelle neo formate (Russel M. 1994) (Fig 13).

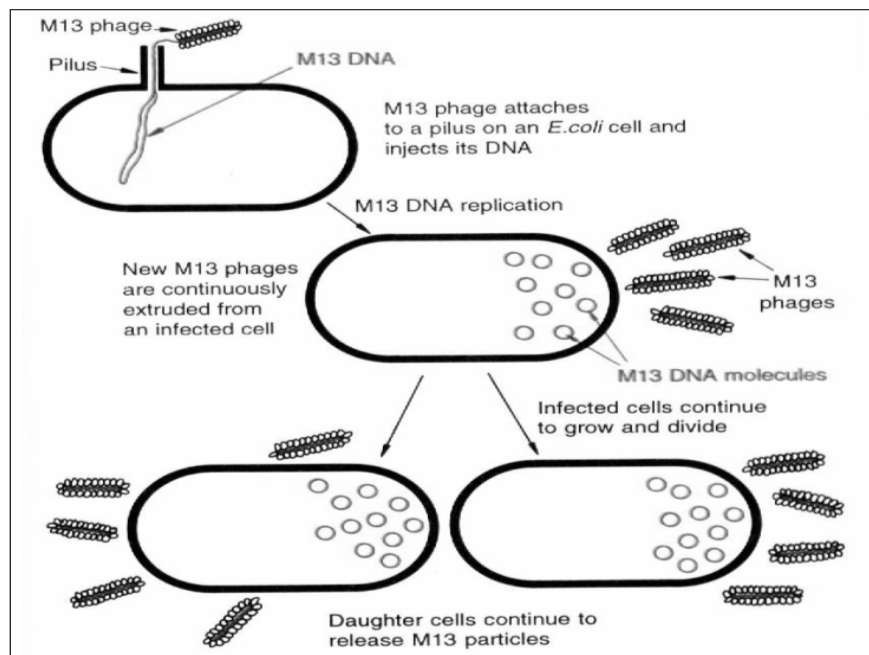


Fig 13: Ciclo replicativo del fago filamentoso

Quando un fago neoformato attraversa la membrana la proteina pV che riveste il DNA viene sostituita attraverso un processo tuttora non chiarito dalla proteina principale del capsido fagico, il prodotto del gene VIII. Se all'interno di una cellula batterica infettata da un fago filamentoso si trova un plasmide in cui sono presenti l'origine di replicazione e la zona intergenica del fago, questo plasmide detto *fagemide* viene amplificato con le stesse modalità del fago ed incapsidato in particelle virali (Dente L. et al., 1983). Questa caratteristica viene oggi sfruttata nella tecnologia del phage display, dove si utilizzano i fagemidi per clonarvi all'interno le sequenze esogene, ed un fago detto *Helper*, per

permetterne l'incapsidamento. L'utilizzo del vettore fagemide presenta diversi vantaggi rispetto al vettore fagico (Mc Cafferty J. 1996). La dimensione del vettore fagemide è considerevolmente più piccola del vettore fagico, e quindi è più facile la sua propagazione (MacKenzie CR. 1998). Tuttavia l'efficienza della trasformazione batterica è maggiore con la presenza del vettore fagemide piuttosto che con quello fagico, questo può permettere un'incremento della diversità della libreria utilizzata (MacKenzie CR. 1998; Tout NL. et al 2001) (Fig14).

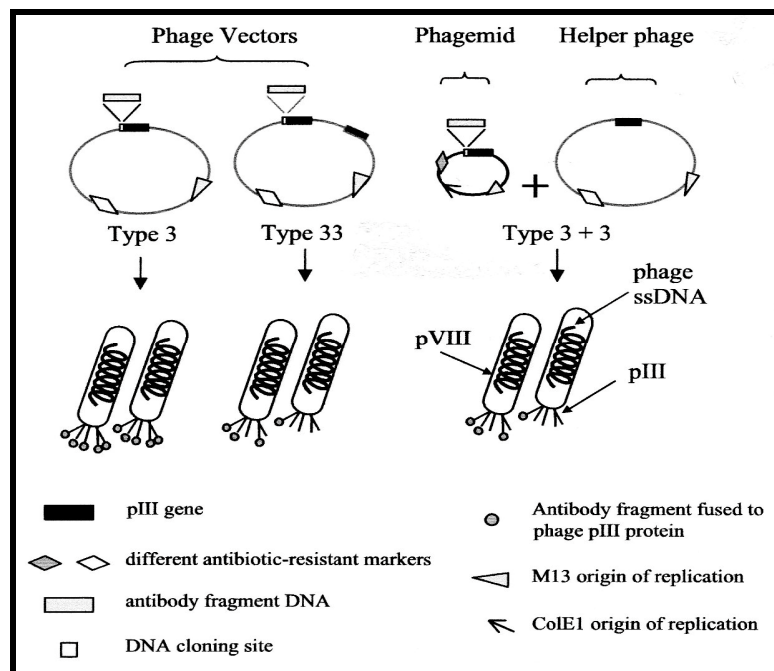


Fig 14: Vettori usati per il display sulla superficie del fago filamentoso attraverso la proteina di rivestimento pIII.

3.4 Applicazioni del fago filamentoso

Il prodotto del gene III del fago filamentoso è una proteina di 406 amminoacidi, presente nella struttura capsidica in cinque copie, l'estremità che sporge verso il solvente di questa proteina è responsabile del riconoscimento del pilo F del batterio.

Un'altra proteina del capsido la pVIII è presente in 2700 copie ed l'estremità carbossi-terminale è rivolta verso l'interno e quella ammino-terminale verso il solvente.

E' stato dimostrato che l'inserzione di una sequenza amminoacidica all'ammino terminale delle proteine pIII e pVIII non impedisce il corretto assemblamento della particella fagica e non ne compromette neanche i processi infettivi (Il'ichev AA. et al ., 1989). Questo fatto ha permesso la realizzazione di numerose di repertori artificiali su pIIIe pVIII (Willson DR., Siebers BB. 1998).

Sono stati fatti dei tentativi di sfruttare il sistema del fago filamentoso per assemblare librerie di espressione di cDNA (Palzkill T. et al ., 1998 24).

Tuttavia questi approcci non sono riusciti a rappresentare una valida alternativa ad altre metodologie di screening di interazioni come il sistema del doppio ibrido in lievito, questo può essere spiegato dalle modalità di replicazione del fago filamentoso, nel quale le proteine esogene espresse sul capsido dovranno attraversare la membrana

plasmatica del batterio ospite, questo fenomeno può provocare un blocco della formazione della particella fagica dovuta alle particolarità presentata dai peptidi o proteine esposte. Oggi infatti vengono utilizzati sistemi alternativi a quello del fago filamentoso, come l'utilizzo del fago lambda e del fago T7.

3.5 Il fago lambda

Il fago lambda è formato da una testa icosaedrica e una coda allungata. La testa è di 63 nm di diametro e racchiude il genoma del fago sotto forma di DNA lineare a doppio filamento che è lungo 48.000bp. E' formato da 415 copie della proteina del capsido pE e da circa 410 copie della proteina pD. La proteina pE si dispone in esameri e pentameri, mentre la proteina pD in trimeri (chiamata anche proteina di decorazione). Alla testa è attaccata una coda flessibile composta da una singola proteina chiamata gpV, che forma 35 dischi sovrapposti ciascuno formato da sei copie di gpV. All'estremità della coda è presente una fibra di assorbimento. Il genoma contiene 50.000 paia di basi e codifica per 50 proteine (Fig. 15 - 16).

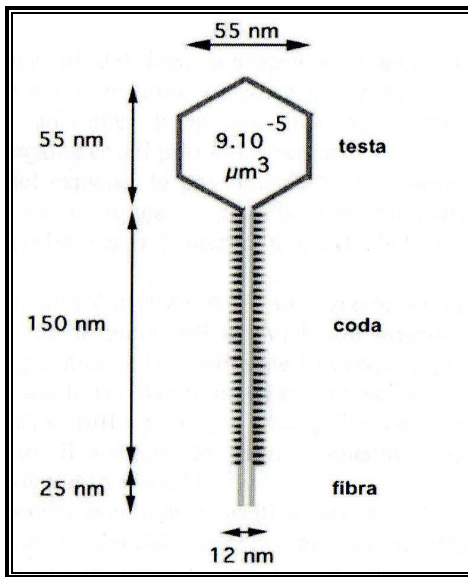


Fig 15: Struttura del fago lambda

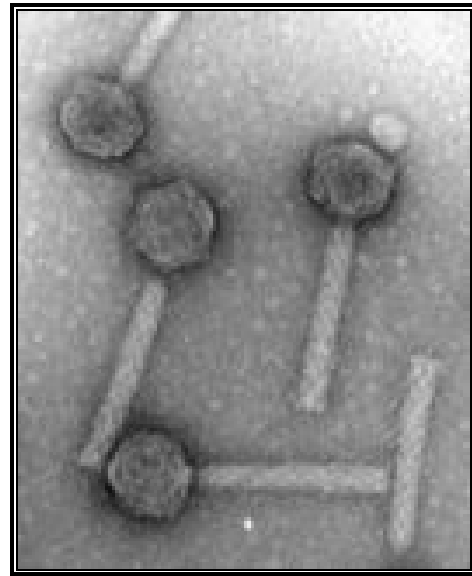


Fig 16: Fagi lambda al microscopio elettronico

3.6 La replicazione del fago lambda

I meccanismi alla base del ciclo di replicazione e del processo d'infezione del batteriofago lambda sono stati ampiamente studiati (Taylor K., Wegrzyn G. 1998; Gottesman M. 1999).

Il DNA di lambda presente nel capsido ha forma lineare, e una volta che il fago aderisce alla parete del batterio, inietta al suo interno il DNA fagico attraverso la sua coda flessibile a mò di siringa. Il DNA all'interno del batterio assume la forma circolare e può attivare una cascata di eventi che porta alla lisi della cellula ospite (ciclo litico) o all'integrazione nel cromosoma batterico (ciclo lisogenico).

Nel ciclo litico, il DNA replicato in molte copie, fino a produrre circa un centinaio di nuove particelle fagiche che vengono rilasciate attraverso la lisi indotta dal fago della cellula batterica.

Nel ciclo lisogeno, il cromosoma di lambda viene integrato in quello batterico e si replica insieme ad esso mediante l'apparato di replicazione del genome dell'ospite. Il cromosoma del fago, una volta integrato prende il nome di *profago*. Il batterio che contiene un fago allo stato di *profago* viene chiamato lisogeno per questo fago; il fenomeno dell'inserzione del cromosoma del fago nel cromosoma batterico, viene chiamato lisogenia. I fagi che possono scegliere tra ciclo litico e ciclo lisogeno vengono chiamati *fagi temperati*. Lo stato di *profago* è mantenuto dall'azione di uno specifico prodotto genico (una proteina repressore) che impedisce l'espressione dei geni di lambda essenziali per il ciclo litico. Quando il repressore, che mantiene lo stato di profago viene distrutto ad esempio per effetto di fattori ambientali quali i raggi ultravioletti, in questi casi il DNA del fago è rilasciato dal cromosoma batterico e viene indotto il ciclo litico.

La scelta del tipo di ciclo, litico o lisogeno, dipende dalle condizioni d'infezione, dal genotipo sia del fago che del batterio.

Nel ciclo litico il genoma di lambda viene replicato sfruttando le capacità delle sue estremità di legarsi o *estremità coesive*. Il DNA del fago termina infatti alle estremità 5' con due sequenze a singolo filamento

complementari che possono appaiarsi ed essere legate dalla DNA ligasi batterica, questo processo produce un DNA circolare che può essere replicato e che al momento di essere impacchettato nel capside viene riconosciuto e tagliato in cromosomi di lunghezza unitaria (Catalano CE. et al., 1995) (Fig 17).

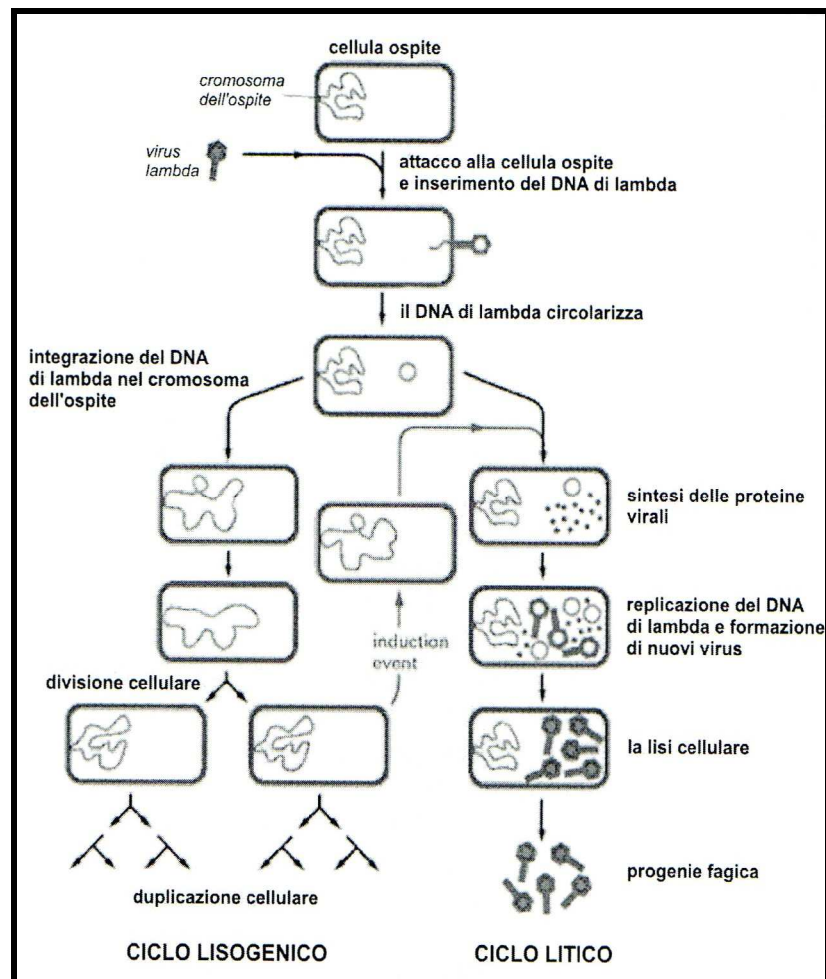


Fig 17: Ciclo replicativo del fago lambda

L'assemblaggio del capsido procede attraverso la formazione di un precapsido formato dalla proteina E nel quale viene inserito e condensato il DNA di lambda (46.5Kbp circa).

La proteina D viene aggiunta solo al termine della formazione del capsido, la quale interagisce con la proteina E conferendo il tipico aspetto granuloso al capsido del fago (Hohn T. et al., 1976). La funzione della proteina D è quella di stabilizzare la struttura del capsido.

La maturazione della particella fagica si conclude con l'aggiunta della coda alla testa oramai matura.

