



<p style="text-align: center;">Dottorato di Ricerca in Scienze delle Produzioni Vegetali e Animali PhD Programme in Plant and Animal Science Codice del Corso di dottorato/PhD code: DOT1335834 Coordinatore/Coordinator: Prof. Roberta BERNINI</p>
<p style="text-align: center;">Piano di attività/Activity plan</p>
<p>Data/Date 11/01/2024</p>
<p>Ciclo/Cycle XXXIX</p>
<p>Dottorando/PhD student Marco Costantini</p>
<p>Posizione/Position</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Con borsa di studio/With scholarship</p> <p><input type="checkbox"/> Senza borsa di studio/Without scholarship</p> <p><input type="checkbox"/> Riservata a dipendenti di enti di ricerca/Reserved for research center employees</p> <p><input type="checkbox"/> Dottorato industriale/Industrial PhD</p> <p><input type="checkbox"/> Altra tipologia/Other typology</p>
<p>Tutor/Supervisor Roberta Bernini</p>
<p>Affiliazione/Affiliation Università degli studi della Tuscia</p>
<p>Co-Tutor Marcello Donini</p>
<p>Affiliazione/Affiliation Centro Ricerche ENEA Casaccia – Laboratorio Biotecnologie</p>
<p>Sede prevalente dell'attività di ricerca/ Main place of research Centro Ricerche ENEA Casaccia</p>
<p>Titolo dell'attività di ricerca/Research title Sviluppo di vaccini e saggi diagnostici di nuova generazione per prevenire e controllare le malattie riproduttive infettive del bestiame</p>
<p>Breve descrizione dell'attività di ricerca/Short description of the research activity (Max 10.000 caratteri, spazi inclusi/Max 10000 characters, included spaces)</p> <p>La prima fase del progetto di ricerca verterà sulla produzione in pianta di vaccini contro patogeni zoonotici quali il virus Nipah, i cui serbatoi naturali sono i pipistrelli, e il batterio <i>C. burnetii</i>, agente eziologico della febbre Q che colpisce principalmente gli ovini. Nel dettaglio, contro il virus Nipah verrà prodotto l'anticorpo neutralizzante IgG-A2 isolato presso il Pirbright Institute (Woking, UK), partner del progetto europeo Reprodovac, mentre per <i>C. burnetii</i> sarà costruita ex novo e prodotta una proteina chimerica basata sull'antigene CirB di <i>C. burnetii</i> (isolato presso l'Istituto Moredun, UK, a partire da un microarray di peptide saggiati con il siero di animali infetti, la cui analisi ha dimostrato come CirB sia un antigene promettente per lo sviluppo di un vaccino contro <i>C. burnetii</i>). La proteina chimerica sarà ottenuta fondendo CirB con il dominio Fc di una IgG di pecora. Il dominio Fc nella proteina chimerica ha un duplice scopo: da un lato facilita l'adesione della proteina chimerica sulla superficie delle cellule APC mediante il legame con i corrispettivi recettori al fine di migliorare l'esposizione dell'antigene (CirB) alle cellule immunitarie; dall'altro, la sua elevata affinità per le proteine A e G, comunemente utilizzate in cromatografia di affinità, facilita i processi di purificazione del prodotto. Le sequenze codificanti la catena pesante (HC) e la catena leggera (LC) dell'anticorpo IgG-A2 e la proteina CirB-Fc saranno clonate singolarmente entro il vettore di espressione binario pBI; i vettori ricombinanti verranno quindi utilizzati per trasformare cellule di <i>A. tumefaciens</i>. Le colture trasformanti di <i>A. tumefaciens</i> saranno poi utilizzate per agroinfiltrare i tessuti fogliari di piante adulte di <i>N. benthamiana</i> per permettere l'espressione transiente dei geni di interesse. Per aumentare i livelli di espressione delle proteine eterologhe, verrà utilizzata la proteina p19 del virus MCV, in quanto è un inibitore del gene silencing nelle cellule vegetali. Le proteine ricombinanti verranno prodotte nella linea transgenica di <i>N. benthamiana</i> ΔXT/FT, difettiva per due specifiche glicosiltransferasi endogene, al fine di ottenere prodotti proteici con un profilo glucidico compatibile con l'utilizzo in cellule di mammifero. Verrà quindi verificata l'effettiva espressione dei prodotti mediante analisi Western blot ed ELISA</p>



sugli estratti proteici derivanti dalle foglie infiltrate. La frazione dei prodotti proteici di interesse contenuta negli estratti verrà quindi purificata mediante cromatografia di affinità e la loro struttura e il loro profilo di glicosilazione caratterizzati mediante MS/MS.

Nella seconda fase del progetto verrà testato in vitro il potere immunogenico dei prodotti purificati. Nel dettaglio, per quanto riguarda l'anticorpo IgG-A2 verrà effettuato un saggio di neutralizzazione in vitro attraverso cui valutarne l'efficienza rispetto a quella di un secondo anticorpo anti-Nipah attualmente prodotto in cellule di mammifero; l'efficacia della proteina chimerica CirB-Fc sarà invece testata mediante ELISA diretto, valutando la capacità della proteina di essere riconosciuta dai sieri di animali infetti.

Attività formative/Training activities

Attività programmate dal Collegio dei Docenti

Firma (Tutor)/Signature (Supervisor)

Roberto Bellini

Firma del Dottorando/Signature (PhD student)

Marco Costantini