



Studio e progettazione di una piattaforma biotecnologica a base vegetale per una produzione sostenibile dell'enzima ricombinante umano α -mannosidasi

Elisa Maricchiolo





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

α -mannosidosi: malattia da accumulo lisosomiale



Malattia genetica rara: colpisce 1:500.000 persone.



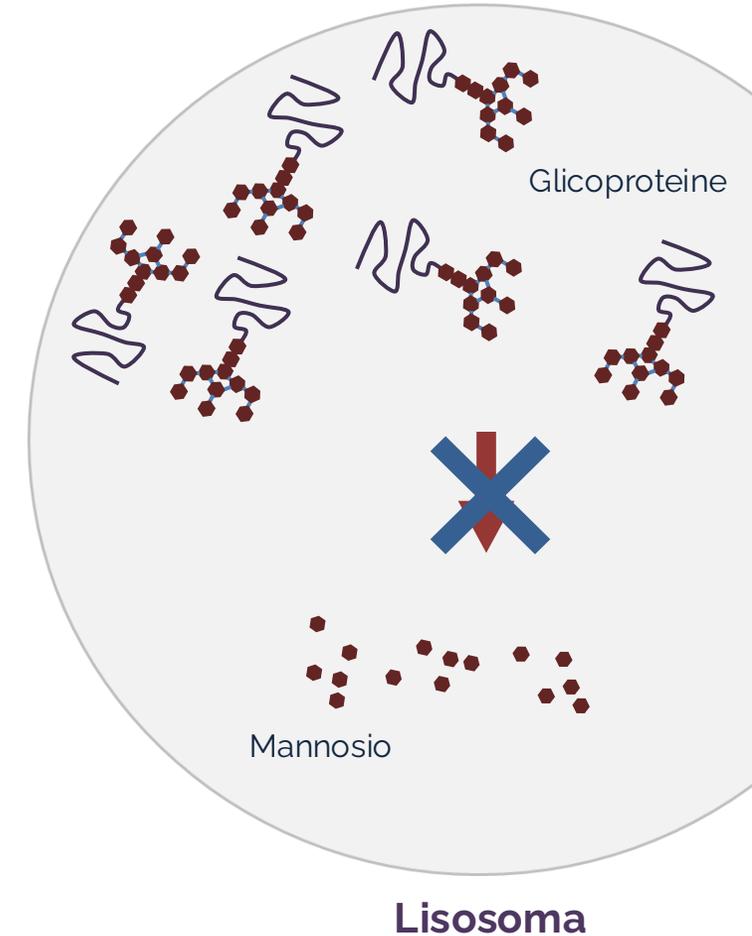
α -mannosidasi (MAN2B1) è una glicosidasi che scinde i residui di mannosio alfa-linkati durante la degradazione degli N-glicani delle glicoproteine.



La **mutazione del gene *MAN2B1*** sul cromosoma 19 causa una carenza dell'enzima lisosomiale, provocando la deposizione progressiva di oligosaccaridi nelle cellule umane.



Sintomi: Ritardo mentale e perdita dell'udito fin dalla prima infanzia, disfunzioni respiratorie, anomalie muscoloscheletriche.





α -mannosidasi

Organismo



Mammiferi



Piante

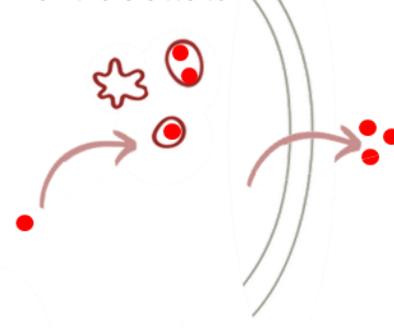
Modificazioni

N-glicosilazione,
ponti disolfuro,
zinc binding
formazione di omodimeri

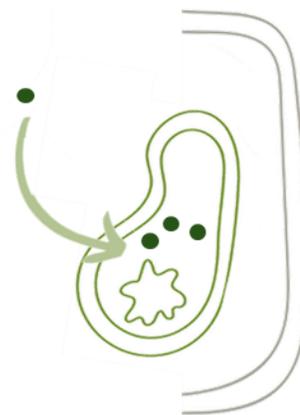


Localizzazione

Lisosomi e spazio
extracellulare



Vacuolo



Risultato

Molteplici frammenti proteolitici
con peso molecolare variabile da
15 a 70 kDa.