3.7 Applicazioni sperimentali del fago lambda

Durante il ciclo litico, il DNA batterico viene degradato e in rare occasioni, pezzi di DNA batterico possono essere impacchettati nella testa del fago al posto del DNA del fago. Data la rarità di questo evento, solo una piccola frazione della progenie fagica porta materiale genetico di origine batterica. Questi fagi vengono chiamati *trasducenti*, dato che essi funzionano da veicolo per il trasporto di materiale genetico da un batterio all'altro. Questo processo viene chiamato *trasduzione generalizzata* perché il pezzo di DNA batterico, che il fago assume erroneamente e trasporta nel batterio *ricevente*, è un pezzo casuale del cromosoma

batterico frammentato. Quindi qualsiasi gene può essere *trasdotto*; quello che è necessario è un fago capace di operare la trasduzione generalizzata e ceppi batterici che portino marcatori genetici diversi. Attraverso questo processo è possibile stabilire l'ordine e la distanza di mappa tra geni che vengono *cotrasdotti* ed è con questa procedura che è stata costruita la mappa dettagliata del cromosoma batterico (Russel PJ.,1998).

I primi esperimenti di esposizione di proteine esogene sul fago lambda furono effettuati da Maryuama e collaboratori nel 1994. I quali ingegnerizzarono un vettore chiamato λ foo codificante la parte C-terminale della proteina V (mancante degli ultimi 70 amminoacidi) un codone amber, un sito di attacco al ribosoma, una nuova tripletta AUG di inizio traduzione e la sequenza codificante per la regione esogena. Questi infatti partirono dall'osservazione che un fago lambda codificante per la proteina pV mancante degli ultimi 70 amminoacidi erano comunque in grado di formare particelle infettive (Fig 18).

Ulteriori studi dimostrarono inoltre che la sequenza linker formata da più di 24 residui di Ser-Gly, tra il gene gpV e l'inserto, era in grado di aumentare la tolleranza del sistema, fino ad arrivare ad un 100% di proteine chimeriche incorporate dalle particelle fagiche (Dunn IS., 1996).

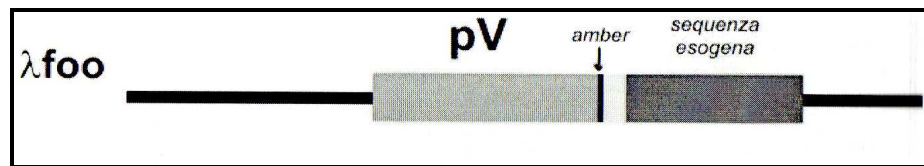


Fig 18: Vettore λ foo

Un secondo sistema di esposizione su fago lambda è stato quello di utilizzare la proteina D.

La proteina D (11kDa) è presente in 405 copie per virione, ed è arrangiata in trimeri, questa proteina è essenziale per la morfologia della particella fagica, mutanti mancanti sono capaci di impacchettare il genoma fagico con grandi delezioni genomiche.

Nel 1995 Stemberg e Hoess ingegnerizzarono un vettore formato un codone di stop di tipo amber nella sequenza nucleotidica che precede la sequenza codificante la proteina D selvatica. In questo modo affinché il fago fosse in grado di produrre nuove particelle nel batterio doveva essere presente un plasmide che codificasse per la proteina D, così da mantenere la sua funzionalità.

Gli studi successivi forniti sempre dagli stessi autori furono in grado di integrare l'informazione genetica che codifica la sequenza esogena, nel genoma del fago. Questo è stato possibile attraverso l'inserzione di due siti loxP sia nel DNA del fago lambda che nel plasmide codificante la proteina D, questi in presenza della proteina Cre

sono in grado di effettuare il trasferimento del DNA che codifica per l'elemento esogeno fuso alla proteina D, dal plasmide, al genoma di lambda. (Suer B. 1993).

Il sistema Cre/lox descritto da Starneberg e Hoess fu tuttavia ulteriormente sviluppato attraverso la costruzione di un ulteriore vettore che ha permesso d'inserire la sequenza esogena all'estremità carbossi-terminale della proteina D (Mikawa YG. et al., 1996). Quindi la proteina D può essere efficacemente utilizzata per esporre peptidi e proteine attraverso un costrutto genetico applicato all'estremità ammino e carbossi-terminale.

Recentemente è stata analizzata la sua struttura tridimensionale attraverso un *cryo-electro* microscopia e ricostruzione d'immagine; (la serina 15 è stato il primo residuo amminoacidico ad essere stato individuato all'ammino-termionale, mentre la valina 109 è stata individuata all'estremità carbossi-terminale) (Fig 19).

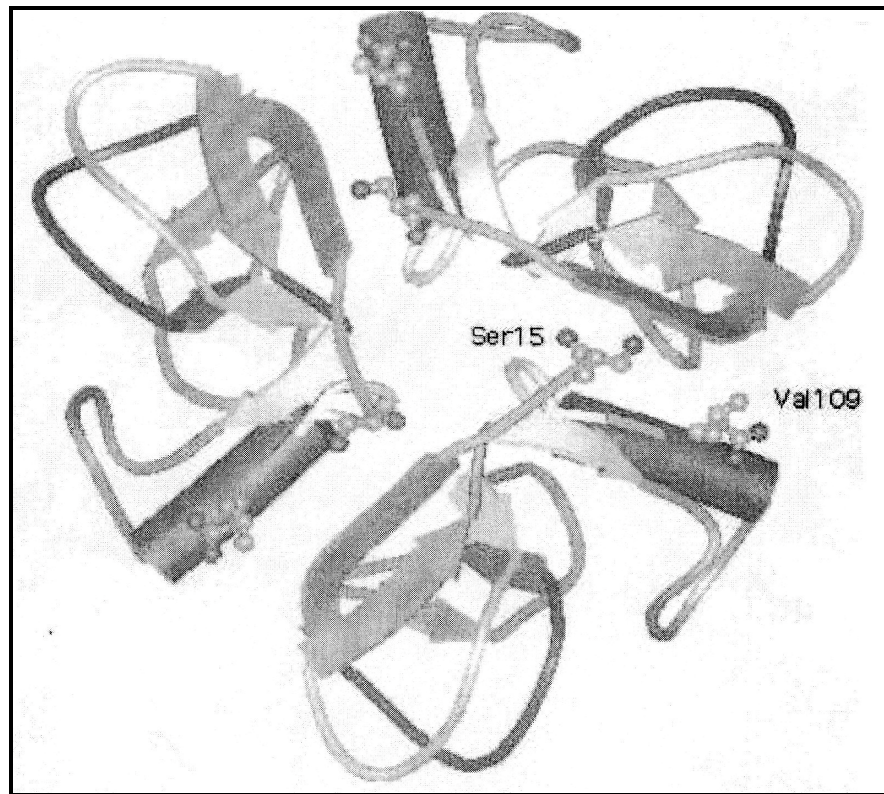


Fig 19: Rappresentazione tridimensionale del trimero della proteina D. Val 109, residuo carbossiterminale, e Ser 15.

Per superare problemi d'instabilità e promuovere l'esposizione di grandi proteine, gli scienziati coniarono un nuovo vettore di cDNA su lambda, caratterizzato dalla possibilità di controllare un grande numero di copie di proteine esogene fuse con la proteina D, chiamato λ pRH825 (Fig 20).

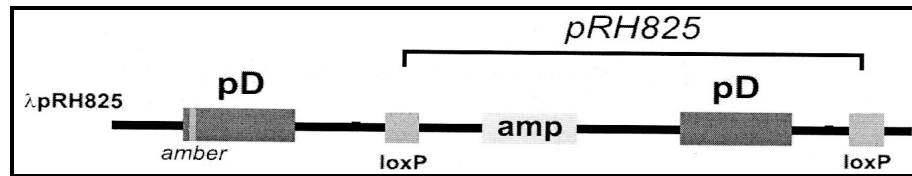


Fig 20: Vettore λ pRH825.

In questo vettore è stato eliminato uno dei due siti LoxP e l'origine di replicazione plasmidica per ottenere un λ Display1. Per ottenere un λ Display3, è stato introdotto un codone Amber subito prima dei siti di restrizione per l'inserimento delle sequenze esogene.

Entrambi i vettori sono estremamente stabili, e permettono, variando la natura del ceppo batterico ospite, di modulare la percentuale di proteina ricombinante presente sul capsido fagico.

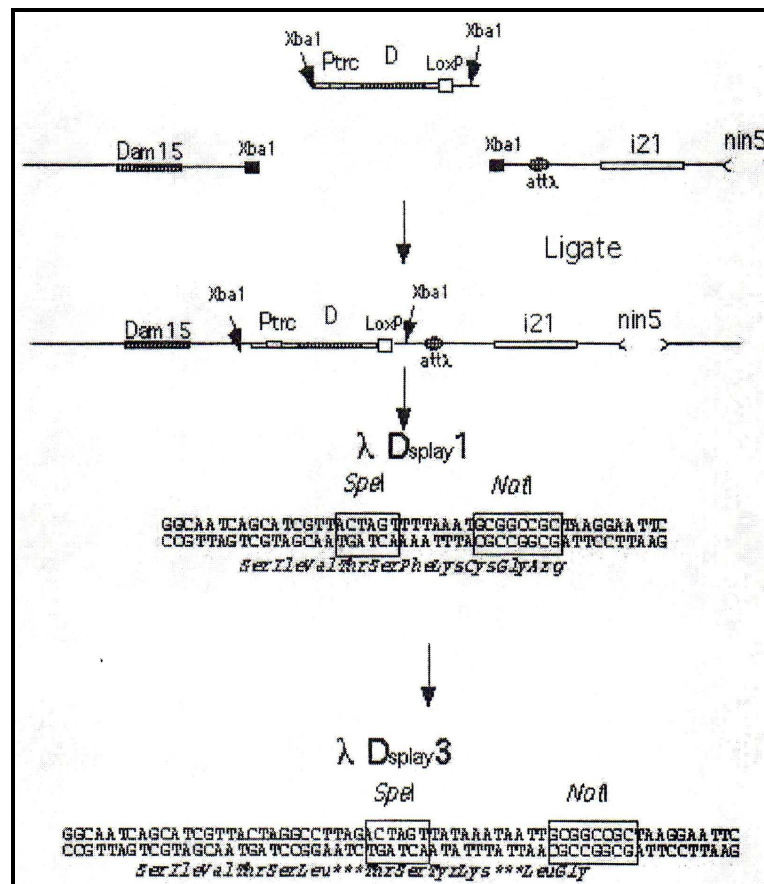


Fig 21: Struttura di due vettori di cDNA, λ Display1 e λ Display3.

3.8 Il fago T4 e applicazioni sperimentali

Il fago T4 è composto da un capside formato da tre proteine. La proteina maggiormente rappresentata è la 23 (gp23) precisamente in 916 copie, la proteina 24 (gp24) è presente in 55 copie, mentre la proteina 20 (gp20) in 12 copie per particella. Ci sono poi due proteine accessorie la prima SOC (small outer capsid protein) di 9kDa, e la proteina HOC (highly antigenic outer capsid protein) di 40kDa, la quale rappresenta la proteina di decorazione fuori dal capsid (Steven A. et al., 1990).

I fagi T4 si replicano attraverso il ciclo litico e possiedono uno dei genomi fagici più grandi (165 kbp), con un'estesa organizzazione dei geni in gruppi funzionali (fig22). I geni indicati dai numeri sono essenziali: una mutazione in uno qualunque di questi loci impedisce in completo sviluppo del ciclo litico. I geni indicati con abbreviazioni di tre lettere sono, non essenziali, per lo meno nelle condizioni usuali. Di molti di essi la funzione è ancora poco chiara; presumibilmente conferiscono a T4 un vantaggio selettivo. (Nei genomi fagici più piccoli i geni sono tutti, o quasi tutti, essenziali).

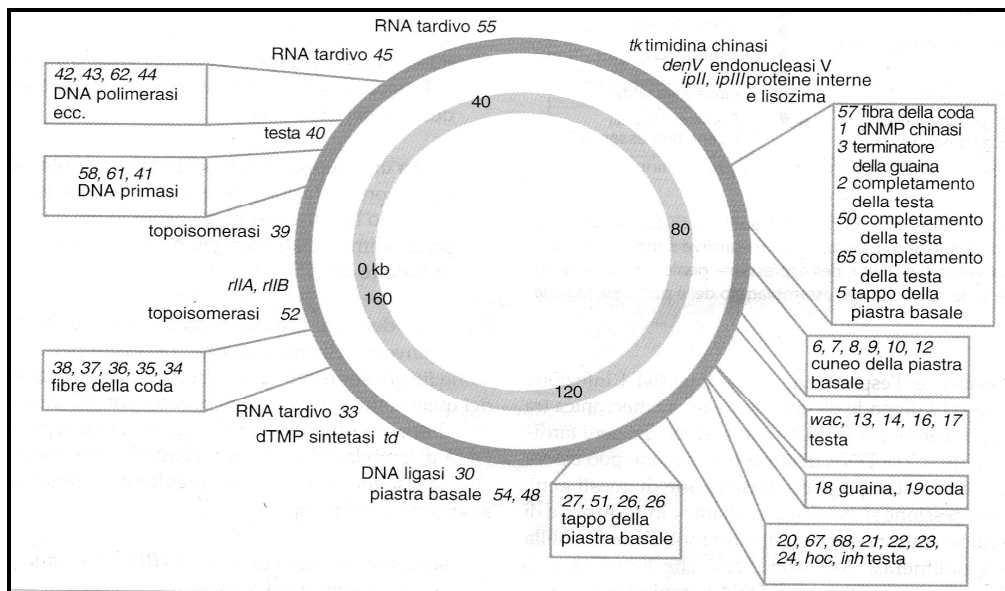


Fig 22: mappa del DNA circolare di T4. I geni essenziali sono indicati da numeri, quelli non essenziali da lettere. Sono riportati solo alcuni dei geni più rappresentativi.

I due geni essenziali della categoria “trascrizione” assolvono una funzione regolativa: i loro prodotti sono necessari per l’espressione dei geni tardivi. L’infezione del fago T4 dipende da una connessione meccanica tra la replicazione del DNA e l’espressione dei geni tardivi; infatti solo il DNA in attiva replicazione può essere come stampo per la trascrizione di questi geni. La connessione si stabilisce mediante l’introduzione di un nuovo fattore sigma e di altre modificazioni nella RNA polimerasi dell’ospite, così che l’enzima può agire solo su uno stampo di DNA in replicazione (probabilmente perché l’apparato della replicazione interagisce direttamente con la RNA polimerasi). Questa connessione stabilisce una corretta correlazione fra la sintesi delle proteine fagiche e il numero di genomi disponibili per l’impacchettamento (Lewin B.1997).

Le applicazioni sperimentali che utilizzano i fagi T4, prevedono la fusione di proteine esogene con la sequenza genica codificante per le proteine SOC ed HOC. Queste proteine sono particolarmente adatte per essere utilizzate in fusione con proteine esogene in phage display, in quanto non sono proteine indispensabili e si aggiungono alla struttura capsidica una volta terminato tutto il processo di formazione. La proteina HOC è stata fusa nella sua porzione ammino-terminale dalla sequenza (36 amminoacidi) del peptide PorA proveniente dal batterio della meningite. Applicazioni in phage display hanno mostrato significativa reattività e

specificità confermata anche da interazione con anticorpo monoclonale in saggio ELISA. La proteina HOC è stata fusa nella regione carbossi-terminale con la sequenza genica del recettore CD4. Anche in questo caso si è ottenuta una forte stabilità e specificità di selezione (Ren Z., et al 1998).

