



Biotechnologie applicate

TRANSACTIVA⁺ MOLECULAR FARMING

sustainable biologics

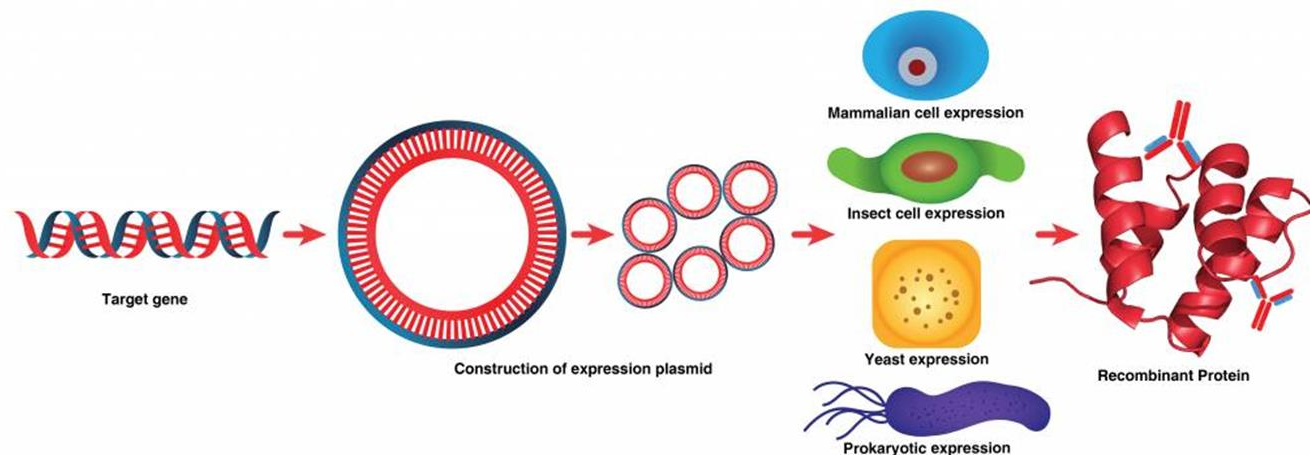
PLANT MOLECULAR FARMING: MOLECULAR BIOLOGY OVERVIEW

Caterina Deganutti, PhD
info@transactiva.it



BIOLOGIA MOLECOLARE

«La biologia molecolare è la branca della biologia che studia gli esseri viventi a livello dei meccanismi molecolari alla base della loro fisiologia, concentrandosi in particolare sulle interazioni tra le macromolecole, ovvero proteine e acidi nucleici (DNA e RNA). In biologia molecolare si utilizzano tecniche sperimentali che consentono la rilevazione, l'analisi, la manipolazione, l'amplificazione (PCR) e la copia (clonaggio) degli acidi nucleici.»



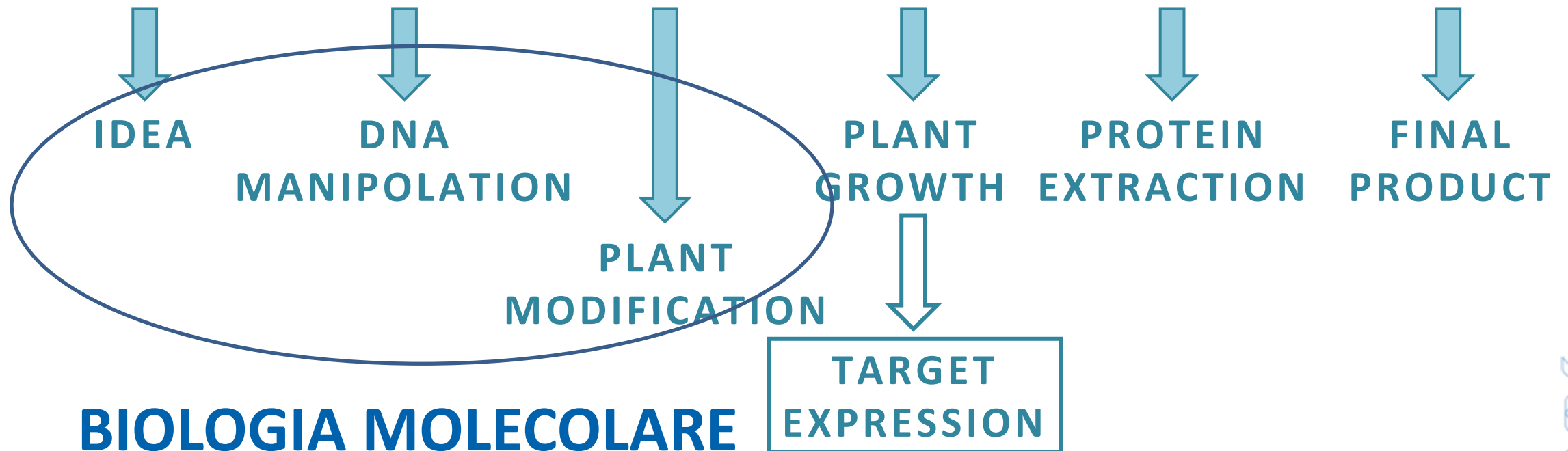
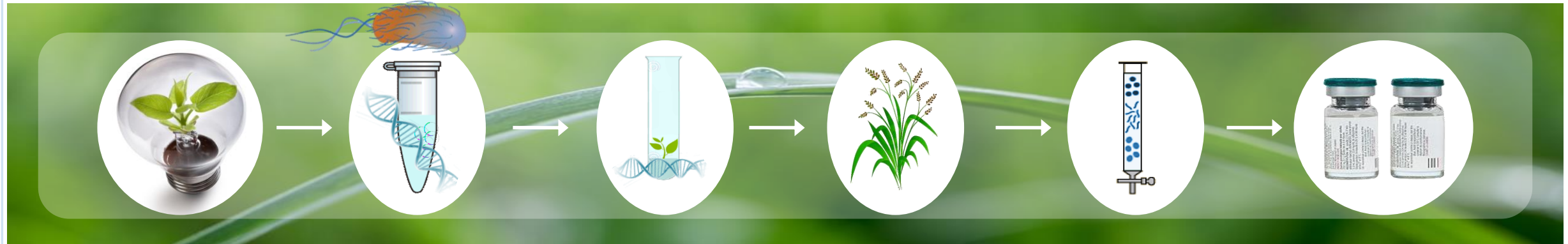
ASPETTATIVA



REALTÀ



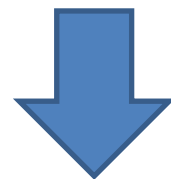
PLANT MOLECULAR FARMING



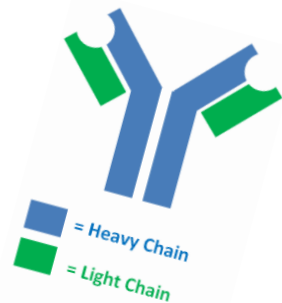
DALL'IDEA ALLA REALIZZAZIONE



- Una volta decisa la proteina terapeutica che voglio esprimere, devo sapere:
- SEQUENZA AMINOACIDICA
 - QUANTE CATENE AMINOACIDICHE COMPONGONO LA PROTEINA (eg per anticorpi catena leggera e catena pesante)
 - SE DISPONIBILE; DNA ORGANISMO DI PARTENZA
 - FOLDING DELLA PROTEINA → RICHIEDE MODIFICHE POSTRADUZIONALI?
 - PRESENZA DI GLICOSILAZIONE?
 - DOVE VOGLIO CHE L'HOST (nel nostro caso, la pianta) MANDI LA PROTEINA?
 - CI SONO GIÀ GRUPPI DI RICERCA CHE HANNO LAVORATO SU QUESTA PROTEINA? CON QUALI RISULTATI?
 - VARIE