La proteina full-length viene parzialmente secreta dalle
cellule di mammifero
Strategia per la terapia?



Terapia enzimatica sostitutiva (ERT)

Produzione della proteina
ricombinante, purificazione e iniezione
endovenosa



Trapianto di midollo osseo (BMT)

Le cellule staminali sane del donatore
rilasciano l'enzima



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

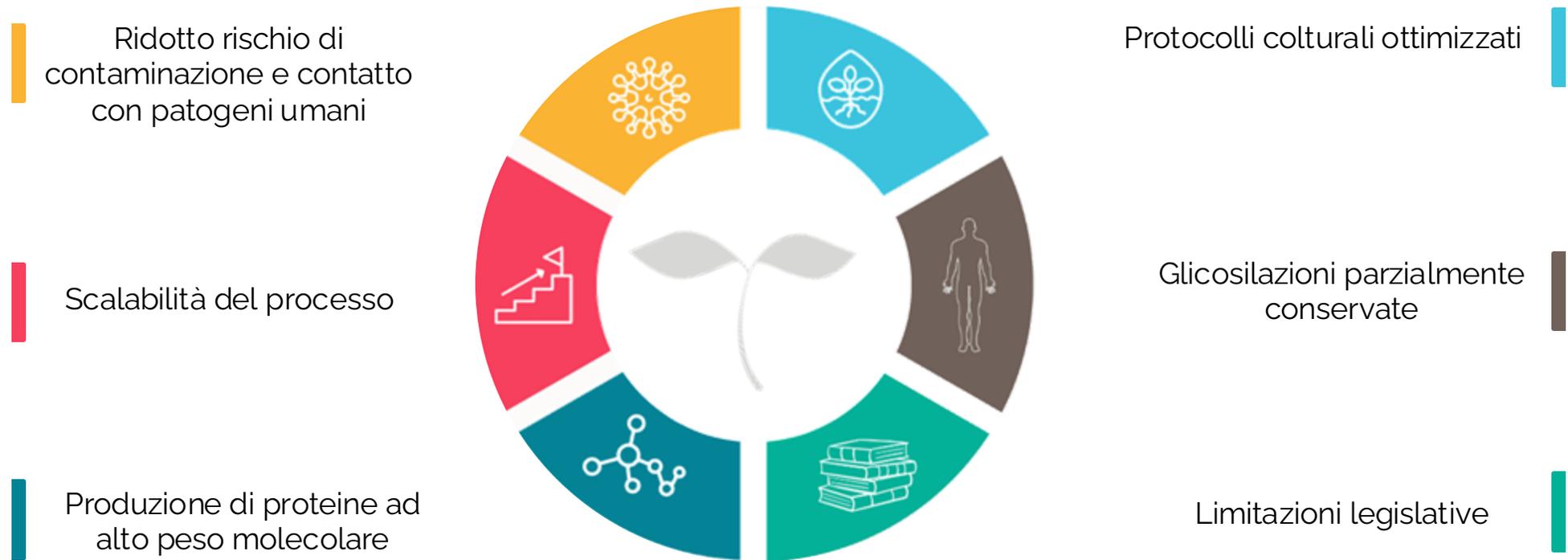


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Plant molecular farming

Possibile strategia per la produzione su larga scala della proteina ricombinante **α -mannosidasi**

Perché le piante?