Una limitazione nell'utilizzo dei fagi T4 in phage display risiede nel fatto che non ci sia ancora un efficiente sistema di packaging, questo impedisce lo sviluppo e l'analisi di librerie peptidiche.

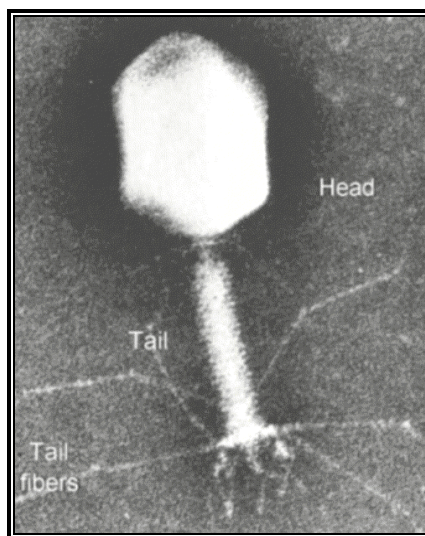


Fig 23: Fago T4 al microscopio elettronico

3.9 Il Fago T7

Il fago T7 ha una struttura simile a quella del fago lambda. Ha un capsidico icosaedrico contenente un DNA a doppio filamento di circa 40kbp.

Il capsidico è formato da 415 copie della proteina gp10 organizzata in 60 esameri. Tra la coda e la testa è presente una giunzione codificata dal gene 8. Ha una coda conica (codificata dai geni 11 e 12) da cui provengono sei fibre (prodotte dal gene 17) (Fig 24-25).

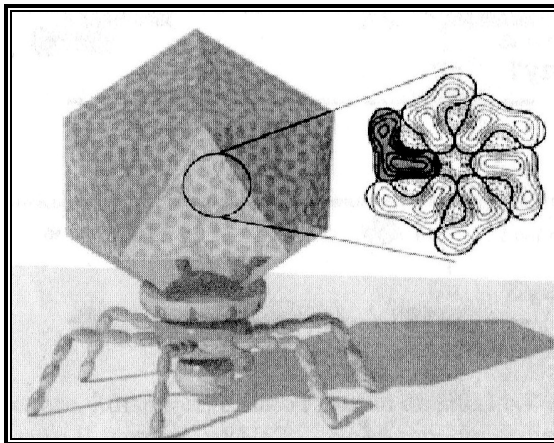


Fig 24: Struttura del fago T7.

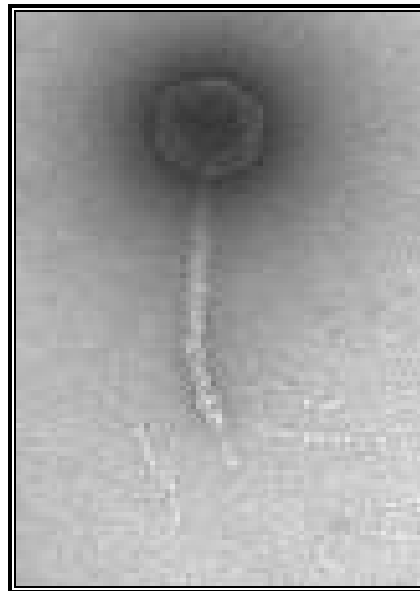


Fig 25: Fago T7 al microscopio elettronico.

3.10 La replicazione del fago T7

I meccanismi alla base del processo replicativo dei fagi T7 possono essere paragonati ai meccanismi che portano all'assemblaggio di nuove particelle di batteriofagi di lambda. Il DNA replicato viene impacchettato in un involucro precapsidico formato dal prodotto del gene 9 e dalla proteina del capsido codificata dal gene 10. Quando il DNA viene inserito nella testa del capsido nella particella fagica matura vengono infine aggiunti il connettore testa-coda, la coda, e le sei fibre. A differenza del fago lambda, le particelle fagiche di T7 sono più e resistenti per questo i fagi che espongono peptidi o proteine possono essere eluite dai loro ligandi anche in condizioni difficili senza che venga compromessa la loro infettività.

La proteina del capsido ha due forme, la gp 10 (344 amminoacidi) e la gp10B (397 amminoacidi). La forma più lunga è prodotta da un *frame-shift* e rappresenta circa il 10% della proteina del capsido (Condrón GB. et al., 1991). La proteina gp10 viene oggi utilizzata per l'esposizione di ampie librerie di cDNA.

3.11 I vettori d'esposizione derivati da T7

I vettori derivati da T7 utilizzati oggi per processi di selezione in phage display sono diversi e differiscono per la loro densità di esposizione delle proteine ricombinanti sul capsido del fago e possiamo dividerle in tre tipologie:

- **T7Select415-1:** utilizzato per l'esposizione di peptidi ad alta densità (415 copie di peptidi non superiori a 50 amminoacidi)
- **T7Select10-3:** utilizzato per ridotte esposizioni di peptidi o proteine ad alto peso molecolare (5-15 copie, fino a 1000 amminoacidi).
- **T7Select1-1:** utilizzato per l'esposizione di peptidi o grosse proteine in pochissime copie per fago (0,1-1 copia).

Nel primo sistema T7Select415-1, la proteina ricombinante o peptide è posto sotto il controllo del promotore selvatico di T7, quindi il capsido di questo vettore sarà ricoperto di proteine ricombinati.

Nel secondo sistema T7Select10-3, il sito per il legame al ribosoma è mutato per diminuirne l'efficienza, quindi il vettore produrrà una quantità limitata di gp10. La proteina gp10 selvatica viene fornita in *trans* mediante l'infezione di cellule ospiti BLT5615, trasformate mediante il plasmide batterico che è in grado di produrre la proteina gp10 *wild type*, mantenendo la capacità infettiva del fago.

Nell'ultimo sistema T7Select1-1: il sito di legame del ribosoma viene rimosso del tutto, formando quindi una completa quantità di proteina gp10 *wild type*, prodotta nella cellula ospite BLT5615 trasformate con il plasmide batterico in grado di produrre la proteina.

Con questi vettori commerciali sono state realizzate diverse librerie di cDNA utilizzate in molti lavori d'interazione proteica (Rosemberg A., 1996).

SCOPO DEL LAVORO

Gli anticorpi ricombinanti oggi rappresentano una potente tecnologia che può essere utilizzata per diversi scopi che vanno dall'utilizzo come reagenti immunocitochimici, alla medicina per applicazioni cliniche e sperimentali (Winter G., Milstein C. 1991) e sono tra le più sicure applicazioni per l'individuazione di malattie autoimmuni infiammatorie e tumorali. Presentano diverse peculiarità:

Hanno la straordinaria capacità di legare diversi antigeni con alta affinità e specificità (Biocca S., Cattaneo A. 1995).

Diversamente dalle naturali immunoglobuline secrete dalle cellule plasmatiche, le quali svolgono una funzione a livello extracellulare, possono essere prodotti a livello intracellulare in cellule eucariotiche (Munro S., Pelham HR. 1987).

Sono in grado di penetrare nei tessuti in modo più rapido (Huston JS., et al 1996);

Le ridotte dimensioni delle molecola anticorpale consente una rapida *clearance* ematica e tissutale e una scarsa captazione epatica o di altri organi (Yokopta T. et al., 1992).

Il tempo necessario al loro isolamento è estremamente breve: due o tre settimane.

Hanno rese di produzione elevate con costi ridotti, dovuti all'utilizzo di batteri in luogo di cellule somatiche.

Gli anticorpi ricombinanti presentano una buona affinità di legame per l'antigene, la quale può essere considerevolmente aumentata attraverso processi di mutagenizzazione a carico del DNA codificante per gli scFv (Marks JD. et al., 1991; Viti F. et al 1999).

Il lavoro svolto in questa tesi ha lo scopo di approfondire e migliorare la selezione anticorpale attraverso la metodica del phage display e la creazione di una nuova libreria di scFv sul fago litico T7.

MATERIALI E METODI

1. Apparecchiature e reagenti

L'amplificazione della libreria anticorpale scFv-VH è stata ottenuta da Libreria artificiale umana "Human Single Fold scFv Libraries Tomlinson I+J". Per l'estrazione del vettore T7 è stato utilizzato il kit Gigapack III Gold Packaging Extract della Stratagene seguendo il protocollo indicato.

Per la purificazione dei prodotti di PCR e del DNA successivamente digerito è stato utilizzato QUIAquick PCR purification Kit della Quiagen secondo procedura. Gli enzimi della Taq polimerasi e i reagenti per le reazioni di PCR sono state fornite dalla Promega. I Primers utilizzati nelle varie reazioni di PCR sono state forniti dalla Primm srl, l'anticorpo primario anti-T7 di coniglio coniugato alla perossidasi (HRP): HRP Conjugated Rabbit anti-T7 tag fornito dalla ICL lab., la soluzione di sviluppo della perossidasi è il 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) fornito dalla Sigma. Le reazioni di PCR sono state condotte in un Thermal Cycler Peltier PTC-200MJ Research (M-Medical, Genenco-Life Science).

La densità ottica dei vari campioni è stata misurata con un lettore ELISA SirioS, Radim. Le migrazioni elettroforetiche su gel di agarosio

colorati con bromuro di etidio sono state realizzate con apparecchiature Bio-Rad e analizzate mediante lo strumento “Gel Doc 2000”, della stessa ditta. Il packaging del DNA è stato effettuato con T7Select Packaging Kit della Novagen. Tutti i rimanenti reagenti sono stati acquistati dalle ditte Sigma, Promega e Biotools.

2. Reagenti di base

PBS (phosphate-buffer saline) **10x**: composizione per litro: NaCl 5,84 g, Na₂HPO₄ 4,72 g, NaH₂PO₄·2H₂O 2,64g, pH 7,2.

PBST: PBS contenente 0,1% TWEEN-20.

PBSM: PBS contenente 2% (PBSM 2%) o 5% (PBSM 5%) phosphate-buffer saline con latte in polvere a basso contenuto di grassi.

TBE: Tris-borato 45mM, EDTA 1mM pH8.3

PEG/NaCl: 20% polietilenglicole 6000, 2.5M NaCl

3. Terreni di coltura

I terreni di coltura impiegati sono i seguenti;

LB (Terreno Luria Bertani): usato per la crescita e il mantenimento del ceppo batterico composizione per litro: triptone 10 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 10 g.

SM (per 1 litro): NaCl 5,8g, MgSO₄ 2 g, TrisHCl 1M 50ml 1M pH 7.5

TOP AGAR (1 litro): sciogliere 10g di trypticase, NaCl 2,5 g, agar 6.5g.

Portare a pH 7.2 e aggiungere H₂O distillata quanto basta.

2xYT: utilizzato per la crescita di librerie fagiche anticorpali.

Composizione per litro: bacto-tryptone 16 g, estratto di lievito 10 g, NaCl 5 g.

4. Ceppi batterici

Sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici:

BLT5615: ceppo utilizzato per l'amplificazione del fago T7. Genotipo: F-ompT [lon] hsdSb (r_b-m_b-) gal dcm lac.

TG1Tr: (K12Δ (lac-proAB), supE, thi, hsdD 5/F', traD36, proA⁺ B, lacIq, lacZΔM15).

5. Libreria fagica anticorpale “Human Single Fold scFv Libraries Tomlinson I+J”.

Il costrutto codificante per gli scFv è clonato all'interno di un vettore pIT2 fornito dalla MRC Laboratorio di Biologia molecolare e dal

MRC Centro di ingegneria proteica (Cambridge, UK) distribuita da Geneservice.

Da questo costrutto siamo andati ad amplificare la nostra libreria scFv-VH, dopo opportuna preparazione che vedremo nel dettaglio in seguito.

Si tratta di due librerie anticorpali artificiali (Tomlinson I J) codificanti oltre 100 milioni di diversi frammenti scFV clonati in un vettore fagemide. Entrambe le librerie sono costituite da V_H(V3-23/DP-47 e J_H4b) e V_k (O12/O2/DPK9 e J_k 1) mediante una sequenza linker, per la costruzione della libreria sono stati utilizzati segmenti genici anticorpali tra quelli maggiormente rappresentati nel repertorio funzionale umano. La variabilità è stata ottenuta variando regioni CDR3. Questo vettore possiede un'origine di relicazione fagica M13 ori (che permette al vettore di essere impacchettato all'interno della particelle fagiche), l'origine di replicazione di E.Coli, coIE1 ori (rende capace il plasmide a replicarsi in cellule ospiti di E Coli). Presenta resistenza all'ampicillina (per la selezione delle colonie contenenti il vettore), un peptide leader peIB (per la secrezione della proteina fagica III fusa con il frammento anticorpale nella regione periplasmatica dei batteri) e il promotore Lac-Z (per la regolazione dell'espressione mediante induzione con IPTG, e inibizione con il glucosio). Il codone amber tra la sequenza Tag e la proteina fagica III fornisce la capacità di produrre l'anticorpo fuso con la proteina di

rivestimento del fago, utilizzando un ceppo soppressore di E. Coli, e di produrre anticorpi “solubili” esprimendo il vettore in un ceppo non soppressore. Inoltre la presenza di un myc-tag e di HIS tag sequenza di 6 istidine, che permette una rapida purificazione mediante opportuni reagenti “nickel-chelanti”. Questo vettore è stato utilizzato in precedenti esperimenti per selezionare in vitro anticorpi monoclonali ricombinanti in forma scFv diretti contro la proteina ubiquitina, utilizzando fagi filamentosi M13.