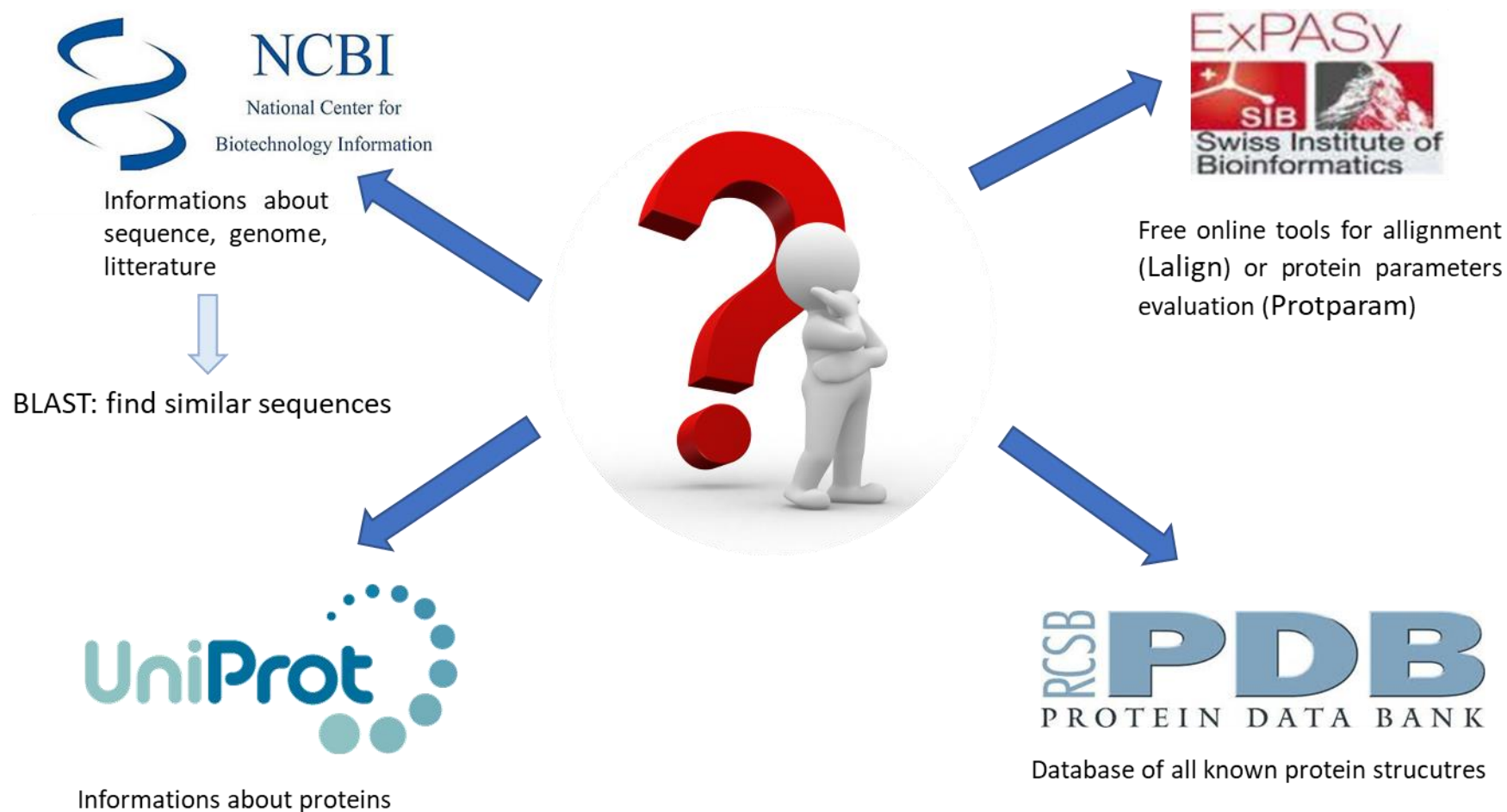


CARTA DI IDENTITÀ DELLA MIA PROTEINA



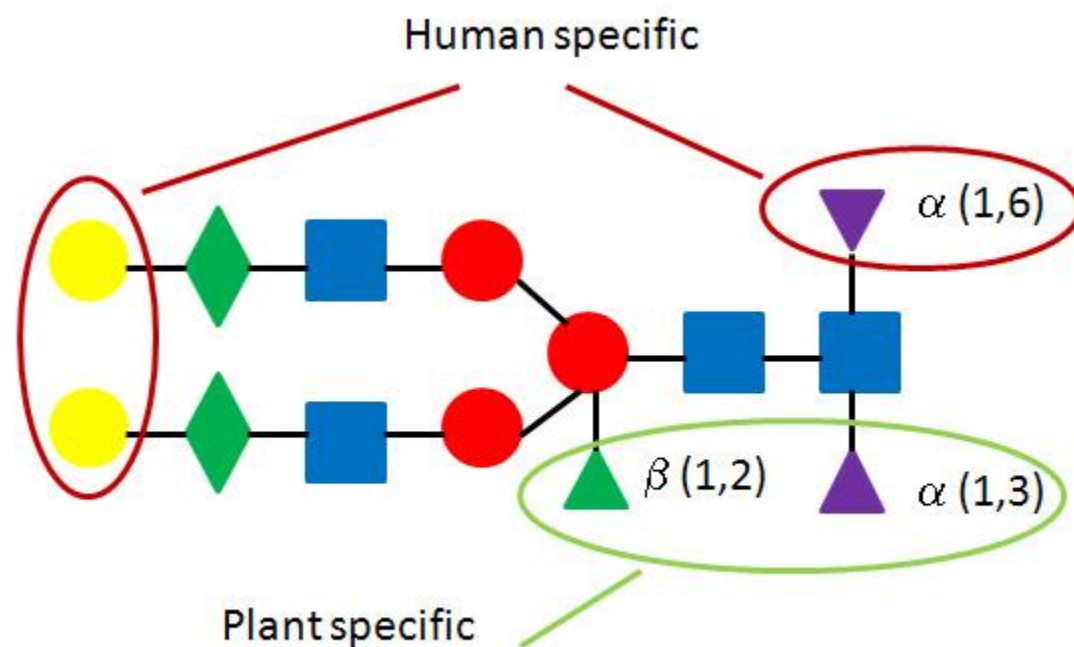
DALL'IDEA ALLA REALIZZAZIONE

Fonti di informazioni



DALL'IDEA ALLA REALIZZAZIONE

La glicosilazione



Le piante inseriscono zuccheri diversi:

- Sito di glicosilazione comune (Asn) Asn-X-Ser/Thr
- beta(1,2)-xylose
- core alpha(1,3)-fucose
- Assenza acido sialico terminale

Questi zuccheri sono in grado di attivare il sistema immunitario umano e possono essere causa di forti reazioni allergiche.

VANTAGGIO
vaccini

SVANTAGGIO
enzimi



PLANT MOLECULAR FARMING

Tecniche di trasformazione

Molte piante



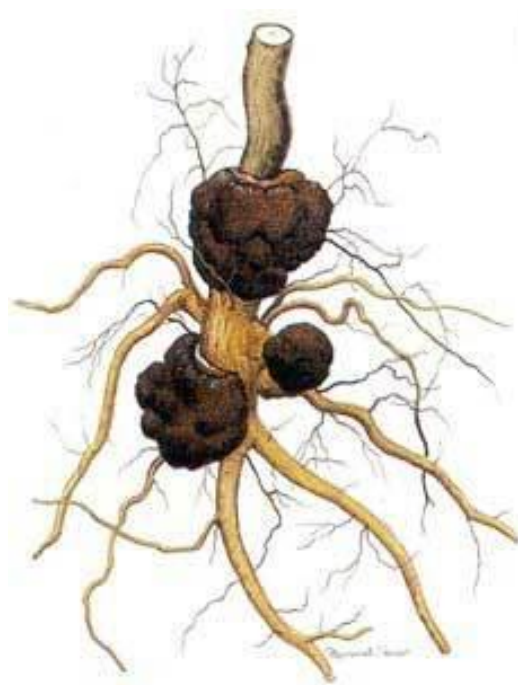
Diverse tecniche di trasformazione



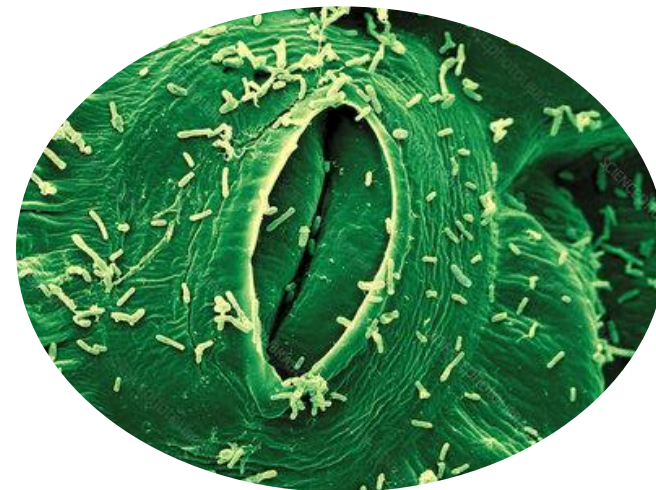
L'AGROBATTERIO IN NATURA



Agrobacterium tumefaciens è un batterio aerobo GRAM -, facente parte della famiglia delle Rhizobiaceae (cui appartengono molti simbionti azotofissatori delle piante).
Ha la particolarità di possedere il Ti plasmid per l'infezione delle piante.



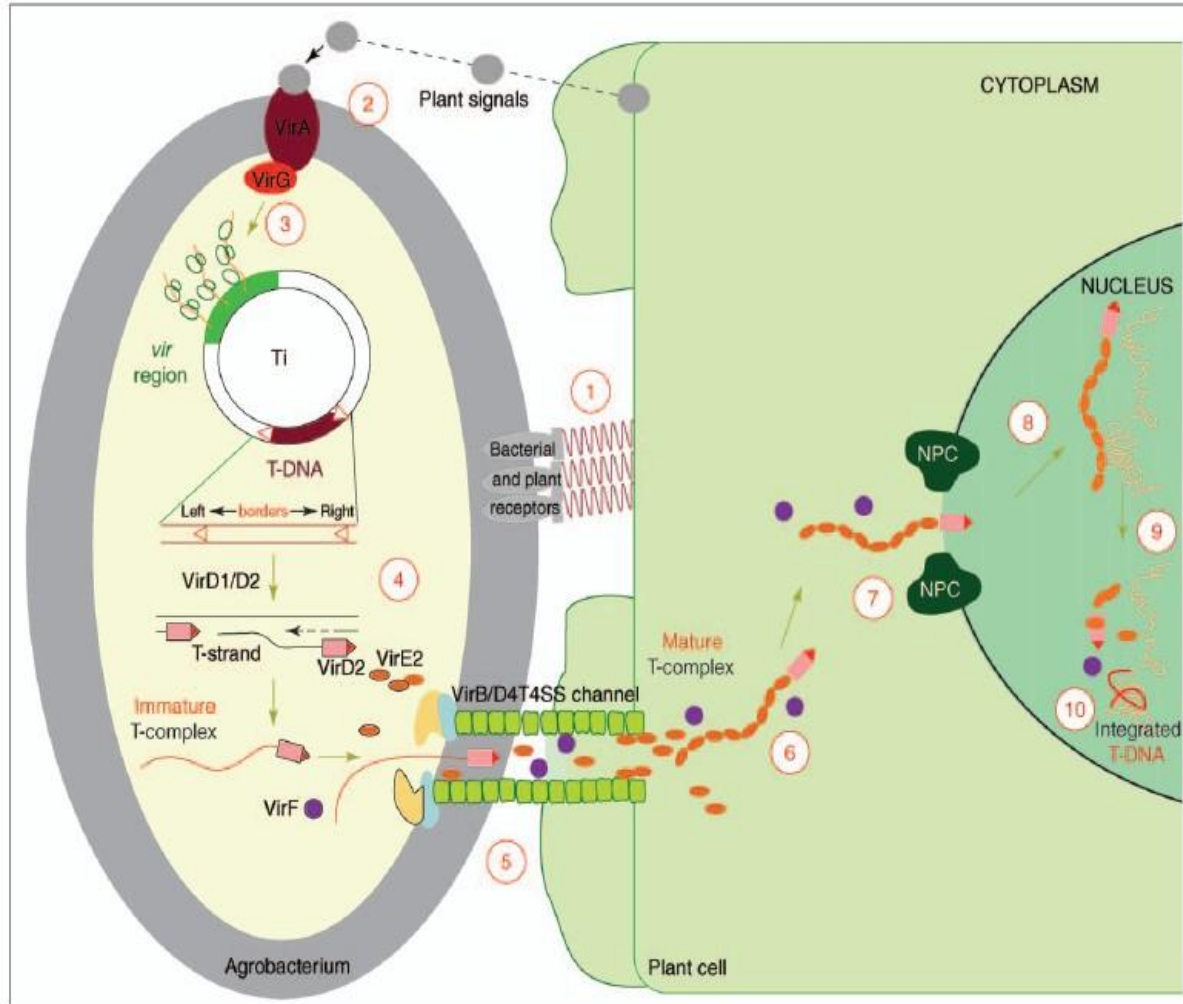
È in grado di indurre la formazione di tumori nella zona d'infezione della pianta (tra fusto e radici). Questi tumori vengono definiti «GALLA DEL COLLETTTO».