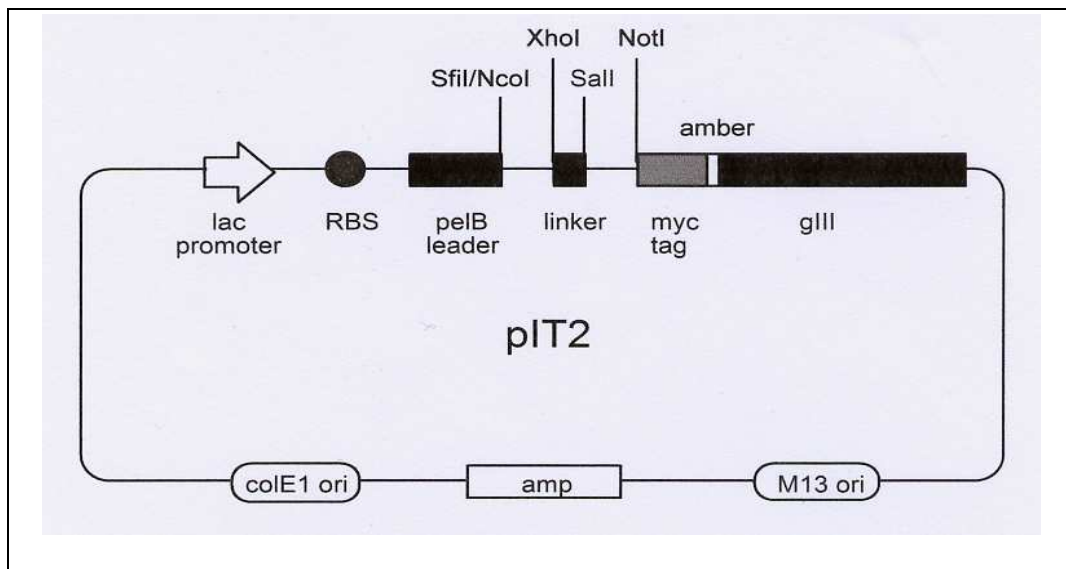


Fig 26: Mappa del vettore fagemide pIT2

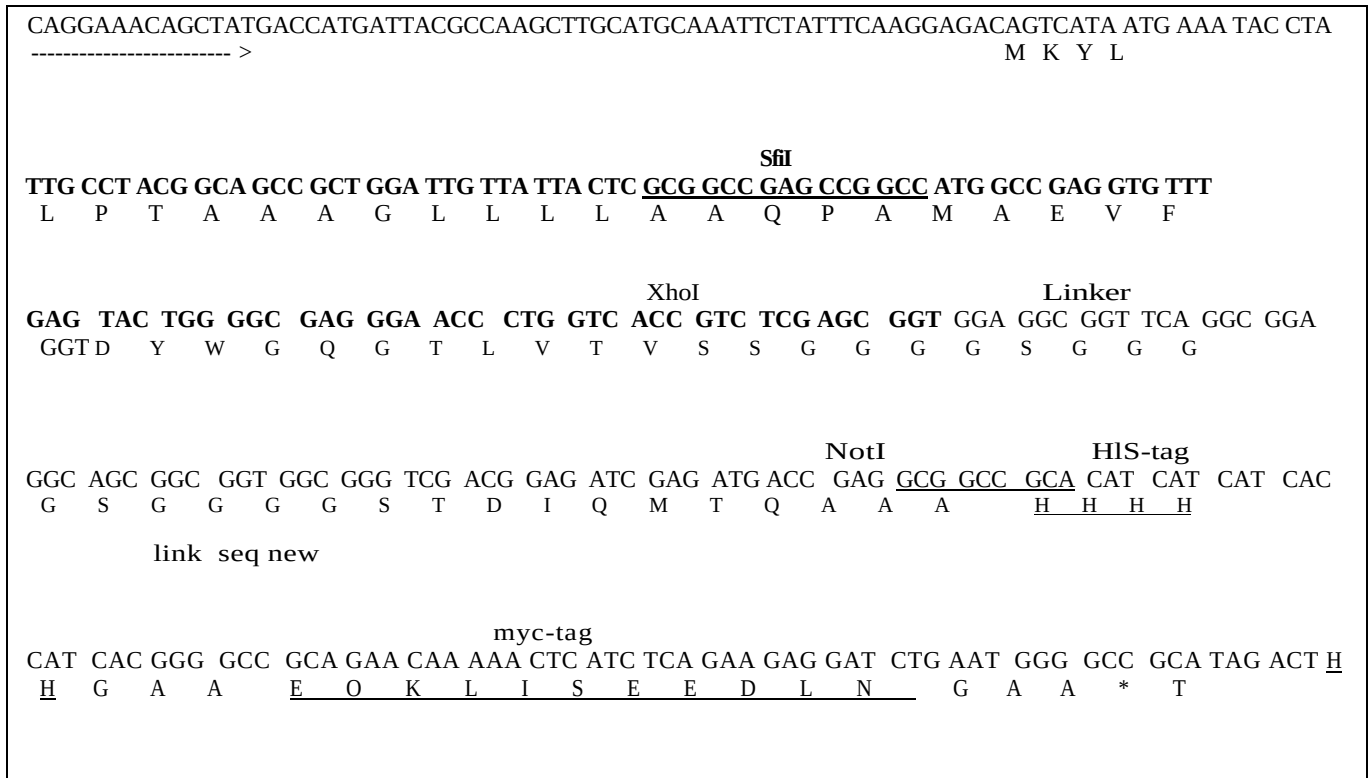


Fig 27: Regione di clonaggio del vettore Pit2

Sono stati disegnati opportuni primer per l'amplificazione della regione codificante ScFv-VH (in grassetto) aggiungendo i seguenti siti di restrizione:

Foward: 5'-GCAGCCG**GATCC**GCTGGATTGTTATTACTCGCGGCC-3'
(contenente sito di restrizione **BamHI**)

Reverse: 5'-AAG**GCGGCCG**CATCAACCGCCTCCACCGCTCGA-3'
(contenente sito di restrizione **NotI**)

6. Preparazione del costrutto da amplificare: crescita e concentrazione delle librerie

Allo stock di librerie J e I sono state inoculate in 200ml di terreno liquido 2xTY (sono state preparate ed utilizzate in parallelo le due librerie J I per massimizzare lo screening di selezione) pre- riscaldato contenete 100 µg /Amp 1% di glucosio, e lasciato a crescere in agitazione a 37°C per 3h fino ad una concentrazione in OD pari 0.4-0.5 (mediamente 2h).

50 ml della cultura batterica sono stati infettati con 50 µl di fago *helper* KM13 (Pharmacia) alla concentrazione di 10^{12} Tu/ml per 30 minuti a 37°C senza agitazione. I rimanenti 150ml sono stati poi recuperati per preparare uno stock secondario di entrambe le librerie (J I) e conservate a -80°C.

Dopo l'incubazione i batteri infettati sono stati centrifugati a 3000g per 10 min, i *pellet* sono stati risospesi in 100ml di terreno 2xTY contenente 100 µg/ml di Amp, 50 µg/ml di Kanamicina 0,1% di glucosio, ed incubate a 30 °C in agitazione ON.

Il giorno successivo le colture batteriche sono state spinnate a 3000g per 30 min ed i fagi presenti nel supernatante immediatamente concentrati in 20 ml di PEG/NaCl (20% polietilenglicole 6000, 2.5M NaCl) ben

miscelati, e lasciati in ghiaccio per 1h. e subito dopo centrifugate a 3.300g per 30 min.

I *pellet* sono stati risospesi in 20 ml di PBS e sottoposti ad un nuovo ciclo di concentrazione con PEG/NaCl (come sopra). Dopo un'ulteriore centrifugazione a 11600g per 30 min i *pellet* sono stati risospesi in 5ml di PBS, ed ulteriormente centrifugati a 11600g per 10 min per rimuovere i detriti batterici.

I fagi di entrambe le Librerie sono stati stoccati al -80°C ed valutati i titoli fagici. La Libreria J è stata utilizzata come costrutto per amplificare scFv-VH come descritto in seguito.

7. Amplificazione Libreria scFv-VH tramite PCR

L'amplificazione della libreria scFv-VH a partire dalla Libreria commerciale *Human Single Fold scFv Libraries Tomlinson J* opportunamente amplificata, è stata effettuata mediante PCR.

Reazione di polimerizzazione a catena (PCR), consiste nel susseguirsi di una serie di cicli identici, ciascuno caratterizzato da tre fasi a differente temperatura.

Nella prima fase la doppia elica del DNA viene denaturata alla temperatura di 95°C; nella seconda fase gli inneschi oligonucleotidici vengono fatti appaiare al DNA a singolo filamento, ad una temperatura scelta in base al grado di omologia tra gli inneschi e il DNA stampo e alla composizione in basi degli inneschi (in genere compresa tra 48°C e 70-72°C); nella terza fase l'elica complementare di DNA viene polimerizzata a 72°C a partire dall'innesco appaiato ad opera della *Taq* DNA polimerasi (DNA polimerasi termoresistente, derivata tramite ingegneria genetica, da *Termophilus aquaticus*).

Le tre fasi sono ripetute per numerosi cicli (25-30), per consentire l'amplificazione specifica di una sequenza di DNA compresa tra i 2 inneschi di un fattore 2^n , dove n indica il numero dei cicli.

L'amplificazione è stata ottenuta utilizzando le seguenti coppie di primers:

Forward: 5'-GCAGCC**GGATCC**GCTGGATTGTTATTACTCGCGGCC-3'

(contenente sito di restrizione **BamHI**)

Reverse: 5'-AAG**GCGGCCG**CATCAACCGCCTCCACCGCTCGA-3'

(contenente sito di restrizione **NotI**)

La miscela di reazione è stata eseguita in un volume finale di 50µl:

DNA templatato 50ng	2µl
dNTPs (10mM)	1µl
Buffer Gotaq (5x)	10µl
Foward (32µM)	1µl
Reverse (32µM)	1µl
GoTaq Polimerasi (Promega)	0.25µl
H2O sterile	fino a 50µl

Le condizioni di amplificazione sono state ottimizzate utilizzando una reazione di PCR a step dove le temperature di annealing (T_m o temperatura di Melting) crescono ad ogni ciclo, dai 48°C ai 72°C.

Reazione di PCR

- Denaturazione iniziale a 95°C per 5min.
- 25 cicli di: **denaturazione:** 30sec. (uguale per ogni ciclo)
annealing: T_m che varia da 72°C al primo ciclo fino ai 48°C dell'ultimo ciclo, **estensione:** di 40sec. a 72°C.
- Estensione finale di 10min. a 72°C.

I prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel d'agarosio al 2%, purificati per Ququick (Promega secondo protocollo) e nuovamente visualizzati su gel d'agarosio al 2% secondo modalità descritta in seguito.

8. Elettroforesi su gel d'agarosio

Per l'analisi dei prodotti di PCR sono stati preparati gel d'agarosio al 2% in tampone TBE (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM pH 8.3), sono stati sciolti 4g di agarosio in 200ml di tampone TBE 1x in forno a microonde fino ad aver ottenuto una soluzione limpida la quale è stata lasciata raffreddare a circa 60°C prima di aggiungere bromuro d'etidio (concentrazione finale 0,5µg/ml). La soluzione ancora calda è stata versata su apposito apparecchio sul quale è stato sistemato un pettine per la formazione dei pozzetti di caricamento. Il gel è stato lasciato raffreddare e a gelificazione avvenuta è stato estratto il pettine dal gel e collocato il vassoio in una camera elettroforetica contenente tampone di corsa TBE 1x.

Ai campioni da analizzare su gel è stato aggiunto un decimo del loro volume di colorante: glicerolo 6%, blu di bromofenolo 0,25%, SDS 0,02% (concentrazioni finali). È stato caricato uno standard di peso

molecolare DNA Ladder 100-1000pb. L'elettroforesi è stata condotta ad un voltaggio costante di 90 volts a T ambiente costante.

Dopo la corsa elettroforetica, il DNA viene reso visibile mediante trans illuminazione con raggi UV, per effetto della fluorescenza del bromuro di etidio che si intercala nella doppia elica . Le fotografie del gel sono state effettuate al Gel-Dok Bio-Rad.

La dimensione del prodotto di amplificazione atteso è di 350 pb circa.

9. Digestione degli amplificati scFv-VH

Viene digerito il DNA utilizzando una unità di enzima per gamma di DNA, effettuando due digestioni singole.

Prima reazione di digestione: enzima NotI

Templato (0,4 γ / μ l)	40 μ l
Buffer H	6 μ l
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.2 μ l
Enzima <u>NotI</u> (10U/ μ l)	2 μ l
H ₂ O	fino a 60 μ l

La reazione è stata lasciata a 37°C per un'ora e trenta

La digestione è stata controllata su gel di agarosio al 2% con un'ora di corsa a 90 volts. Il DNA digerito è stato purificato attraverso colonnine Quiaquick della Quiagen secondo procedura.

Seconda reazione di digestione: Enzima BamHI

Templato (0,32 γ / μ l)	35 μ l
Buffer E	6 μ l
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.2 μ l
Enzima <u>BamH</u> I (10U/ μ l)	1.5 μ l
H2O	fino a 60 μ l

La reazione è stata lasciata a 37°C per un'ora e trenta.

La digestione è stata controllata su gel di agarosio al 2% con un'ora di corsa a 90 volts.

10. Vettore utilizzato

Il vettore utilizzato per la libreria su T7 è stato acquistato dalla Novagen. Si tratta del T7Select 10-3b per l'esposizione di circa 5-15 copie di proteina del capsido gp10 ricombinante. Qui sotto viene

rappresentata la mappa del vettore e messo in evidenza il polylinker a valle del gene della gp10. I siti di clonaggio utilizzati sono stati NotI, BamHI (Fig 28).

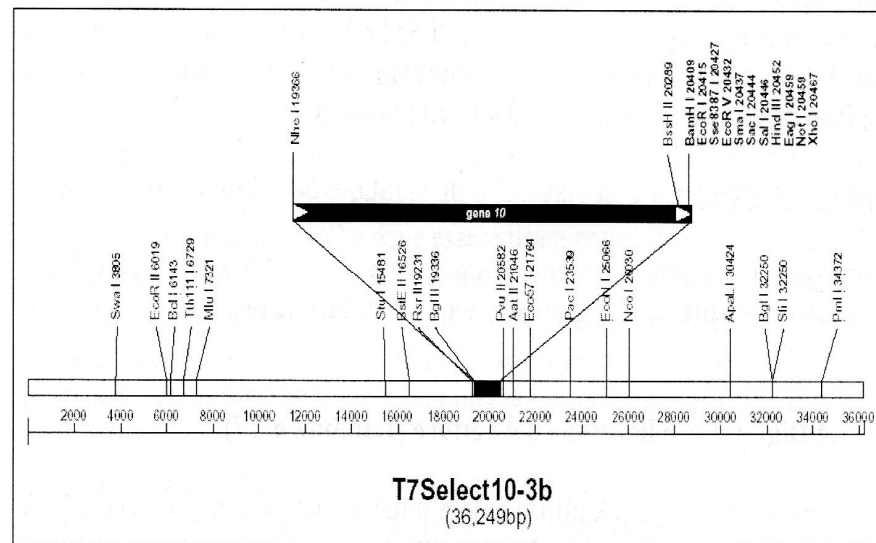


Fig 28: Regione di clonaggio del vettore T7 select10-3

11. Le cellule ospiti di T7: BLT5615

Si inoculano in 50ml di LB +ampicillina una colonia di BLT5615, si è fatto crescere in agitazione fino ad OD (densità ottica) 1 a 600nm, è stato aggiunto IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) per una concentrazione finale di 1mM e tenuto per 30 minuti a 37°C e successivamente infettati con il fago T7 fino a lisi completa. E' necessario indurre le BLT5615 con IPTG per consentire la produzione della proteina

del caspide gp10 da parte del plasmide presente nelle cellule batteriche. La stessa operazione è stata effettuata in 500ml di cultura di BLT5615; la sospensione di fagi T7 ottenuta è stata utilizzata per produrre circa 300-400µg di DNA del vettore T7Select10-3b.

Il DNA del vettore T7 è stato preparato seguendo le istruzioni contenute nel kit precedentemente menzionato. Prima della digestione il DNA è stato purificato aggiungendo 3V di Etanolo 90% e 1/10V di NaCl 3M e lasciato a 4°C O/N. Il DNA è stato infine lavato in etanolo 70% e risospeso in Tris-HCl 0.5M pH 8.