In natura, *A. tumefaciens* attacca i tessuti della pianta tramite lesioni pre-esistenti. Quindi trasferisce il suo Ti DNA nel genoma della pianta, che è così indotta a produrre sostanze utili alla proliferazione del batterio. Ha una predilezione per le dicotiledoni.



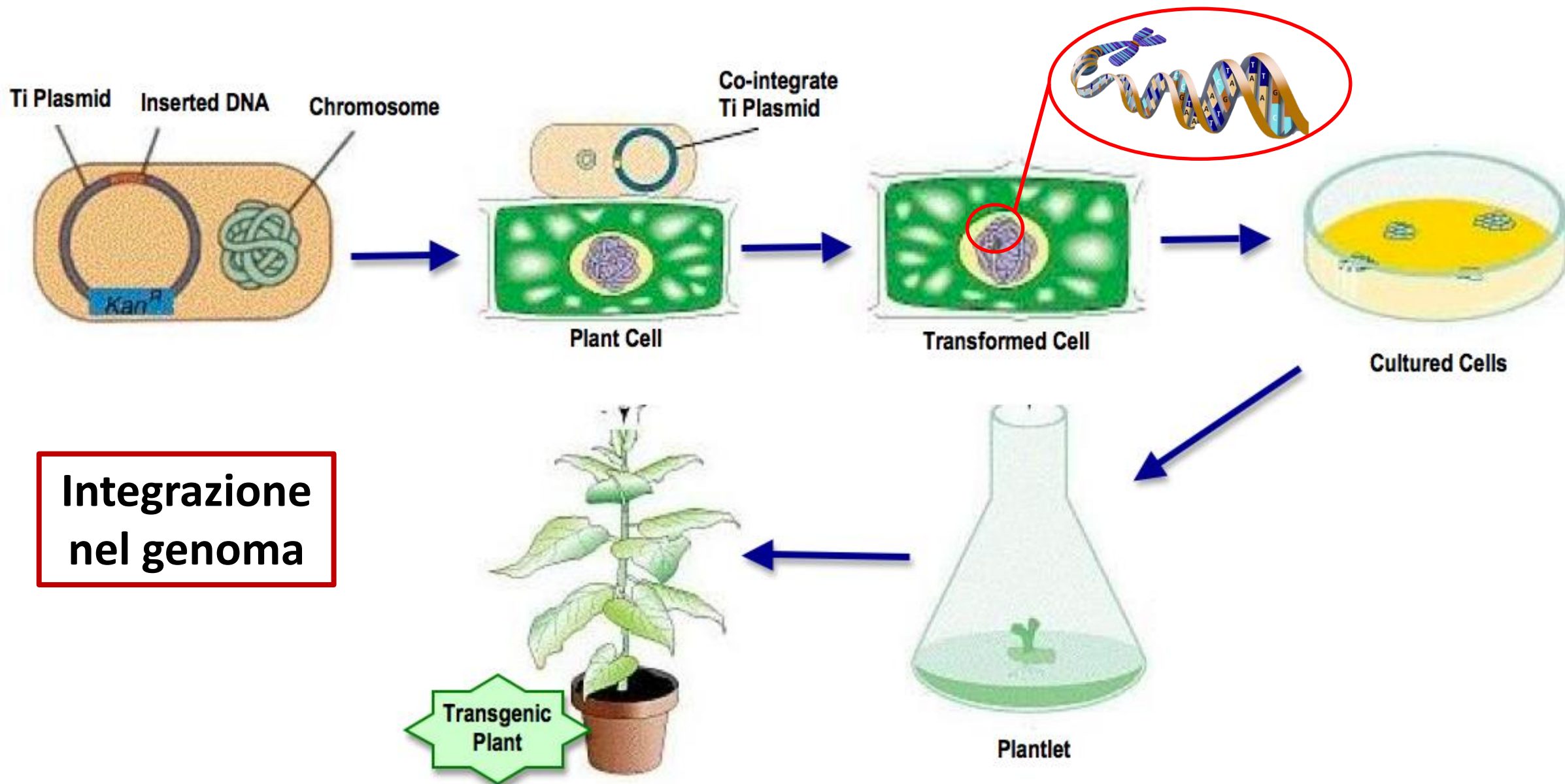
L'AGROBATTERIO - meccanismo



- 1. ATTACCO:** l'agrobatterio è attratto da messaggeri chimici emessi dalla pianta in caso di ferite. Quindi, con il flagello, si muove verso la ferita e si «aggancia» alla pianta assieme ad altri batteri, formando una colonia.
- 2. ANCORAGGIO TRAMITE PILUS:** sempre sotto stimolo di messaggeri chimici rilasciati dalla pianta ferita (fenoli), il sensore VirA/VirG si attiva. Questo sensore a sua volta attiva i geni della regione Vir, tra cui VirB responsabile della produzione del PILUS (pilus T). Il pilus ancora il batterio alla cellula vegetale e permette il passaggio del materiale genetico.
- 3. TRASFERIMENTO DEL T-DNA:** i) VirD1 e VirD2 riconoscono left e right border e li tagliano. ii) Il T-DNA libero viene sintetizzato e legato a VirE e VirD2. iii) VirE/D2 vengono riconosciuti dalla pianta come proteina importina, il T-DNA viene così portato nel nucleo e integrato al genoma tramite ricombinazione omologa grazie a VIP1 e VIP2.
- 4. TRASCRIZIONE E TRADUZIONE:** a questo punto i geni presenti sul T-DNA vengono trascritti e tradotti dalla pianta stessa, dando via alla patologia.

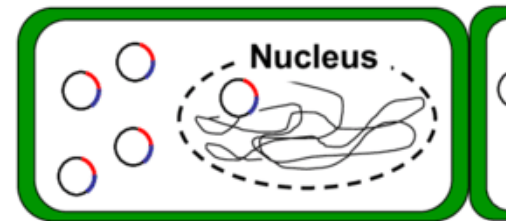


L'AGROBACTERIO – trasformazione stabile



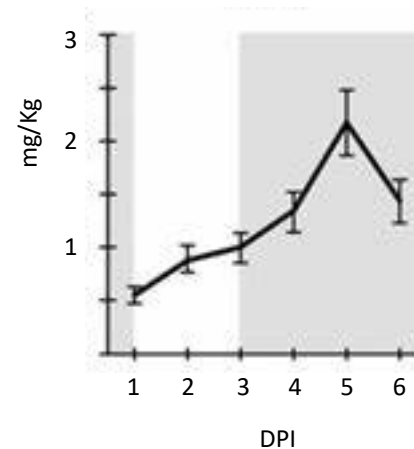
L'AGROBATTERIO – trasformazione transiente

Transient transformant



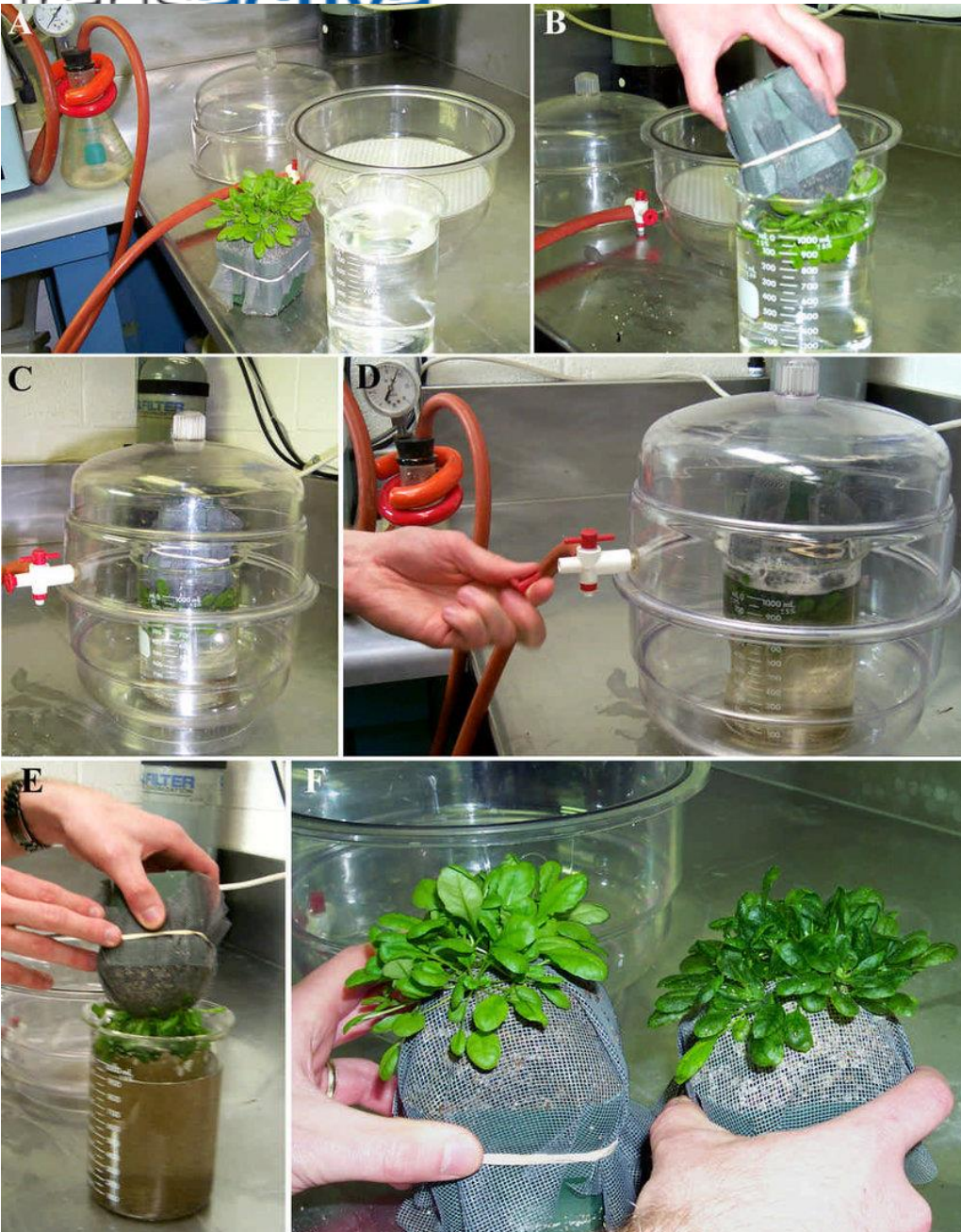
Transient expression from
extra-chromosomal plasmids

Produzione temporanea della
proteina solo nei tessuti entrati in
contatto con il batterio.



Produzione della proteina per pochi giorni
(picco a 4-7). Poi inizia la degradazione del
plasmide e cessa la produzione.

**NO
integrazione
nel genoma**



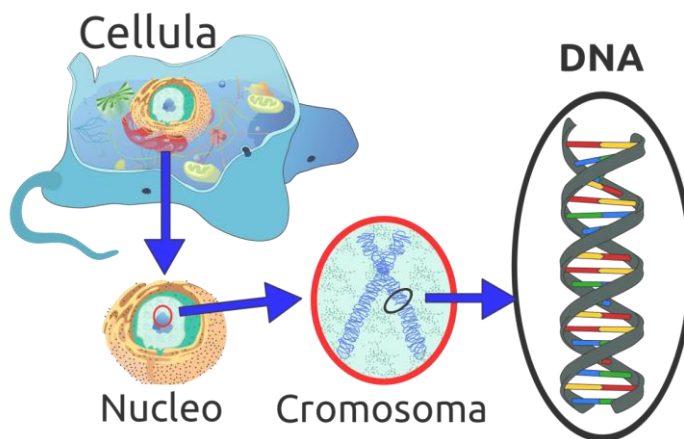
CLONAGGIO

«Clonaggio, con riferimento a frammenti di DNA, è un insieme di metodi sperimentali nella biologia molecolare che descrive l'assemblaggio di molecole ricombinanti e, dunque, una serie di tecniche con le quali è possibile ottenere più copie di una determinata sequenza nucleotidica, non necessariamente di natura genica.

L'uso del termine clonaggio si riferisce al fatto che il metodo includa la replicazione di una molecola per produrre una colonia di cellule con le stesse molecole di DNA.»

Una volta, gene isolato da genoma con enzimi di restrizione e inserito in un vettore, oggi DNA amplificato tramite PCR.

**DA DOVE
PRENDO IL DNA
DI PARTENZA?**



**DIRETTAMENTE DALL'ORGANISMO
DI PARTENZA**

- Meno costoso
- Sequenza identica all'originale
- Posso usare anche mRNA



**DNA SINTETIZZATO INSERITO IN
VETTORE COMMERCIALE**

- Più costoso
- Possibilità di aggiungere/modificare sequenze
- Possibilità di ottimizzare la sequenza in base all'organismo di espressione



CLONAGGIO

Tipi di host



Prokaryotic expression

BATTERI (principalmente *E. coli*):

- Poco costoso e veloce
- Elevato livello di espressione
- No PTM
- Solo per piccole proteine



Yeast expression

LIEVITI (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*):

- Poco costoso
- Buon livello di espressione
- Alcune PTM
- No selezione antibiotica



Insect cell expression

BACULOVIRUS-INSECT CELLS (*Drosophila*):

- Costoso
- Elevato livello di espressione
- PTM
- No selezione antibiotica



Mammalian cell expression

MAMMALIAN (*CHO*, *Hela*):

- Costoso e lungo
- Basso livello di espressione
- PTM
- No selezione antibiotica



CELL-FREE EXPRESSION SYSTEM:

- Costoso

PIANTE



- Poco costoso
- Buon livello di espressione
- Trasformazione stabile o transiente
- PTM
- Tutte le proteine
- Selezione con alcuni tipi di antibiotici possibile



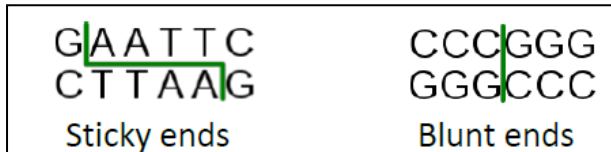
Espressione
transiente in *N.
benthamiana*



Espressione stabile in
O. sativa

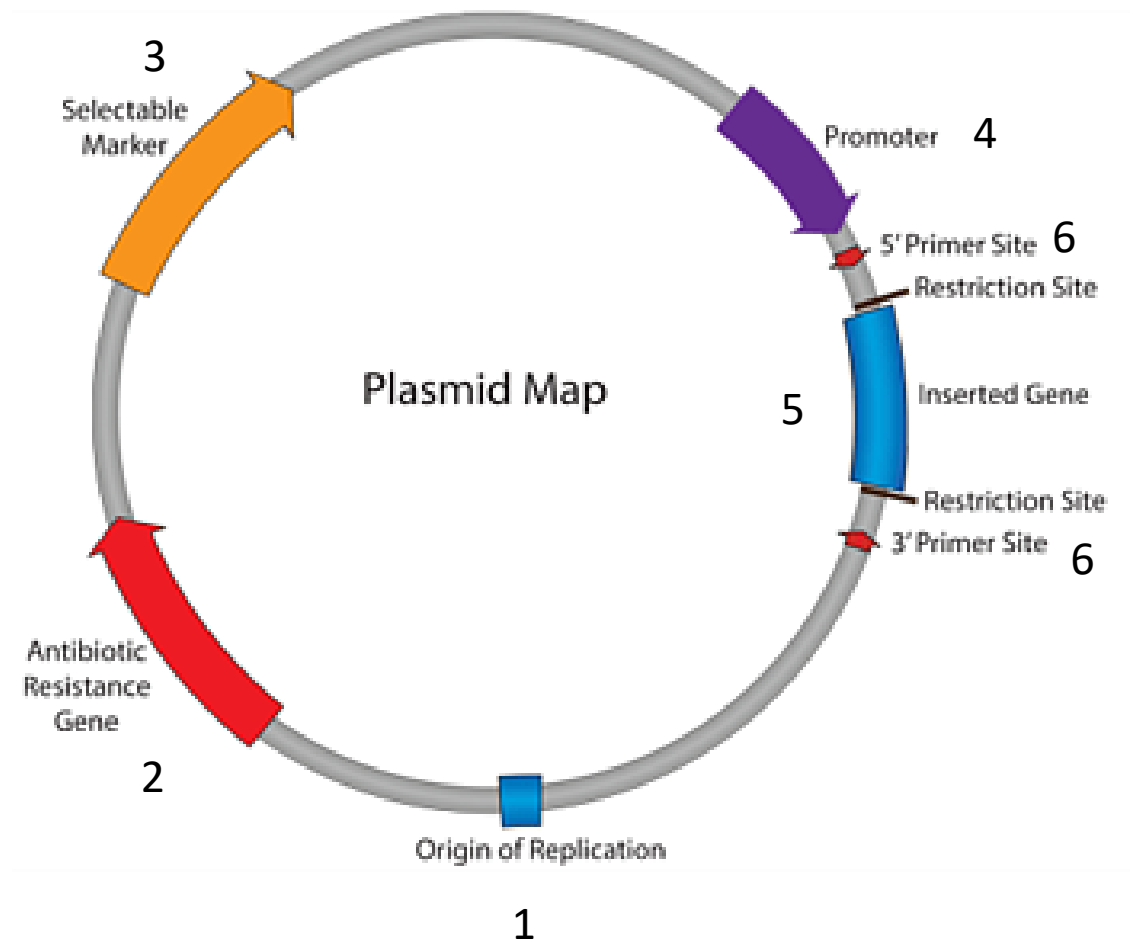
VETTORI

1. **ORIGINE DELLA REPLICAZIONE:** (*ori*) sequenza nel genoma dalla quale inizia la replicazione del DNA. Controlla la replicazione e il numero di copie prodotte (Low-High copy).
2. **ANTIBIOTICO RESISTENZA**
3. **MARKER DI SELEZIONE:** gene che conferisce un tratto utile alla selezione artificiale.
4. **PROMOTER:** regione dalla quale inizia la TRASCRIZIONE, controlla il legame della RNA polimerasi.
5. **SITO POLILINKER (o multiple cloning site MSC):** zona del plasmide ricca di sequenze per gli enzimi di restrizione, la proteina generalmente viene inserita in questa zona.



6. **5' e 3' SITI PER PRIMER :** regione a cui si allineano i primer forward e reverse durante l'amplificazione del DNA tramite PCR.