12. Digestione del vettore T7

E' stato digerito il DNA utilizzando 4 unità di enzima per gamma di DNA, effettuando due digestioni singole e lasciandole O/N.

<u>Digestione: enzima NotI</u>		<u>Digestione:enzima BamHI</u>	
DNA T7(10γ)	70µl	DNA T7(10γ)	70µl
Buffer H	9µl	Buffer E	9µl
Bovine Serum Albumin	0.9µl	Bovine Serum Albumin	0.9µl
Enzima NotI (10U/µl)	4µl	Enzima BamH (10U/µl)	4µl
H2O	fino a 90µl	H2O	fino a 90µl

Il DNA digerito è stato purificato con un passaggio in fenolo-cloroformio e precipitato in isopropanolo, infine è stato lavato in etanolo al 70%.

Le digestioni sono state controllate su gel di agarosio 0.8% con 4 ore di corsa a 90 volts.

13. Ligazione della libreria scFV-VH al vettore T7

Nella reazione di ligazione può essere utile utilizzare più vettore possibile fino ad un limite massimo tollerato nella successiva reazione di packaging (fino a 1 gamma in 5µl).

Il rapporto tra inserto/vettore utilizzato è stato di 60/1.

Reazione di ligazione

DNA T7 (140ng/µl)	4,3µl (600ng)
Ligasi (1-3U/µl)	1µl
Buffer ligasi 10X	1.3µl
Inserti (48ng/µl)	7.3µl (350ng)
H2O	0.1 µl

La reazione è stata lasciata O/N alla temperatura di 4°C.

14. Impacchettamento del DNA (packaging)

Il DNA viene impacchettato in particelle fagiche attive utilizzando un kit commerciale sopra menzionato, il quale contiene gli enzimi e le proteine del batteriofago necessarie alla formazione completa del capsido. Gli enzimi conservati a -80°C sono stati scongelati a temperatura ambiente (volume di $25\mu\text{l}$) e quindi sono stati aggiunti $5\mu\text{l}$ di reazione di ligasi del DNA fagico e dopo una leggera agitazione la reazione è stata lasciata incubare per due ore a 22°C .

La reazione è stata bloccata aggiungendo $270\mu\text{l}$ di LB+ $20\mu\text{l}$ di cloroformio.

Successivamente è stata calcolata la resa di reazione del packaging: $250\mu\text{l}$ di BLT5615 indotte da IPTG sono state infettate con aliquote di $10\mu\text{l}$ di supernatante fagico a crescenti diluzioni scalari. L'infezione è stata condotta in 3ml di TOP AGAR versato su piastra di LB Agar ed incubati a 37°C per 4 ore.

Contando il numero di placche in rapporto alla concentrazione di DNA utilizzato, la resa di reazione è stata di $4,3 \times 10^6$ placche per μg di DNA.

15. Amplicazione della Libreria

Prima del processo di “biopanning” è stato necessario amplificare la libreria.

Si è inoculata in 20ml di LB +ampicillina una colonia di BLT5615, si è fatto crescere in agitazione fino ad OD 0.6 (densità ottica a 600nm), è stato aggiunto IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) per una concentrazione finale di 1mM e tenuto per 30 minuti a 37°C.

La reazione di packaging è stata brevemente spinnata, eliminata la fase di cloroformio e utilizzata per infettare la cultura cellulare fino al lisi completa (5 ore a temperatura ambiente).

Il lisato è stato centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti e calcolato il titolo fagico come precedentemente descritto il quale è risultato essere di 10^6 placche per μ l di coltura lisata.

L’amplificato è stato conservato a 4°C ed utilizzato nelle seguenti reazioni di selezione.

16. Selezione

Sono stati incubati 70 µg di proteina ubiquitina bovina in PBS1X e lasciata adsorbire su pozzetti ELISA mediante *coating* a 4°C ON, con controllo negativo di solo PBSM.

Il giorno successivo dopo i tre lavaggi con di PBS 0.1% Tween20. i pozzetti sono stati riempiti e bloccati con PBSM 2% a RT per 2 h.

E' stata eliminata la soluzione di blocking ed effettuati 3 lavaggi PBS 1X

Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti circa 10^9 fagi in 100µl di SM, ed incubati 1 ora a 4°.

Il giorno seguente sono stati effettuati 10 lavaggi in PBS 0.1% Tween20.

Sono state aggiunte 300µl di BLT5615 e lasciate adsorbire a temperatura ambiente per 30minuti, fino ad ottenere il lisato fagico (il quale viene utilizzato per ripetere un nuovo ciclo di selezione)

Si sono eseguiti tre cicli di selezione seguendo le modalità descritte sopra, utilizzando i lisati fagici recuperati ad ogni ciclo di selezione i quali sono stati recuperati ed screenati su piastra, recuperando singole placche provenienti da batteri infettati con i fagi recuperati ad ogni ciclo di selezione.

17. Screening su piastra.

Una volta effettuato il processo di selezione i fagi T7 dovranno essere recuperati ed identificati.

A tale scopo si sono preparate alcune piastra di LB-Agar con 4ml di TOP AGAR (per piastre da 9cm) e cellule BLT5615 indotte e infettate dai lisati ottenuti dai diversi cicli di selezione (nella giusta quantità per ottenere circa 30-40 placche complessive) e lasciate incubare per 5 ore a 37°C.

Una volta formatesi le placche fagiche, queste sono state recuperate con una punta eppendorf e risospese in LB. L'LB è stato utilizzato in una reazione di PCR al fine di identificarne gli inserti e la complessità della libreria.

18. Screening delle placche fagiche tramite PCR

La tecnica di PCR descritta precedentemente ci permette di selezionare velocemente un gran numero di placche determinando la complessità della libreria e quindi la presenza e la grandezza dell'inserto d'interesse.

L'amplificazione è stata ottenuta utilizzando le seguenti coppie di primers (esterne al sito di clonaggio del vettore T7):

Foward: 5'-TCAAGGTTGCTAAGGACAACGT-3'

Reverse: 5'-AAACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'

PCR da placca fagica

dNTPs (10mM)	1µl
Buffer Gotaq (5x)	10µl
Foward (32µM)	1µl
Reverse (32µM)	1µl
GoTaq Polimerasi (5U/µl)	0.25µl
H2O sterile	fino a 50µl

Reazione di PCR

- Denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti
- 25 cicli di:
 - denaturazione:** 30sec.
 - annealing:** 30min. a 60°C ,
 - estensione:** 40sec. a 72°C.
- Estensione finale di 10 minuti a 72°C.

L'osservazione su gel di agarosio 2% delle PCR permette di evidenziare la presenza o meno di frammenti anticorpali differenti gli uni dagli altri. Tale differenza può essere successivamente confermata mediante un'analisi di sequenziamento del DNA.

19. Saggio ELISA

Introduzione: l'ELISA è un saggio il cui scopo è quello di accertare la presenza di un antigene o di un anticorpo specifico contro un antigene, che nel nostro caso è rappresentato dalla presenza degli anticorpi scFv-VH contro la proteina Ubiquitina.

E' un metodo molto comune e affidabile in quanto, se correttamente operato, fornisce una garanzia di successo variabile dal 90% al 95%. La grande disponibilità di anticorpi monoclonali, inoltre, rende l'esecuzione del test ELISA molto veloce.

Il test prevede l'adsorbimento dell'antigene sul fondo di una vaschetta di reazione nel nostro caso nel pozzetto di una piastra per ELISA della proteina Ubiquitina verso la soluzione contenete l'anticorpo, nel nostro caso rappresentato dai lisati fagici ottenuti dai vari cicli di selezione, rimozione dell'antigene in eccesso; saturazione dei siti liberi sulla superficie (in genere di materiale plastico) della vaschetta di

reazione con proteina non reattiva (albumina di siero bovino o latte scremato) per impedire l'adsorbimento dell'anticorpo alla superficie del pozzetto

Un'aliquota di una soluzione contenente l'anticorpo viene aggiunto al pozzetto. Dopo incubazione per permettere la formazione dell'eventuale complesso antigene-anticorpo (giallo), la soluzione che contiene l'anticorpo libero viene rimossa.

Incubazione con anticorpo secondario per la rivelazione del complesso antigene-anticorpo primario: che nel nostro caso è rappresentato dall'anticorpo anti-T7 coniugato con la perossidasi (l'anticorpo secondario è modificato e porta legato un enzima tipicamente perossidasi o fosfatasi alcalina). Allontanamento dell'anticorpo secondario in eccesso. L'anticorpo secondario formerà un complesso con l'anticorpo primario a sua volta associato alla nostra proteina.

Rilevazione del complesso antigene-anticorpo: aggiunta del substrato dell'enzima coniugato all'anticorpo secondario: si sceglie un substrato sintetico tale per cui il prodotto della reazione con l'enzima coniugato all'anticorpo secondario è colorato, che per la perossidasi è rappresentato dalla TMB: 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine, (tipicamente: giallo per lamfosfatasi alcalina o rosso per laperossidasi): la presenza del complesso antigene-anticorpo primario viene rilevata attraverso lo sviluppo del colore. L'intensità del colore dipenderà (a parità di tempo di

incubazione) dal numero di complessi presenti.

Risultati di un test ELISA: l'assenza del colore indica l'assenza del complesso antigene-anticorpo primario nel campione analizzato; l'intensità del colore giallo nei diversi pozzetti della piastra ELISA è proporzionale al numero di complessi antigene-anticorpo (primario) formati e quindi alla concentrazione dell'antigene (in grado di legare l'anticorpo primario) nel campione analizzato. Sono possibili schemi sperimentali diversi in cui in ogni reazione parallela si immobilizza lo stesso campione di antigene e si utilizzano campioni di anticorpi (primari) diversi. In questo caso lo sviluppo del colore e la sua intensità saranno misure della presenza di anticorpi primari in grado di riconoscere l'antigene e della loro concentrazione (o affinità per l'antigene).

Protocollo saggio ELISA: Le singole placche degli 8 campioni evidenziati per PCR sono state di nuovo utilizzate per rinfettare una cultura di BLT5615 opportunamente indotte da IPTG, fino a lisi completa e i corrispettivi lisati fagici utilizzati per il test ELISA.

E' stata incubata mediante *coating* a 4°C ON su pozzetti ELISA dell'ubiquitina in PBS 1X alla stessa concentrazione e nello stesso buffer utilizzato per le selezioni pari a 70 µg di proteina.

Il giorno successivo dopo 3 lavaggi con PBS, i pozzetti sono stati sottoposti a saturazione con 300µl di PBSM 2% per 2h a RT.

Sono stati effettuati 10 lavaggi in PBS 0.1% Tween20, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 300µl degli 8 eluati fagici e lasciati poi ad incubare in agitazione per 1h a RT. Successivamente sono stati eseguiti 10 lavaggi di PBS 0.1% Tween20.

Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 300µl di soluzione MPBS 2% HRP Conjugated Rabbit anti-T7 tag diluito 1:5000. La piastra è stata incubata 1 ora a RT e, dopo 10 lavaggi con 300 µl di PBS in ogni pozzetto sono stati aggiunti 150 µl di soluzione di sviluppo per la perossidasi l'HRP, il TMB 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine.

La reazione di sviluppo è stata bloccata aggiungendo 50µl per pozzetto di acido solforico 1M.

La OD ottenuta è stata misurata con un lettore ELISA (SirioS, Radim) a 620 nm e a 450 nm; il valore finale è stato ottenuto sottraendo la OD letta a 650nm da quella letta a 450nm.

RISULTATI

Lo scopo principale di questo lavoro è quello di poter offrire un contributo da un punto di vista metodologico nella selezione di particelle anticorpali sintetiche in modo rapido ed efficiente utilizzando una nuova libreria scFv-VH su vettore T7. Per effettuare una selezione di prova è stata utilizzata l'Ubiquitina bovina. È stata scelta questa proteina come antigene per il processo di selezione per avere un confronto con la selezione effettuata mediante fago filamentoso M13.

1. Amplificazione Libreria scFv-VH tramite PCR

Come primo passo si è amplificata una libreria anticorpale sintetica scFv-VH da vettore fagemide utilizzato per selezioni su fago M13.

Le librerie di partenza sono costituite da VH (V3-23/DP-47 e JH 4b) e Vk (O12/O2/DPK9 e Jk 1) unite mediante una sequenza linker, per la costruzione della libreria sono stati utilizzati segmenti genici anticorpali tra quelli maggiormente rappresentati nel repertorio funzionale umano. La variabilità è stata ottenuta variando regioni CDR3. L'amplificazione è stata ottenuta tramite PCR: la dimensione del prodotto di amplificazione atteso è di 350 pb circa come visibile dall'immagine sotto.

Marker 100-1000pb

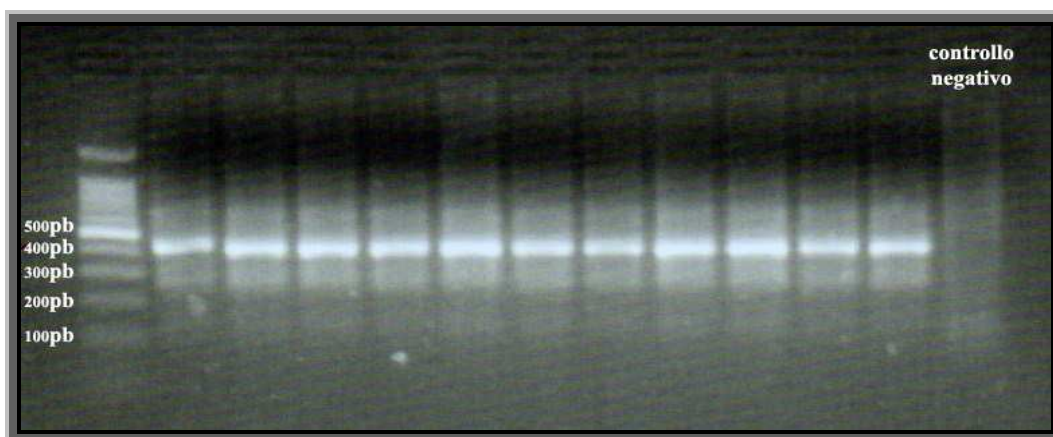


Fig 29: Separazione su gel d'agarosio al 2% dei prodotti di PCR dell'amplificazione della libreria scFv-VH.

2. Digestione della Libreria scFv-VH

I frammenti amplificati sono stati successivamente digeriti prima con l'enzima NotI e poi con l'enzima BamHI, per permettere poi di poter sub-clonare la libreria scFv-VH in vettore T7 opportunamente digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Per assicurare l'integrità del DNA sono stati analizzati sul gel d'agarosio al 2%.

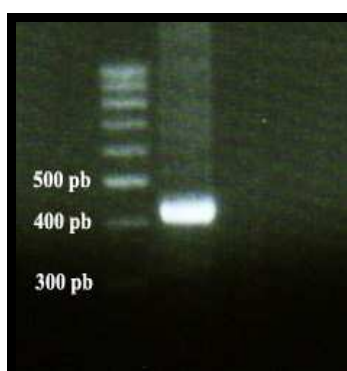


Fig 30: Separazione in gel d'agarosio al 2% della libreria scFv-VH dopo doppia digestione; con enzima di restrizione NotI, ed enzima di restrizione BamHI.