Possibilità di aggiungere TAGS all' N o al C terminale della proteina

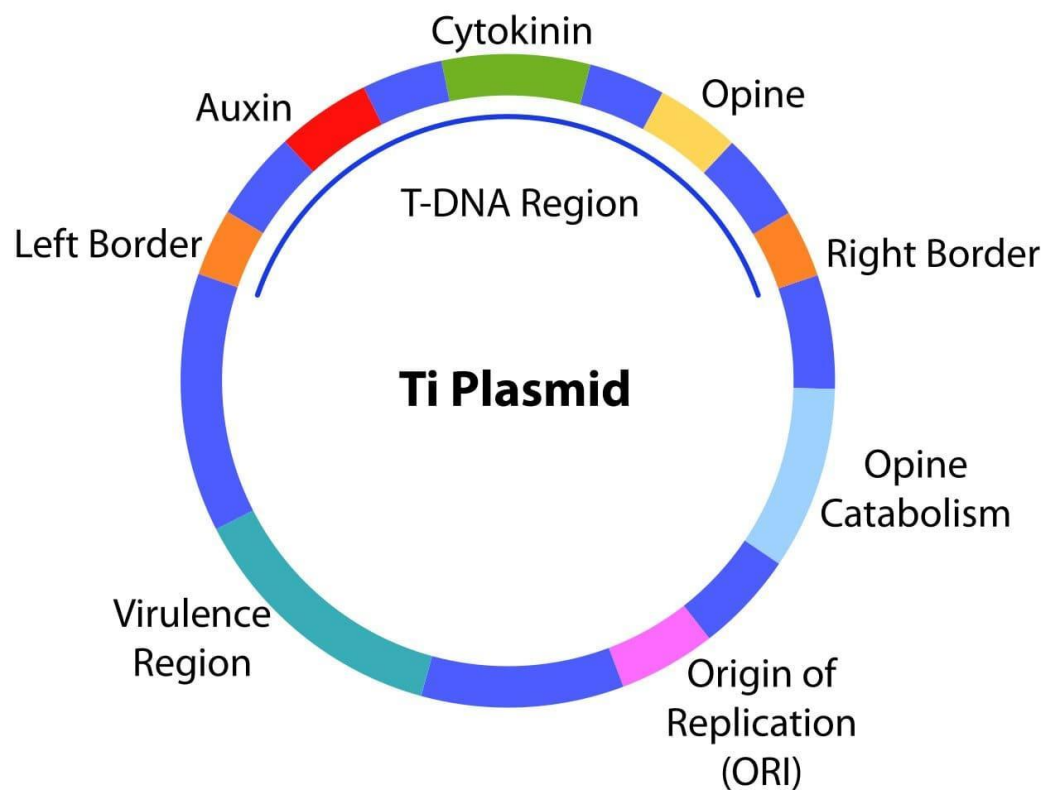


I plasmidi sono specifici per l'HOST!



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Il plasmide Ti



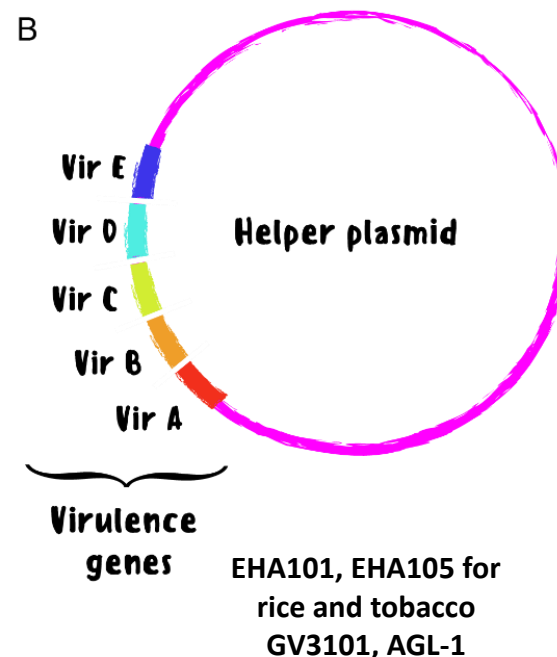
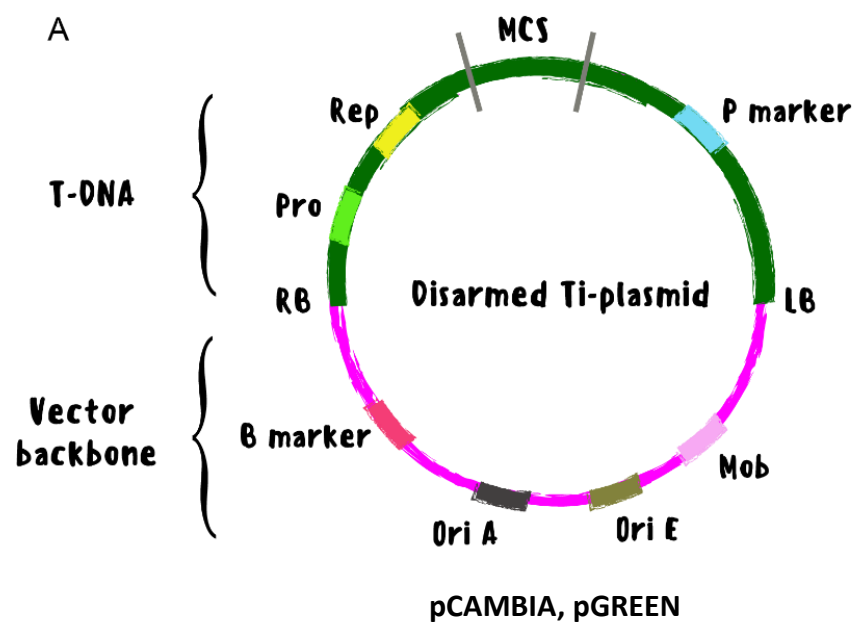
- Negli anni '40 prima connessione tra tumori delle piante e batteri. Negli anni 80 primo sequenziamento di un Ti plasmid (Tumor inducing).
- Fondamentale per la virulenza dell'agrobatterio
- Generalmente >100 Kpb
- **Vir region:** regione che codifica per i fattori di virulenza che permettono al batterio di infettare la pianta.
- **ORI:** replicazione batterica (low copy)
- **T-DNA:** zona tra il bordo di destra e quello di sinistra che viene inserita per coniugazione all'interno del genoma della pianta. Solitamente contiene 8 geni specifici. Contiene le informazioni per la produzione di ormoni vegetali (come auxine e citochine) e di opine (aminoacidi inusuali utilizzati dai batteri come nutrienti, non utilizzabili dalla pianta).

Virulence region



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Vettori binari



Plasmide Ti disarmato:

- Dimensioni contenute (3 kbp)
- Origine di replicazione per coli e agrobatterio
- Left e Right border
- Marker di selezione per le piante (resistenza Kan/Gen/Hygr; PMI)
- Rep: gene reporter (GFP, GUS)
- Sito polilinker
- Promotore leggibile solo dalle piante (**CAMV 35S**)
- Marker di selezione per batteri (resistenza antibiotici; generalmente Kan)

Plasmide «helper»:

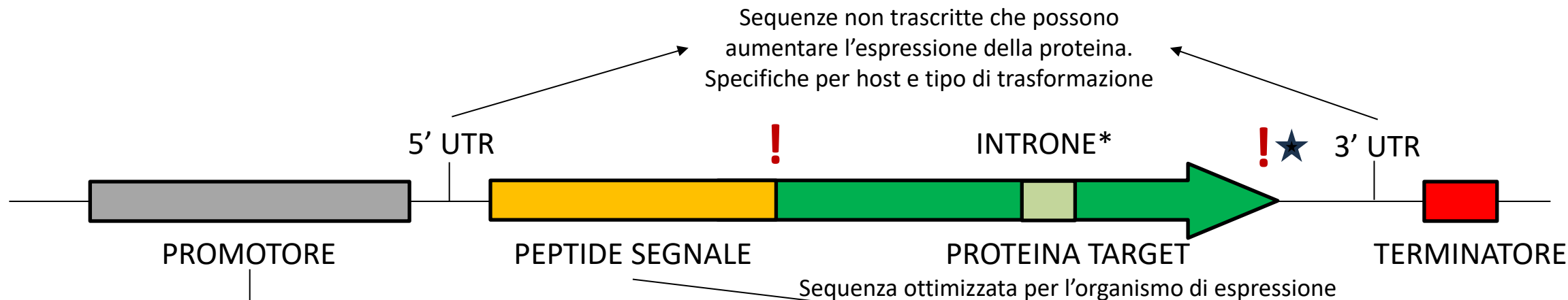
- Contiene i geni di virulenza

Addizionale: Sequenza per inibire il silenziamento del gene p19 e NSs da virus del pomodoro



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Come costruire il mio gene - cassette



Quando e dove voglio che si esprima la mia proteina?

- Deve essere letto dal mio host di espressione (la pianta) ma non da quello di clonaggio (coli e agrobatterio)
- Può essere inducibile (Ramy3D) o costitutivo (35S)
- Può essere tessuto-specifico (GluB4)

In quale compartimento cellulare voglio che vada?

- La proteina deve passare per ER per glicosilazione e ponti disolfuro
- Proteina secreta in apoplasto (Pr1A)
- Proteina in vacuolo
- Proteina in cloroplasto
- Proteina accumulata in seme (GluB4)

! Aggiunta di un TAG per purificazione (es HIS) o visualizzazione veloce delle proteine (es GFP):

- Al N-terminale (tenere conto che il peptide segnale viene tagliato)
- Al C-terminale (garantisce di purificare la proteina trascritta per intero)

★ Sequenza per ritenzione in ER (es KDEL)

* Introne: garantisce che solo organismi superiori producano la proteina corretta



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Il promotore 35S

- Cauliflower mosaic virus promoter



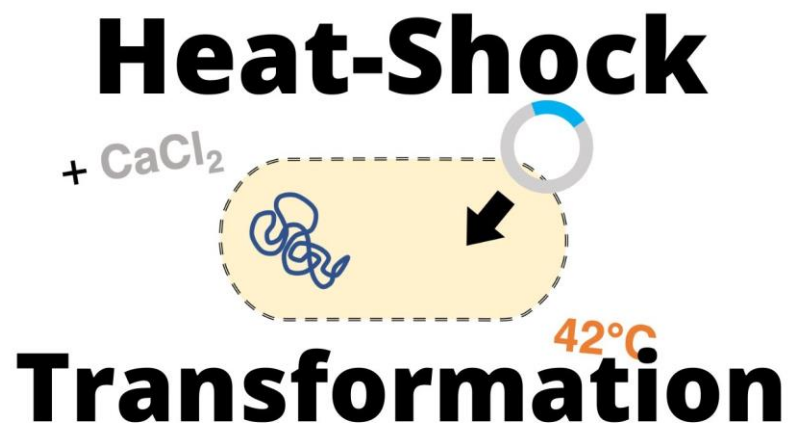
- Promotore costitutivo più utilizzato nelle colture OGM
- Talmente comune che in commercio si usano kit per detectare la presenza del promotore 35S per distinguere tra coltura OGM e non-OGM



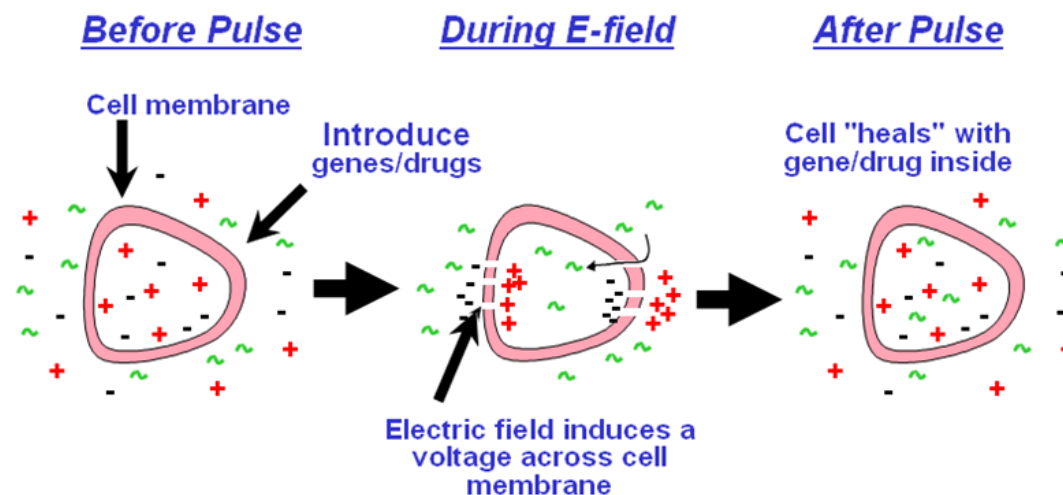
TRASFORMAZIONE BATTERICA

Per trasformare un batterio, questo deve essere COMPETENTE. La competenza è la capacità delle cellule di assorbire il DNA che è liberamente presente nel mezzo circostante.

SHOCK TERMICO



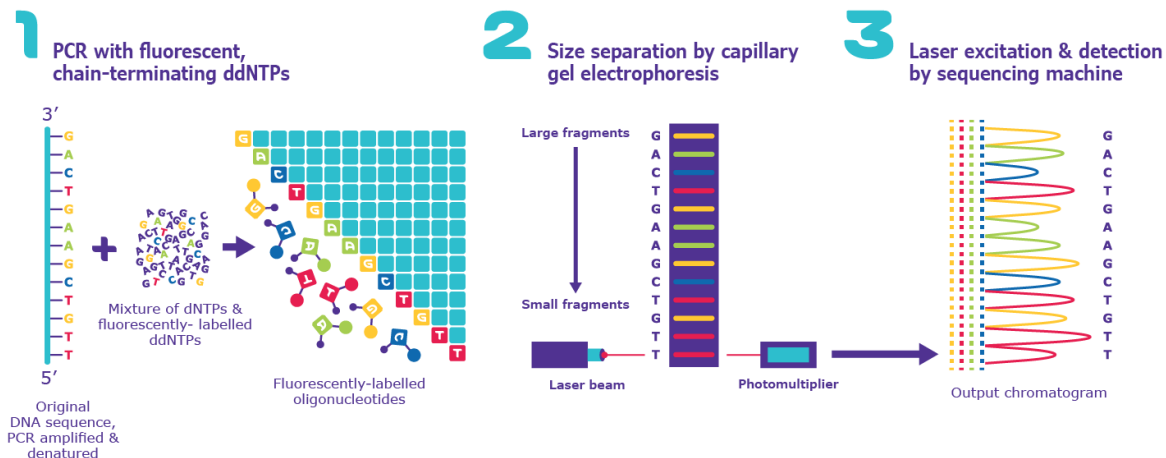
ELETTROPORAZIONE



COME CONTROLLO IL MIO DNA?

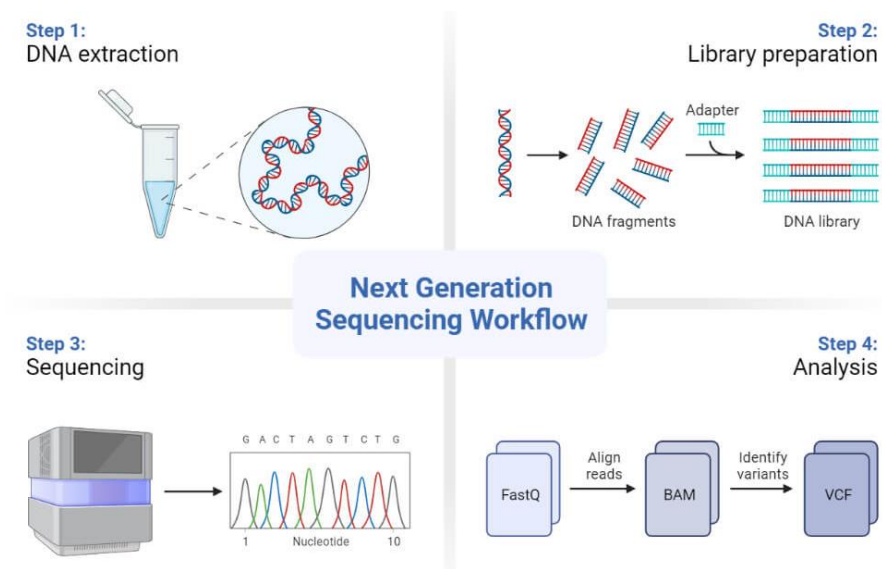
Plasmide – Sanger sequencing

- Inventato nel 1977 dal premio Nobel Frederick Sanger
- Detto anche «metodo di terminazione della catena»
- NON è UNA NORMALE AMPLIFICAZIONE PCR
- **Permette di sequenziare fino a 900 bp per volta con elevata affidabilità**
- **Economico**
- Sia manuale che automatico



Genoma – Next generation sequencing

- Detto anche «metodo da estensione»
- **Permette di sequenziare intero genoma con buona affidabilità**
- **Molto costoso**
- Automatico
- Richiede personale in grado di leggere i risultati



[Sequenziamento con metodo Sanger, procedura e passaggi \(sigmaaldrich.com\)](http://sigmaaldrich.com)



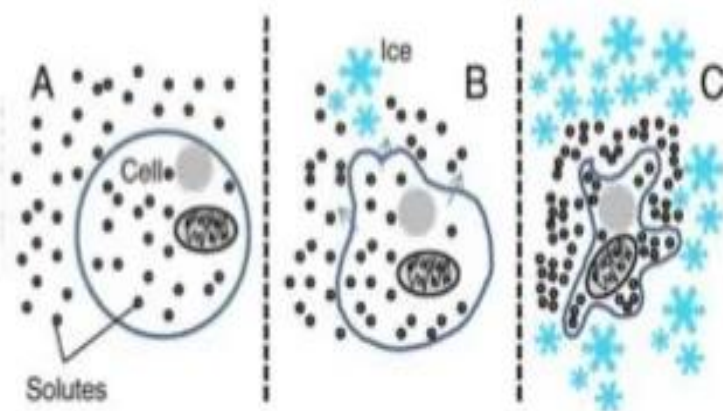
CLONAGGIO

Programmi utili



CONSERVAZIONE DELLE CELLULE

CRIOPROTETTORI



- Macromolecole, come il glicerolo, sono usate per proteggere i tessuti dal congelamento
- Quando il ghiaccio si forma all'esterno, l'acqua all'interno della cellula esce per diluire i soluti che si sono concentrati all'esterno
- I crioprotettori prevengono la fuoriuscita della totalità dell'acqua dalla cellula, aumentando la concentrazione dei soluti all'interno della cellula



Azoto liquido -192°C
Freezer -80°C



A COSA DEVO STARE ATTENTO?

Università VS Azienda



Identificare chiaramente
gli **OBBIETTIVI** DA
RAGGIUNGERE



Valutare attentamente la presenza
di **BREVETTI** sia per il prodotto
finale che per le tecniche utilizzate



Tenere sempre a mente
COSTI E TEMPISTICHE

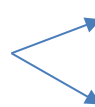


Emmanuelle Charpentier e
Jennifer A. Doudna,
**Premio Nobel per la chimica del
2020**



Il caso di CRISPR-CAS9 **Gene-editing**

Semplice
Preciso
Rapido



Licenza per ricerca → gratuita

Licenza per aziende → \$\$\$\$



A large greenhouse filled with rows of green rice plants growing in a field. The plants are lush and green, with some showing signs of ripening. The greenhouse structure is visible in the background, with metal poles and a translucent covering.

The sustainable future of drug development

DOMANDE?