3. Digestione del vettore T7

Il DNA di T7 dopo essere stato opportunamente amplificato in cellule ospiti BLT5615, indotte con IPTG per consentire la produzione della proteina del caspide gp10, è stato estratto tramite un kit commerciale sopra menzionato, e purificato.

Successivamente è stato digerito tramite due digestioni enzimatiche separate, utilizzando gli stessi enzimi di restrizione utilizzati per la digestione della libreria scFv-VH.

La prima digestione con l'enzima di restrizione BamHI, la seconda digestione con l'enzima di restrizione NotI. Dopo le singole digestioni enzimatiche il DNA è stato purificato.

Sia le singole digestioni enzimatiche che la digestione completa del vettore sono state poi visualizzate su gel di agarosio al'0,8% dopo 4 ore di corsa.

Questo ci permette di visualizzare l'integrità dei prodotti ottenuti.

Marker lambda DNA/ HindIII Plus

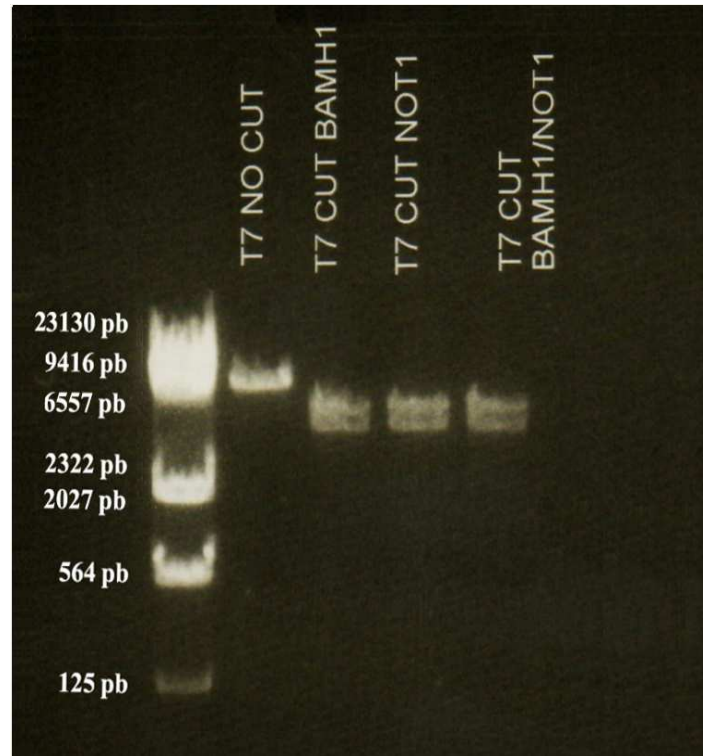


Fig 31: Separazione in gel d'agarosio all'0,8% del DNA di T7 integro, dopo digestione con enzima di restrizione BamH, dopo digestione con enzima di restrizione NotI, doppia digestione.

La lunghezza del DNA di T7 integro attesa è di 36201pb, nelle digestioni effettuate ci aspettavamo di vedere le due braccia del DNA separate dal taglio enzimatico cosa che è avvenuta com'è evidente dall'immagine.

4. Ligazione della libreria scFv-VH al vettore T7

Dopo avere amplificato, purificato e digerito opportunamente sia la libreria scFv-VH che in vettore utilizzato, si è cercato di individuare le migliori condizioni possibili di ligazione.

E' stato utile utilizzare più vettore possibile fino al limite massimo di concentrazione tollerato nella reazione di packaging. Sono stati successivamente testati diversi rapporti molar tra inserto vettore (300:1 200:1 150:1 90:1 60:1 15:1 9:1 3:1). Com' è possibile vedere dalla foto, il rapporto più vicino alle condizioni ottimali è quello di 60:1.

Marker100-1000pb

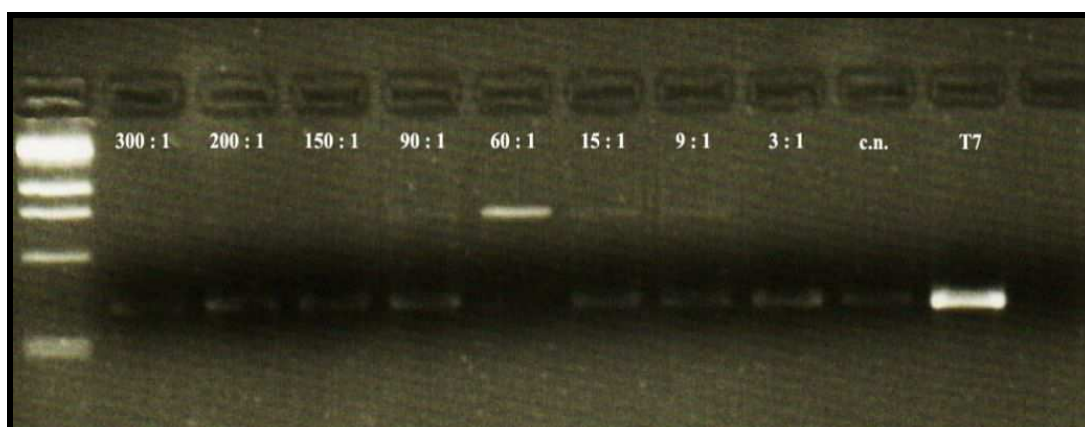


Fig 32: Separazione in gel d'agarosio al 2% dei prodotti di PCR delle reazioni di ligasi, tra libreria scFv-VH e vettore T7 a diversi rapporti molar (150:1, 100:1, 60:1, 15:1, 9:1, 3:1, 2:1, 1:1), controllo negativo, T7.

E' stato quindi utilizzato 600 ng di vettore (36Kbp di lunghezza) e 350 ng di inserto (0.35Kbp di lunghezza) e la reazione finale di ligazione è stata di nuovo controllata per PCR utilizzando primer esterni al vettore, per confermarne l'efficienza.

Nell'immagine sotto è possibile vedere in alto l'amplificazione della libreria e sotto il vettore T7 a conferma dell' avvenuta reazione di ligazione.

Marker 100-1000pb

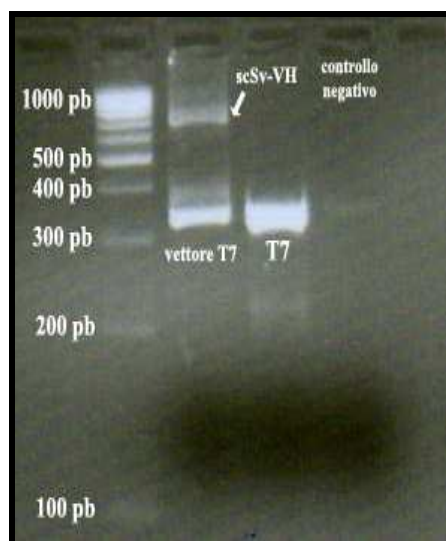


Fig 33: Separazione in gel di agarosio al 2%, dei prodotti di PCR della reazione di ligazione tra la libreria scFv-VH-vettore T7, vettore T7, controllo negativo.

5. Impacchettamento del DNA

La reazione di ligazione è stato successivamente impacchettata in particelle fagiche attive utilizzando un kit commerciale, contenente gli enzimi e le proteine del batteriofago necessarie alla formazione completa del capsido.

Fatto questo, è stata calcolata la resa di reazione del packaging: contando il numero di placche in rapporto alla concentrazione di DNA utilizzato. La resa di reazione è stata di $4,3 \times 10^6$ placche per μg di DNA e il numero finale di fagi presenti è pari a $2,58 \times 10^6$ (nella reazione sono stati utilizzati 650 ng di DNA).

6. Amplificazione della Libreria

Prima del processo di “biopanning” è stato necessario amplificare la libreria ottenuta. Una volta che il DNA è stato impacchettato in particelle fagiche, queste sono state amplificate attraverso l’infezione di cultura batterica di BLT5615 in fase esponenziale di crescita opportunamente indotte con IPTG.

Dal lisato ottenuto è stato calcolato il titolo fagico come precedentemente descritto che è risultato essere di 10^6 placche per μl di

cultura lisata. L'amplificato è stato poi utilizzato nelle reazioni di selezione.

7. Complessità della libreria.

Dalla libreria amplificata sono stati recuperati alcuni singoli fagi per picchettamento su piastra. Il DNA fagico è stato amplificato per PCR in corrispondenza dell'inserto VH. Di seguito è riportata l'immagine di separazione in gel d'agarosio dell'amplificazione degli inserti esposti dai fagi.

Marker100-1000pb

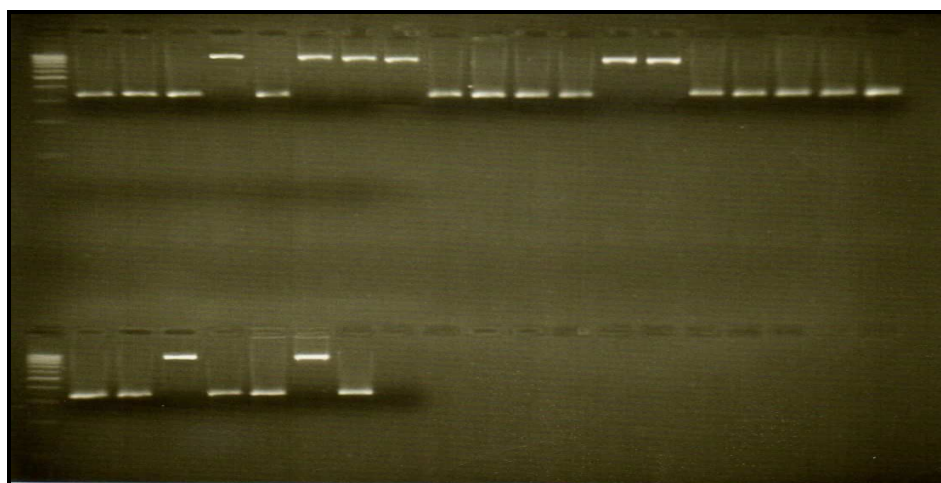


Fig 34: Separazione in gel d'agarosio dell'amplificazione degli inserti

Questo screening dà il numero di inserti presenti in libreria rispetto al fago vuoto, privo di inserti. Com'è visibile dal gel 8 cloni su 24 presentano inserti: il 30.7%. La complessità finale della libreria è quindi di circa di 0.79×10^6 fagi diversi

8. Il processo di selezione

Il processo di selezione su una libreria di fagi è composto da alcuni cicli ripetuti, 3 o 4 volte. Sostanzialmente i fagi di una libreria vengono messi a contatto con una qualsiasi molecola di cui si vogliono selezionare i possibili ligandi, che viene comunemente chiamata “esca” e che nel nostro caso è rappresentata dalla proteina ubiquitina immobilizzata su piastra ELISA mediante *coating* a 4°C ON.

I fagi che espongono sul caspide le molecole ricombinanti affini all'esca si legheranno ad essa e potranno essere separati dagli altri con semplici lavaggi in PBS. Successivamente potranno essere amplificati e riutilizzati nuovamente contro l'esca.

Il processo di amplificazione avviene tramite l'infezione di un ceppo batterico, le BLT5615, ed i lisati ottenuti utilizzati per gli ulteriori cicli di selezione.

La ripetizione del processo provoca un arricchimento dei fagi che legano l'esca rispetto agli altri fagi. Questi fagi potranno essere isolati e l'anticorpo ricombinante presente sul loro capsido identificato.

Abbiamo effettuato 3 cicli di dal 2° e dal 3° ciclo di selezione sono state fatte crescere su piastra diverse placche singole di T7 (isolamento singoli cloni).

Una ventina di queste sono state picchettate e re-infettate in BLT5615. Il lisato risultante è stato testato in saggio ELISA.

9. Saggio ELISA

La densità ottica ottenuta è stata misurata con un lettore ELISA (SirioS, Radim) a 620 nm e a 450 nm; il valore finale è stato ottenuto sottraendo la OD letta a 650nm da quella letta a 450nm.

LISATI FAGICI		1	2	3	4
/					
CICLO2	B	1.239	1.537	1.683	1.519
/	C				
CICLO2	D	1.281	1.947	1.763	1.602
/	E				
CICLO3	F	0.967	1.194	0.871	1.055
/	G				
CICLO3	H	1.407	1.566	<u>0.017</u> (CICLO ZERO)	<u>0.086</u> CICLO ZERO

Fig 35: La tabella riporta i valori ottenuti dal Test ELISA contro la proteina ubiquitina utilizzando come anticorpo primario i lisati fagici ottenuti al secondo e terzo ciclo di selezione e rivelati con anticorpo secondario anti-T7 marcato con la perossidasi. TMB come substrato di reazione. Il Ciclo Zero funge da controllo negativo. Ogni campione è riportato in doppio (campione 1: Lane B 1 e 2, campione 2: Lane B 3 e 4; campione 3 Lane D 1 e 2; campione 4: Lane D 3 e 4; campione 5: lane F, 1 e 2; campione 6: lane F 3 e 4; campione 7: lane H 1 e 2).

Come si vede in tabella, dei campioni analizzati 7 di questi hanno dato risultati positivi in ELISA 4 dal 2° ciclo (1-2B, 3-4B, 1-2D, 3-4D) e 3 dal 3° ciclo (1-2F, 3-4F, 1-2H).

Confermando l'efficienza della nostra libreria scFv-VH sull'isolamento di frammenti anticorpali specifici contro la proteina ubiquitina.

Un successivo sequenziamento dei cloni individuati ha confermato che si trattava di 5 cloni differenti (campione 1, 2, 3, 4, e 6).

DISCUSSIONE

Gli anticorpi rappresentano oggi i reagenti maggiormente utilizzati nella ricerca e nella sperimentazione clinica in qualità di interattori polivalenti. Il citoplasma cellulare essendo caratterizzato da condizioni riducenti e dall'assenza di proteine che assistono il ripiegamento molecolare, costituisce un ambiente sfavorevole per tutte le molecole naturalmente destinate alla secrezione come gli anticorpi. Questo limite riguarda anche gli anticorpi ricombinanti in formato scFv che, nel compartimento citoplasmatico, non riescono a costituire i due ponti disolfuro intracatena, uno per ogni dominio, e risultano pertanto non funzionali e soggetti a degradazione.

Diverse strategie sono state sviluppate per ovviare ad alcuni di questi inconvenienti. Una di queste, la "Intracellular Antibody Capture Technology" (IACT), si basa sul sistema del doppio ibrido (Shiono H. et al. 2003) per l'isolamento di scFv di interesse.

In questa tecnica, l'interazione intra-cellulare tra due proteine ibride, un antigene fuso ad un dominio di legame al DNA (LexA o Gal4) ed un anticorpo (scFv) fuso ad un dominio di attivazione trascrizionale (B42), ricostituisce un complesso trascrizionale in grado di attivare

l'espressione di specifici geni marcatori. La IACT è stata utilizzata per il clonaggio di anticorpi intra-cellulari funzionali (Sohnlein P. et al. 2000; Theien BE. et al. 2003).