Biotechnologie applicate

TRANSACTIVA⁺
MOLECULAR
FARMING
sustainable biologics

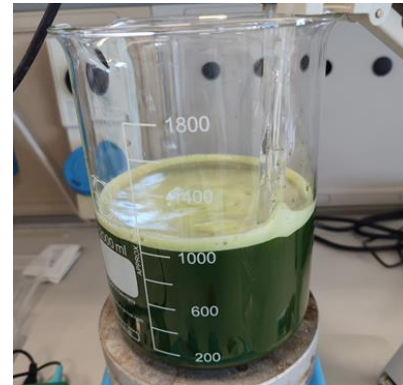
PLANT MOLECULAR FARMING: PLANT TRANSFORMATION AND GROWTH

Piattaforme in Transactiva

Semi di riso



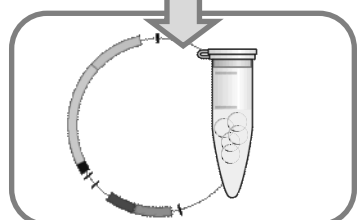
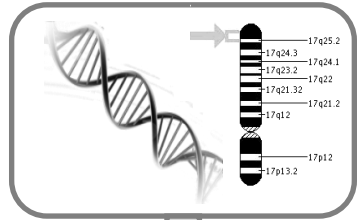
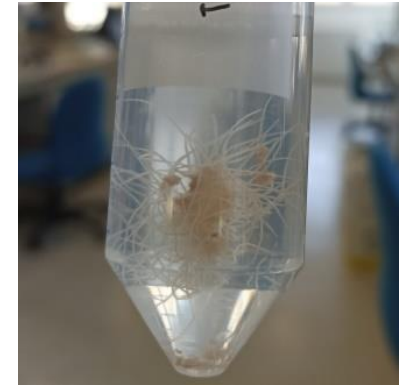
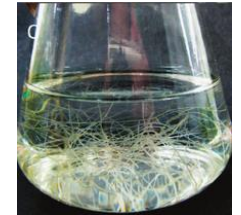
Nicotiana benthamiana



Cell cultures



Hairy Roots



**Desirable
proteins**

Pro & Contro



Riso - Pro

- ✓ Stabilità
- ✓ Conservazione dei semi
- ✓ Facile purificazione
- ✓ Resa per ogni ciclo
- ✓ Consumo energetico (Molto basso)

Riso - Contro

- ✓ Limitazioni geografiche (OGM)
- ✓ Tempo
- ✓ Variabilità della produttività



Nicotiana – Pro

- ✓ Rapidità
- ✓ Flessibilità
- ✓ Non OGM
- ✓ Facile da coltivare
- ✓ Rapporto resa/superficie
- ✓ Nessuna limitazione geografica

Nicotiana – Contro

- ✓ Elevato fabbisogno di manodopera
- ✓ Complessità nella purificazione
- ✓ Consumo energetico (Alto)



Cell cultures – Pro

- ✓ Biorattore “standard”
- ✓ Conforme alle cGMP
- ✓ Produzione continua o inducibile

Cell cultures – Contro

- ✓ Moltiplicazione biomassa lenta
- ✓ Manutenzione
- ✓ «Cell bank»
- ✓ Bassa resa
- ✓ Consumo energetico (Alto)



Hairy Roots – Pro

- ✓ Biorattore “standard”*
- ✓ Conforme alle cGMP
- ✓ Produzione continua o inducibile
- ✓ Bassa sensibilità (rispetto alle linee cellulari)
- ✓ Crescita rapida

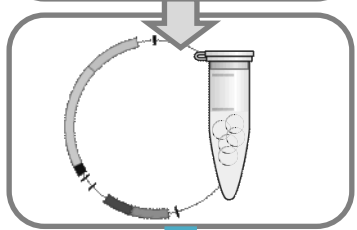
Hairy Roots – Contro

- ✓ Resa bassa
- ✓ Consumo energetico (alto)
- ✓ “Root bank”



La pipeline

Piante transgeniche di riso e bioreattori cellulari



Desirable proteins



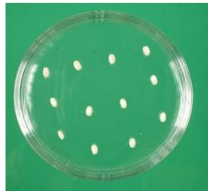
Riso



Cell cultures



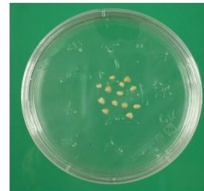
dehusking



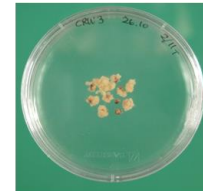
disinfection



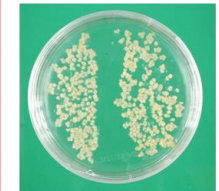
germination



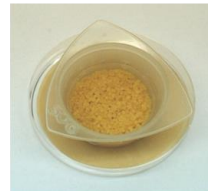
isolation of scutella



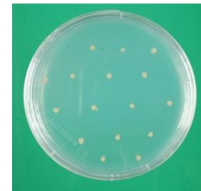
callogenesis



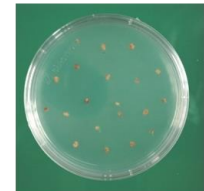
embryoids selection



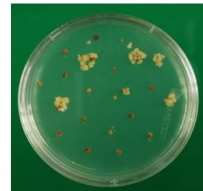
infection



culture on CCM



culture on SMI



culture on SMII



culture on PRM



regeneration



shoot differentiation



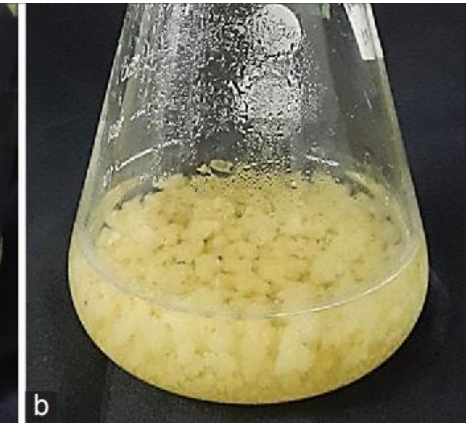
rooting



hardening and growth



Calli multiplication

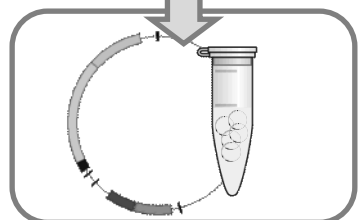
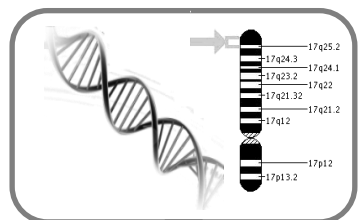


Calli on liquid culture



La pipeline

Foglie di tabacco transiente e Hairy Roots



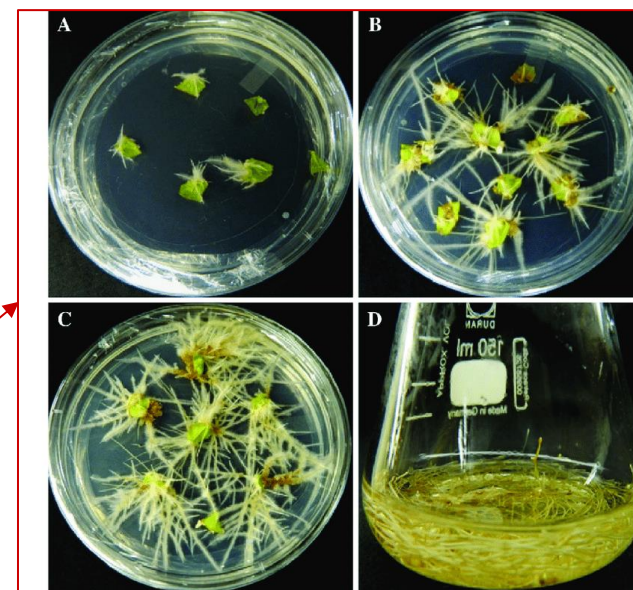
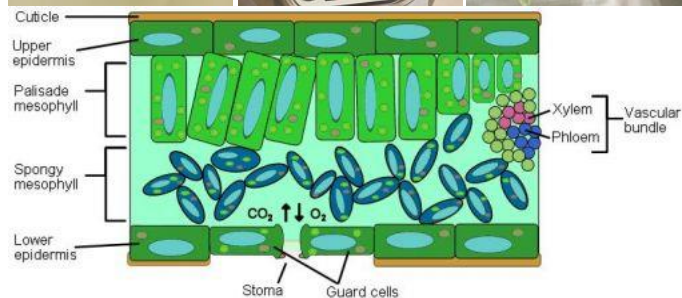
Desirable
proteins



Tabacco



Hairy roots



Vantaggi e svantaggi: trasformazione stabile e trasformazione transiente

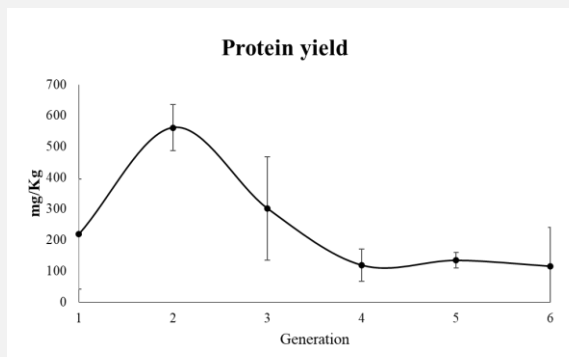
Trasformazione stabile

Vantaggi

- Integrazione permanente del transgene nel genoma → ereditarietà assicurata
- Produzione a lungo termine della proteina o carattere desiderato
- Ideale per linee geneticamente modificate (OGM) e coltivazioni commerciali
- Utile per studi su tratti genetici complessi o modifiche durature

Svantaggi

- Processo lungo e laborioso (generazioni)
- Basso tasso di trasformazione in molte specie
- Rischio di effetti posizionali (variazioni di espressione in base al sito d'integrazione)
- Sottoposto a regolamentazioni più severe (OGM)



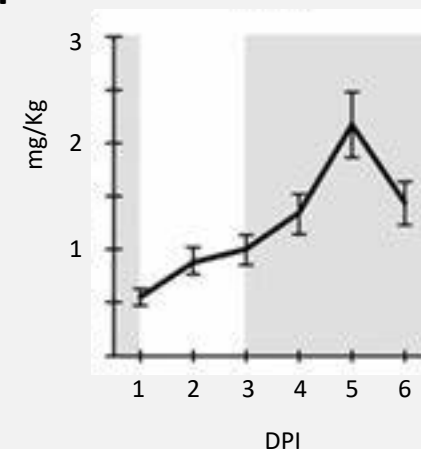
Trasformazione transiente

Vantaggi

- Rapida espressione genica (da poche ore a pochi giorni)
- Nessuna integrazione nel genoma → ideale per test preliminari
- Alta efficienza di trasformazione in tessuti vegetali
- Utile per produzione veloce di proteine ricombinanti (es. vaccini, anticorpi)
- Non sempre soggetta alla normativa OGM, a seconda del contesto