Altri metodi sono stati oggi sviluppati per permettere un “fold” adeguato, come ad esempio l'eliminazione dei legami disolfuro tramite modificazione dei CDR all'interno di scFv intracellulari (Desiderio A. et al., 2001).

E' evidente che la messa a punto di tecnologie per l'utilizzo degli intrabody contro proteine target per applicazioni genomiche è una questione di notevole importanza.

Gli intracorpi possono interagire all'interno delle cellule in diverse modalità (Cattaneo A., Biocca S. 1999). Ad esempio, possono bloccare l'interazione tra due proteine o tra una proteina e gli acidi nucleici (Bai J. et al., 2003).

Inoltre è possibile progettare intracorpi in grado di spostarsi all'interno della regione subcellulare, sintetizzando particelle anticorpali che leghino segnali di localizzazione cellulare. Alcuni esempi:

- il segnale di localizzazione nucleare (NLS) permette alla particella anticorpale di spostarsi all'interno del nucleo;
- segnale per trattenere la proteina nel RE è data dalla sequenza KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu);

- il segnale per la destinazione ai perossisomi è rappresentato da una sequenza c-terminale SKL (Ser-Lys-Leu) (Cattaneo A., Biocca S. 1999).

Gli intracorpi inoltre possono inibire direttamente la funzione di un enzima (Levy-Mintz P. et al., 1996; Goncalves J. et al 2002) o promuovere la morte cellulare inducendo l'attivazione della via della caspasi-3 (Tse E., Rabbitts TH. 2000).

Diversi studi descrivono le applicazioni oggi adottate in campo medico che sfruttano anticorpi. Tra i potenziali approcci nel trattamento dell'HIV troviamo sicuramente gli inibitori dell'assorbimento del virus, attraverso l'attacco da parte delle molecole anticorpali ad una delle due sub-unità della proteina facente parte dell'involucro virale che media il processo di fusione tra la membrana cellulare e quella virale (le due sub unità sono gp120 e gp 41). L'attacco alla subunità gp120 ha evidenziato un blocco della propagazione della particella virale (Marasco WA. 1998). Simili approcci sono stati utilizzati per impedire la replicazione virale attraverso l'attacco di un fattore virale d'infezione Vif, il quale impedisce la retrotrascrizione del genoma virale (Goncalves J. et al 2002).

Studi recenti sono stati mirati all'utilizzo di scFv a singolo dominio VH per applicazioni terapeutiche. Questi studi sono mirati a migliorare la stabilità e la solubilità degli scFv a livello intracellulare.

Sono stati sintetizzati anticorpi non convenzionali formati da un insieme di combinazioni provenienti dalle sub-unità corrispondenti alle catene leggere degli anticorpi di diverse specie animali (cammello dromedario e lama). Questi sono formati da un singolo dominio molto piccolo VHH (11-15 kDa) e gli amminoacidi idrofobici normalmente coinvolti nel link tra la catena pesante e quella leggera sostituiti da un amminoacido idrofilico, aumentandone la solubilità. Sono prodotti in modo molto rapido, ed esperimenti in vitro confermano la bassissima tendenza a formare aggregati.

Recenti approcci hanno ampliato la generazione dei domini VH (Wirtz P., Steipe B. 1999) diretti proprio contro la proteina virale d'infezione Vif. Questi studi hanno dimostrato che tutti i domini VH anti-Vif sono in grado di preservare la loro attività e specificità anche in assenza del dominio VL. La loro solubilità è stata migliorata anche in questo caso mutando sequenza amminoacidica della superficie idrofobica generalmente coperta dal dominio VL, aumentando la neutralizzazione del processo infettivo.

Tali ricerche ci confermano come l'utilizzo di domini VH mantengano alti i livelli di espressione intracellulari rendendo queste molecole potenzialmente utili come intracorpi, migliorandone così la stabilità, solubilità e l'emivita in ambiente citoplasmatico (Aires da silvia F. et al 2004).

Nella terapia del cancro gli intracorpi sono stati utilizzati per modulare l'espressione di diverse proteine: come la sovra-espressione della erbB-2, riscontrata sia nel tumore al seno che alle ovaie (Alvarez RD. 2000; Graus-Porta D. 1995); del recettore α dell'interluchina-2 in alcune leucemie (Richardson JH. et al., 1995; Richardson JH. et al., 1998); della ciclina E (regolatore del ciclo cellulare che influenza il comportamento delle cellule tumorali della mammella) nei tumori al seno (Strube RW., Chen SY. 2002); e del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) coinvolto nel cancro dell'epitelio (Hyland S. 2003).

La terapia mediante l'utilizzo degli intracorpi è rivolta anche a patologie neurodegenerative come Alzheimer's e Parkinson, oltre a patologie causate da mutazioni proteiche o agenti infettanti. Per esempio, scFv sono stati prodotti contro l'huntingtina, la quale è una proteina che se mutata causa la Corea di Huntington (HD) (Lecerf JM. 2001) e contro la proteina Tau coinvolta nella malattia dell'Alzheimer's (Visintin M. et al., 2002).

Gli "intrabodies" possono inoltre essere impiegati per l'identificazione e la localizzazione di proteine *in vivo* oltre che per interferire con specifiche funzioni proteiche correlate a condizioni fisiopatologiche di interesse. Dall'analisi dell'interazione anticorpo-antigene è inoltre possibile ottenere informazioni biochimiche dirette sulla proteina riconosciuta e sui suoi partner di legame.

La tabella sotto riporta le applicazioni di maggior rilievo degli intrabody.

TARGET ANTIGEN	scFv APPLICATION
AIDS	
gp120 (HIV-1 envelope protein)	Inhibition of viral envelope formation by retaining the gp120 precursor in the endoplasmic reticulum (ER)
Tat (HIV-1 transcription activator)	Inhibition of viral replication by sequestering Tat in the cytoplasm
CCR5 (chemokine receptor required for virus entry)	Protection of T cells against HIV-1 infection by preventing CCR5 surface expression
HIV-1 reverse transcriptase	Inhibition of viral double-stranded DNA synthesis
HIV-1 integrase	Prevention of viral DNA chromosomal integration by neutralizing integrase
Rev (regulator of viral genes)	Inhibition of HIV-1 replication by blocking Rev function
Vif (viral infectivity factor)	Prevention of HIV-1 infectivity and reverse transcription by functional deletion of Vif
hCyclin T1 (subunit of the transcription elongation factor complex)	Inhibition of HIV-1 replication by disrupting the molecular interaction between Tat and hCyclin T1
Human tumours	
RAS (frequently mutated signal transduction protein)	Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis <i>in vitro</i>
erbB-2 (epidermal-growth-factor receptor)	Suppression of erbB-2 expression on the cell surface
IL-2R α (α subunit of interleukin-2 receptor)	Downregulation of IL-2R α in T- and B-cell leukaemias by abrogating cell surface expression
p53 (tumour suppressor protein)	Restoration of the mutant p53 transcriptional activity, to trigger apoptosis and stop tumour progression
Cyclin E (cell cycle protein)	Inhibition of the growth of breast cancer cell lines by blocking cyclin E function
EGFR (epidermal-growth-factor receptor)	Inactivation of the transforming potential of EGFR by preventing its transit to the cell surface
Other diseases	
Huntingtin (protein responsible of Huntington's disease)	Inhibition of aberrant protein aggregation in a cellular model for Huntington's disease, by targeting huntingtin to the nucleus
MHC heavy chain (major histocompatibility complex class I)	Phenotypic knockout to avoid rejection of keratinocyte allografts by retaining MHC class I in the ER

Fig 36: Applicazioni terapeutiche degli intrabody

Per molti scopi applicativi è quindi di fondamentale importanza ottenere anticorpi stabili e solubili in ambiente citoplasmatico. Oggi sono state applicate strategie di evoluzione basate sulla mutagenesi casuale di un frammento scFv con buona affinità per l'antigene bersaglio, ma con bassa stabilità molecolare.

Il repertorio risultante è quindi sottoposto a selezione in condizioni opportune per riuscire ad ottenere frammenti con aumentata stabilità rispetto al frammento di origine. Le tecniche di selezione adottate a questo scopo si basano su *biopanning* su fago, *ribosome display*, o *yeast display*.

Nel nostro lavoro si è amplificata una libreria scFv-VH e clonata nel vettore fagico T7Select10-3 del fago T7. Si è cercato di creare una valida alternativa di screening rispetto all'utilizzo di fagi filamentosi e allo stesso tempo di effettuare la selezione in condizioni stringenti che promuovessero la selezione di anticorpi particolarmente stabili.

E' stato amplificato il solo dominio VH (scFv-VH) in quanto è stata dimostrata la sua efficienza e validità come potenziale intracorpo.

Nel ciclo replicativo del fago filamentoso le proteine esogene espresse sul capsido del fago vengono formate al di fuori della membrana plasmatica del batterio ospite, che dovranno poi successivamente attraversare durante la sua formazione. Questo fa sì che non ci sia un contatto diretto con l'ambiente intracellulare, inoltre questa caratteristica fa in modo che ogni peptide o proteina per la sua proprietà previene l'attraversamento del doppio strato lipidico bloccando la formazione della particella fagica.

Per questo si è pensato di sviluppare un sistema di selezione sfruttando il ciclo litico del fago T7.

In questo caso una volta che il fago aderisce alla parete del batterio inietta all'interno il suo DNA utilizzando la sua coda flessibile e permettere poi una cascata di eventi che porta alla formazione delle particelle fagiche all'interno della cellula ospite, e quindi le proteine espresse sul capsido sono a contatto con l'ambiente citoplasmatico, permettendo una prima selezione delle proteine o peptidi instabili e soggetti a degradazione. Questo processo prosegue poi con la lisi cellulare e la liberazione della progenie fagica.

Gli anticorpi della nostra libreria vengono quindi formati all'interno della cellula in condizioni riducenti. E' probabile che la percentuale di questi dotata di bassa stabilità perda la propria conformazione nativa (processo di unfold) e che quindi sia naturalmente esclusa dalla libreria anticorpale. Questo aspetto potrà essere meglio approfondito e messo in evidenza negli studi successivi.

Nel nostro lavoro abbiamo potuto comunque dimostrare che la selezione anticorpale sul fago T7 è efficiente ed è stato messo a punto un protocollo di selezione in grado di portare gli stessi risultati della metodologia tradizionale su M13, ma in metà tempo.

Le strategie di selezione utilizzate per l'isolamento dei scFv-VH hanno infatti permesso di identificare 7 cloni positivi all'ubiquitina.

Questo risultato rappresenta un risultato uguale, se non migliore, a quello ottenibile in uno screening standard su M13, dove, da diverse prove effettuate, normalmente si ottengono 4-5 cloni positivi.

CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI

Gli studi qui riportati e discussi dimostrano che da una libreria fagica anticorpale come quella utilizzata in questo studio sia possibile isolare attraverso procedure in *vitro* anticorpi monoclonali in tempi molto rapidi. E' stato possibile testare la loro validità contro un solo antigene, tuttavia dai dati ottenuti sarebbe interessante testarne la loro efficienza su differenti tipologie di antigeni e approfondire lo studio sul loro grado di stabilità.

Da evidenziare infine i grandi passi avanti fatti dall'ingegneria genetica in merito alla quale negli ultimi anni ha permesso di poter isolare e manipolare con estrema semplicità il gene per gli scFv, permettendo quindi la costruzione di una grande varietà di proteine di fusione le quali, in virtù della loro specificità anticorpale, possono veicolare su cellule, tessuti bersaglio, enzimi, citochine e tossine, tutto questo ha permesso di aprire canali importanti su diversi fronti sia diagnostici che applicativi, nonché un nuovo modo di produrre anticorpi.

BIBLIOGRAFIA

Adams GP., Schier R., McCall AM., Crawford RS., Wolf EJ., Weiner LM., Marks JD. Prolonged in vivo tumor retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Brit J Cancer*. **77**, 1405-1412 (1998).

Adorini L., Gregori S., Harrison LC. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *TrendsMol Med*. **8**, 31-38 (2002).

Agterberg M., Adriaanse H., Tommassen J. Use of outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant to the cell surface of Escherichia Coli k-12. *Gene*. **59**, 145-50.

Aires da silvia F., Santa maria M., Freitas-Vieira A., Mascarenhas p., Barahona I., Moniz-pereira J., Gabzda d., Goncalves J. Camelized rabbit-derived Freitas-Vieira A. single-domain intrabodies against Vif strongly neutralize HIV-1 infectivity. *J.Mol.Bio*. **340**, 525-42 (2004).

Albert B., Johnson A., Jonson A., Lewis J., Raff M., Robert K., Walter P. *Molecular Biology of the cell.* **1475**, 1-11; 26-30. Zanichelli editore S.p.A. (2002).

Alvarez RD. et al. A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res.* **6**, 3081-87 (2000).

Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS let.* **414**, 521-526 (1997).

Atwell J., Breheny KA., Lawrence LJ., McCoy AJ., Kortt AA., Hudson PJ. ScFv multimers: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng.* **12**, 597-604 (1999).

Bai J. et al. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies. *J. Biol. Chem.* **278**, 1433-42 (2003).

Barbas CF. 3rd., Kang As., Lerner RA., Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc.Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 7978-7982 (1991).

Bei R., schlom J., Kashmiri SV. Baculovirus expression of functional single-chain immunoglobulin and its IL-2 fusion protein.J. Immunol.Methods.**186**, 245-255 (1995).

Bhat TN., Bentley GA., Boulot G., Greene MI., Tello D., et al. Buond water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1089-93 (1994).

Biocca S., Cattaneo A. Intracellular immunization antibody targeting to subcellular compartment. *Trends Cell Biol.* **5**, 248-252 (1995).

Bird RE., Hardman KD., Jacobson JW., Johnson S., Kaufman BM., Lee SL., et al. Single chain antigen bonding protein. *Science.* **6**, 242-43 (1988).

Blazek D., Celer V. Institute of Microbiology and Immunology. Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary and Pharmaceutical University.Palackeho Czech Republic **1/3**, 612-42Brno.

Braden BC., Golden ER., Mariuzza RA., Polijk RJ. Anatomy of an antibody molecule: structure, kinetics, thermodynamics and mutational studies of the antilysozyme antibody D1.3. *Immunol.Rev.* **163**, 45-57 (1998).

Bruggemann M., Taussig MJ. Production of human antibody repertoires in transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 4:455-8 (1997).

Cai X., Garen A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cell: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 6537-6541 (1995).

Catalano CE., Cue D., Feiss M. Virus DNA packaging: the strategy used by phage lambda. *Mol Microbiol.* **16**, 6 1075-86 (1995).

Cattaneo A., Biocca S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol.* **17**, 115-121 (1999).

Cesareni G., Castagnoli L., Castra G. Phage displayed peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen.* **2**, 1 :1-17 (1999).