Svantaggi

- Espressione temporanea e non ereditaria
- Ripetibilità limitata nel tempo → va rifatta per ogni ciclo
- Non adatta a coltivazioni stabili



Vantaggi e svantaggi: coltivazione su suolo e vertical farming

Coltivazione su suolo



Vantaggi

- Costo iniziale basso
- Adatta per colture estensive
- Utilizzo di risorse naturali
- Tecnologia collaudata e conosciuta da secoli

Svantaggi

- Dipendenza da condizioni climatiche
- Uso intensivo del suolo
- Consumo elevato di acqua e pesticidi
- Bassa efficienza per unità di superficie
- Limitazioni geografiche

Vertical farming



Vantaggi

Uso ottimale dello spazio
Controllo totale del microclima
Ridotto uso di acqua
Assenza o drastica riduzione di pesticidi
Produzione tutto l'anno
Possibilità di coltivare in ambienti urbani

Svantaggi

Alto costo iniziale
Alto consumo energetico
Limitata varietà di colture
Richiede competenze tecniche avanzate

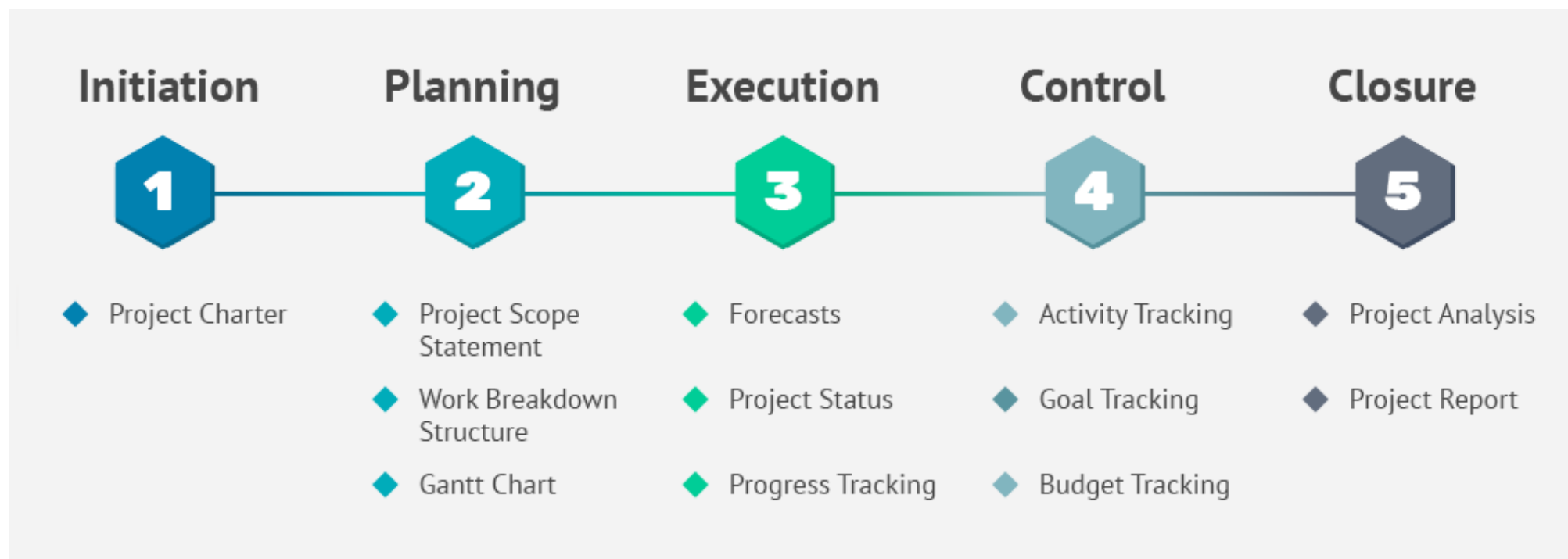


Ricerca in azienda

Punti importanti da sapere



Project Management



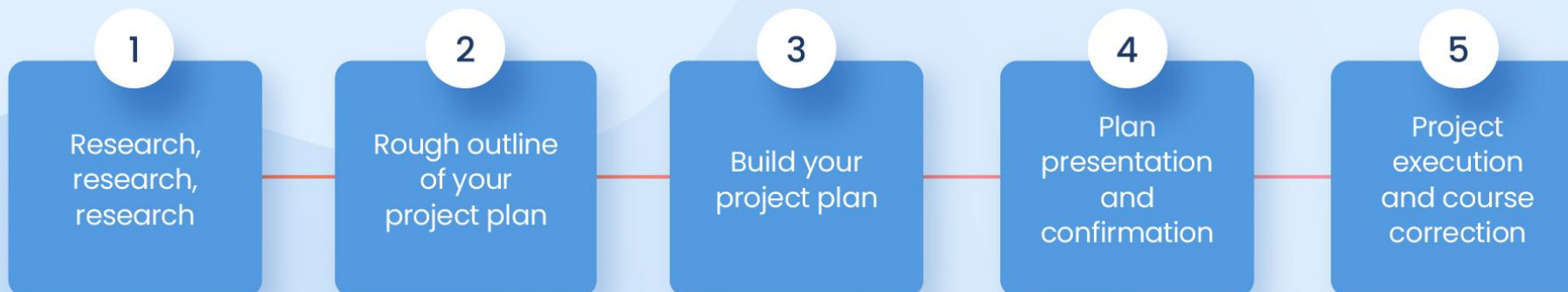
Ricerca in azienda

Punti importanti da sapere: pianificazione



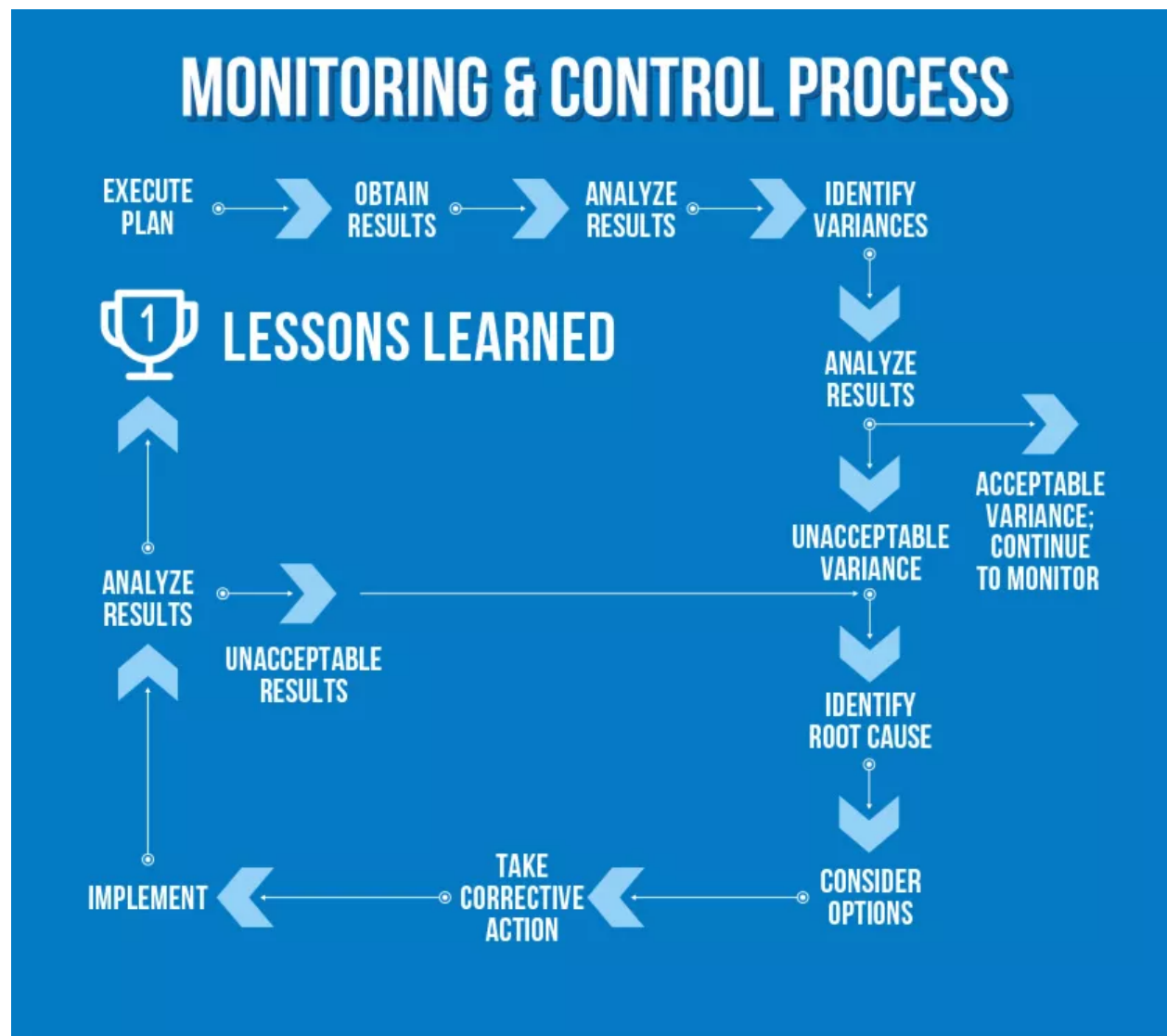
Project Managing

5 essential steps for project planning



Ricerca in azienda

Punti importanti da sapere: controllo continuo



The sustainable future of drug development

DOMANDE?

**THANK YOU
FOR YOUR ATTENTION**

Mail to: cdeganutti@transactiva.it