Chalmers MJ., Gaskell SJ. Advances in mass spectrometry for proteome analysis. *Curr Opin Biotechnol.* **11**, 4 384-90 (2000).

Charlton K., Harris WJ., Porter AJ. The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 639-649 (2001).

Clackson T., Hoogenboom HR., Griffith AD., Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* **352**, 624-628 (1991).

Condron BG., Atkins JF., Gesteland RF. Frameshifting in gene 10 of bacteriophage T7. *JBacteriol.* **173**, 21 6998-7003 (1991).

Conrad IL, Fiedler U.: Expression of engineered antibodies in plant cells. *Plant Mol. Biol* **26**, 1023-1030 (1994).

Cramer R., Suter M. Display of of biologically active proteins on the surface of filamentous phage a Cdna cloning production. *Gene.* **137**, 1 69-75 (1993).

Davis GT., Bedzyk WD., Voss EW., Jacobs TW.: Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells. *Biotechnology (NY)*. **9**, 165-169 (1991).

Dente L., Cesareni C., Cortese R. Pempl: a newfamily of single stranded plasmids. *Nucleic. Acid Res.* **11**, 6 1645-55 (1983).

Desiderio A. et al. A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold. *J. Mol. Biol.* **310**, 603-615 (2001).

Dunn IS. *Gene*. **183**, 15 (1996).

Feldhaus MJ., Siegel RW., Opresko LK Coleman JR., Feldhaus JM., Yeung YA., et al. Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotechnol.* **21**, 2 163-70 (2003).

Fromont-Racine M., Rain CJ., Legrain P. Toword a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Gent.* **16**, 3 277-82 (1997).

Garrard LJ., Henner DJ.. Selection of an anti-IGF-1 Fab from a Fab phage library created by mutagenesis of multiple CDR loops. *Gene*. **128**, 1 103-9 (1993).

Georgiou G, Poetschke HL., Stathopoulos C., Francisco JA. Practical applications of engineering gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol.* **11**, 1 6-10 (1993).

Georgiou G. Stathopoulos C., Daugherty PS., Nayak AR., Iverson BL., Curtiss. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat.Biotechnol.* **15**, 29-34 (1997).

Goncalves J., Silvia F., Freitas-Vieira A., Santa marta M., Malho R., Yang X. et al. Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunizzazione inhibits reverse transcription and viral replication. *J Biol. Chem.* **277**, 32036-45 (2002).

Gottesman M. Bacteriophage lambda: the untold story. *J Mol Biol.* **293**, 2 177-80 (1999).

Graus-Porta D. et al. Single –chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol.cell. Biol.* **15**, 1182-91 (1995).

Griffiths AD., Duncan AR. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 102-108 (1998).

Gunneriusson E. Samuelson P., Uhlen M., Nygren PA., Stahl S. Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci. *J Bacteriol.* **178**, 5 1341-6 (1996).

Hanes J., Pluckthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Prc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 4937-4942 (1997).

Hanes J., Schaffitzel C., Knapping A., Pluckthun A. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naïve library selected and evolved by ribosome display. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1287-92 (2000).

Hanes K., Schaffitzel C., Knappik A. picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naïve library selected and evolved by ribosome display. *Nat.Biotechnol.* **18**, 1287-1292 (2000).

Hogenboom HR. Designing and optimizing library selection strategies for generating high affinity antibodies. *Trend Biotechnol.* **15**, 2:62-70 (1997).

Hohn T., Wurtz M., Hohn B. Capsid transformation during packaging of bacteriophage lambda DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **276**, 943 51-61 (1976).

Hoogenboom HR., Marks Jd., Griffiths AD., Winter G. bulding antibodies from their genes. *Immunol Rev.* **130**,41-68 (1992).

Hudson PJ. Recombinant antibody fragments. *Curr Opin Biotechnol.* **9**, 4 395-402 (1998).

Huston JS., George AJ., Adams GP., staffordWF., Jamar F., Tai MS., McCartey JE., Oppermann H., Heelan BT., Peters AM., Houston LL., Bookman MA., Wolf EJ., Weiner LM. Single-chain Fv radioimmunotargeting. *Q .J. Nucl. Med.* **40**, 320-333 (1996).

Huston, JS., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M., Novotny J., Margolies MN., Ridge RJ., Bruccoleri R., Haber E., Crea R., Oppermann H. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery

of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **85**, 5879-5873 (1998).

Hyland S. et al. Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragment inhibits meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 422-427.

Il'ichev AA. Et al. Production of viable variant of the M13 phage with a foreign peptide inserted into the basic coat protein. *Dokl Akad Nauk SSSR*. **307**, 2 481-83 (1989).

Jost CR., Kurucz I., Jacobus CM., Titus JA., George AJ., Segai DM. Mammalian expression and secretion of functional single-chain Fv molecules . *J. Biol. Chem.* **269**, 26267-26273 (1994).

Jun S., Honegger A., Oluckthun A. Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol.Biol.* **294**, 163-180 (1999).

Kerrm YF., Hung Lee., Cristopher Hall J. Emerging trend in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies. *Biotechnology Advances*. **21**, 599-637 (2003).

Kewalramani R, Singh AK. Immunopathogenesis of lupus and lupus nephritis: recent insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11**, 273–277 (2002).

Kohler G., Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**, 495-497 (1975).

Kratz PA., Bottcher B., Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**, 1915-20 (1999).

Kuby J. New York Freeman. *Immunology*. 664 (1997).

Lecierf JM. Et al Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 4764-69 (2001).

LeGall F., Kipriyanov SM., Moldenhauer G. Little M. Di-Tri and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on binding. *FEBS lett.* **453**, 164-168 (1999).

Legrai PJ., Wojcik Gauthier JM. Protein-protein interaction maps: a lead toward cellular functions. *Trends Genet.* **17**, 6 346-52.

Levy-Mintz P. et al. Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* **70**, 8821-32 (1996).

Lewin B. *Genes VI*. United States by Oxford University Press. Inc. New York (1997).

Lewin B. *IL Gene VI*. **33**, 369. Zanichelli editore S.p.A. (1999).

MacKenzie CR. The role of valency in the selection of anti-carbohydrate single-chain Fvs from phage display libraries. *J Immunol Method.* **220**, 39-49 (1998).

Marasco WA. et al. Intracellular antibodies against HIV-1 envelope protein for AIDS gene therapy. *Human gene Ther.* **9**, 1627-42 (1998).

Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization-human antibodies from Vgene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* **222**, 3:581-7 (1991).

Marks JD., Hoogenboom HR., Griffiths AD., Winter G. Molecular evolution of proteins of filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem.* **267**, 23 16007-10 (1992).

Martino G., Adorini L., Rieckmann P., Hillert J., Kallmann B., Comi G., Filippi M. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol* **1**, 499-509 (2002).

Maruyana IN., Maruyana HI., Brenner S. Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 8273 (1994).

Mc Cafferty J. Phage display: factors affecting panning efficiency. In: Kay BK, Winter J. editor. Phage display of peptide and proteins. *San Diego: Accademic Press.* 261-76 (1996).

McCafferty J., Griffiths AD., Winter G., Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. **348**,6301 552-4 (1990).

Mikawa YG., Maruyama IN., Brenner S. Surface display of proteins on bacteriophage lambda heads. *J Mol Biol*. **262**,1 21-30 (1996).

Model M., RM. The bacteriophages. *Plenum Press*. 375-456 (1988).

Munro S., Pelham HR. C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. **48**, 899-907 (1987).

Orlandi R., Gussow DH., Jones PT., Winter G. Cloning Immunoglobulin variable domains for expression by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**, 3833-7 (1989).

Padmanabhan R., Padmanabhan R., Howard T., Gottesman MM., Howard BH. Magnetic affinity cell sorting to isolate transiently transfected cells, multidrug-resistant cells, somatic cell hybrids, and virally infected cells. *Methods Enzymol*. **218**,637-51 (1993).

Palzkill T., Huang W., Weinstock GM. Mapping protein- ligand interaction using whole genome ohage display libraries. *Gene*. **221**,1 79-83 (1998).

Parmeley SF., smith GP. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol*. **251**, 215-8 (1989).

Parmely SF., Smith GP. :Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. **73**, 305-318 (1988).

Pini A., Viti F., Santucci A., Carnemolla B., Zardi L., Neri P., Neri D. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem*. **273**,34 21769-76. (1998).

Rader C., Barbas III CF. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol*. **8**,4 503-8 (1997).

Rasched I., Oberer E. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol Rev*. **50**, 4 401-27 (1985).

Ren Z, Black LW. Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid. *Gene. Jul.* **30**; 215 2:439-44 (1998).

Richardson JH. et al. Intrabody mediated knockout of the high-affinity IL-2receptor in primary human T cell using a bicistronic lentivirus vector. *Gene Ther.* **5**, 635-644 (1998).

Richardson JH. et al. Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the α subunit of the receptor. *Proc. Natl. Sci. USA.* **92**, 3137-41 (1998).

Robert RW., Ja WW. In vitro selection of nucleic acids and proteins: what are we learning?. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 521-9 (1999).

Rosemberg A., Studier w., McCormick M., Berg J., Novy R., Mierendorf R. T7 Select phage Display System: a powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Innovations.* **6** (1996).

Russel M. Mutant at conserved positions in gene IV, a gene required for assembly and secretion of filamentous phage. *Mol. Microbiol.* **14**, 2 357-69 (1994).

Russel PJ. Genetics. V edition The Benjamin Cumming Publishing company. *Inc.* **240**, 6 (1998).

Samuelson P., Gunneriusson E., Nygren P., Stahl S. Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol.* **96**, 129-54 (2002).

Santi E., et al. bacteriophage lambda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics. *JMol. Bio.* **296**, 2 497-508 (2000).

Sheets MD., Amersdorfer P., Finnern R., Sargent P., Lindquist E., Schier R., Hemingsen G., Wong C., Gerhart JC., Marks JD., Lindqvist E. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6157-6172 (1998).

Shiono H. et al. Scenarios for autoimmunization of T and B cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* **998**, 237-56 (2003).

Siracusano A., Ortona E., Tombesi M., Cianfriglia M. Metodologi di genetica cellulare somatica per l'ottenimento di anticorpi monoclonali umani. In: *Biotechnologie nella micorobiologia medica*. Bologna: Società Editrice Esculapio. p. 53-61 (1992).

Skerra A., Pluckthun A.: Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*. **240**, 1038-1041 (1988).

Skerra A.: Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 256-262 (1993).

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Scienze*. **228**, 1315-7 (1985).

Smith GP. Filamentous phage as cloning vectors. *Biotechnology*. **10**, 61-83 (1988).

SmithGP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Scienze*. **228**, 1315-7 (1985).

Soderlind E., Vergeles M., Borrebeack, CA. Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions. *Gene*. **160**, 269-72 (1995).

Sohnlein P. et al. Epitope spreading and a varying but not disease-specific GAD65 antibody response in Type I diabetes. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia*. **43**, 210-7 (2000).

Solmaz S. Yeast Two Hybrid Assay: A Fishing Tale. *Pathology*. (2003).

Spear MA., Schuback D., Miyata K., Grandi P., Sun F., Yoo L., et al. HIV-1 amplicon peptide display vector. *J Virol Methods*. **107**,71-9 (2002).

Steinitz M., Koshimies S., Klein G., Makela O. Establishment of specific antibody producing human lines by antigen preselection and EBV-trasformation. *Curr Top Microbiol Immunol*. **81**, 156-63 (1978).

Stenberg N., Hoess RH. Display of petide and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc. Natl Acad. Sci. USD*. **92**, 1609 (1995).

Steven A., Greenstone H., Bauer A., Williams R.. Multiple conformational states of the bacteriophage T4 capsid surface lattice induced when expansion occurs without prior cleavage. *Biochemistry*. **226**, 53 (1998).

Strube RW., Chen SY. Characterization of anti-cyclin E single-chain Fv antibodies and intrabodies in breast cancer cells: enhanced intracellular stability of novel sFv-Fc intrabodies. *J Immunol. Methods*. **263**, 149-167 (2002).

Suer B. Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol*. **225**, 890-900 (1993).

Suzuchi T., Lett MC., Sasakawa C. Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem*. **270**, 30874-80 (1995).

Taylor K., Wegrzyn G. Replication of coliphage lambda DNA. *FEMS Microbiol Rev*. **17**, 1-2 109-19 (1995).

Theien BE. et al. Differential effects of treatment with a small-molecule VLA-4 antagonist before and after onset of relapsing EAE. *Blood*. **102**,4464-71 (2003).

Tjandra JJ., Ramadi L., McKenzie IF. Development of human anti murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol.* **68**, Pt 6:367-76 (1990).

Tout NL., Yau KYF., Trevors JT., Lee H., Hall JC. Synthesis of ligand-specific phage –display scFv against the herbicide picloram by direct cloning from hyperimmunized mouse. *J. Agric Food Chem.* **49**, 8 3628-37 (2001).

Tse E., Rabbitts TH. Intracellular antibody-caspase mediated cell killing: a novel approach for application in cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 12266-71 (2000).

Vaughan TJ., Williams AJ., Pritchard K., Osbourn JK., Pope AR., Earnshaw JC., McCafferty J., Hodits RA., Wilton J., Johnson K. Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from large non-immunized phage display. *Nat. Biotechnol.* **14**,309-314 (1996).

Verma R., Boleti E., George A. J.: Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods.* **216**, 165-181 (1998).

Visintin M. et al. The intracellular antibody capture technology (IAC): Toward a consensus sequence for intracellular antibodies. *J.Mol. Biol.* **317**,73-83.

Viti F., Tarli L., Giovannoni L., Zardi L., Neri D. Increased binding affinity and valence of ricombinant antibody fragments lead to improve targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res.* **59**, 347-352 (1999).

Von Boehmer H., Aifantis I., Gounari F., Azogui O., Haughn L., Apostolou I., Jaeckel E., Grassi F., Klein L. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immuno Rev.* **191**,62-78 (2003).

Vu KB., Ghahroudi MA., Wyns L., Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol.* **34**, 16-17; 1121-31 (1997).

Wilson DR., Sieberr BB. Finally, antigenic analysis of Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin with phage display libraries and rabbit anti-

filamentous hemagglutinin polyclonal antibodies. *Infect Immun.* **66**, 10 4884-94.

Winter G., Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*.**349**, 6307:293-9 (1991).

Wittrup KD. Protein engineering by cell-surface display. *Curr Opin Biotechnol.* **12**,4 395-9 (2001).

Yeung YA., Wittruo KD. Quantitative screening of yeast surface-displaed polypeptide libraries by magnetic bead capture. *Biotechnol Prog.* **18**, 2 212-20 (2002).

Yokota T., Milenic DE., Whitlow M., Schlom J. Rapid tumor penetretation of single chain Fv and comparaisn with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* **52**, 12: 3402-08 (1992).

Zhu H., SnyderM. Protein array and microarrays. *Curr Opin Chem Biol.* **5**,1 49-5 (2001).

Zucconi A. et al. Selection of ligands by panning of domain libraries displayed on phage lambda reveals new potential partners of synaptojanin1. J mol Biol. **307**, 5 1329-39 (2001).