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



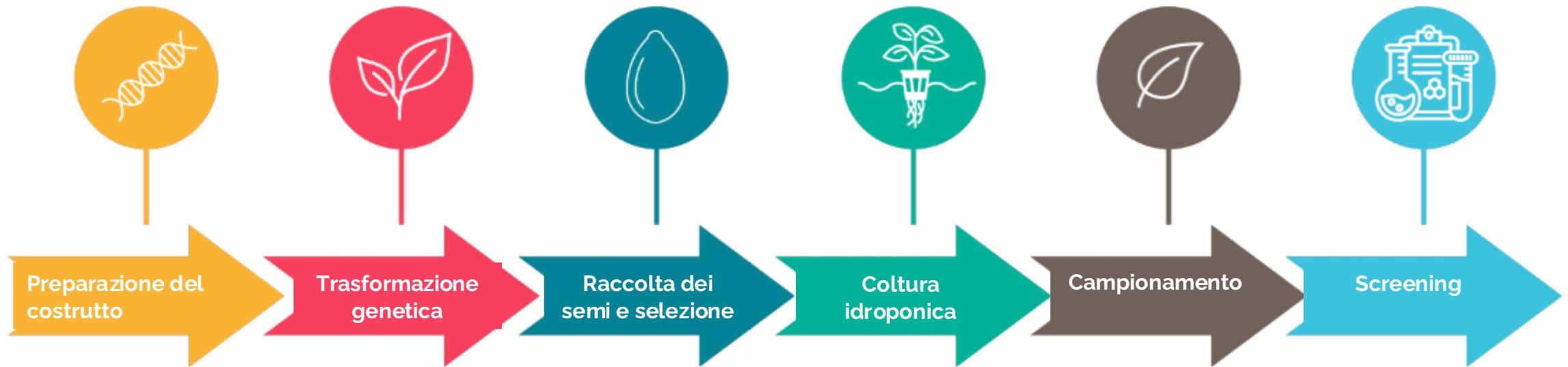
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

α -mannosidasi: produzione dell'enzima ricombinante MAN2B1 in pianta

Step principali:

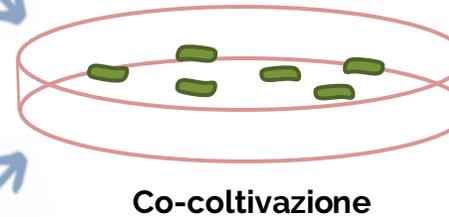
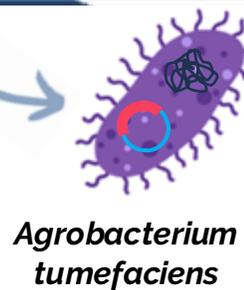




Preparazione del costrutto genetico e trasformazione in stabile

*Trasformazione mediata da
Agrobacterium tumefaciens*

Espianti fogliari di *Nicotiana tabacum*



Callogenesi e rigenerazione





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Coltura idroponica

Tecnica di coltivazione delle piante che utilizza una soluzione nutritiva a base di acqua anziché il terreno.

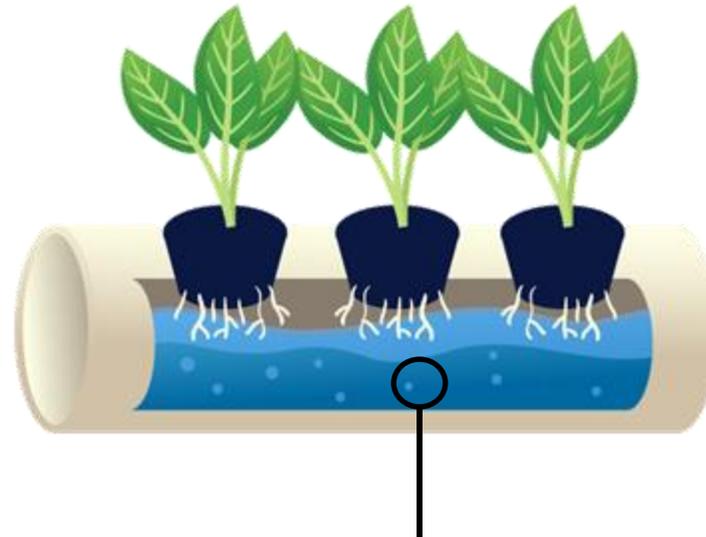


UNIVERSITÀ
di VERONA

Vantaggi:

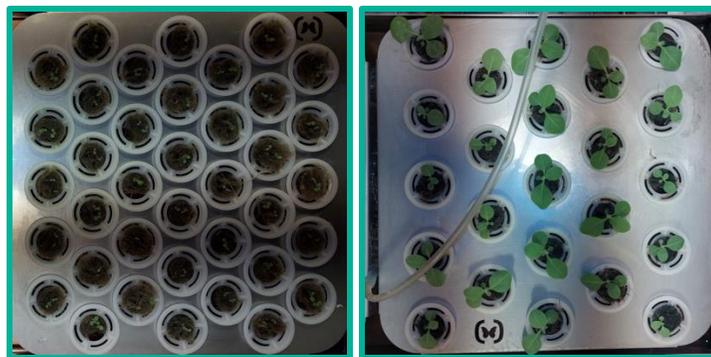
Controllo preciso dell'apporto di nutrienti

Ottimizzare la crescita e la produttività delle piante



Ridotto rischio di contaminazioni

Massimizzare l'efficienza del bioreattore vegetale



I parametri della soluzione idroponica vengono regolati ogni giorno:

pH 5.5

EC (Electrical conductivity) 2.4 mS/cm

Parametri fissi:

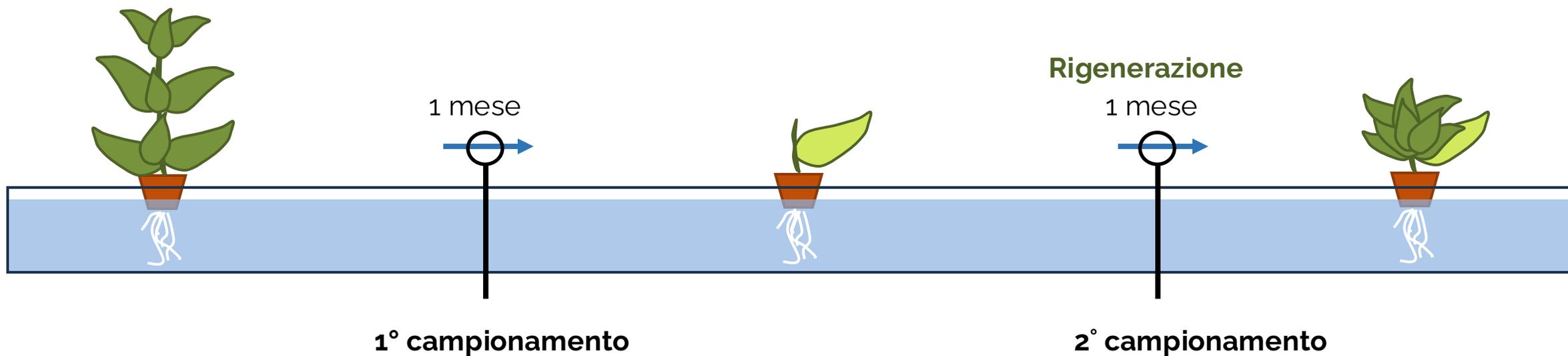
Fotoperiodo 12h light/12h dark

Intensità luminosa 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$





Campionamento



Tutte le foglie
della pianta
**campionate
insieme**
(P₁, P₂, P₃, P₄)



Raccolta delle
foglie a **diversi
livelli della pianta**
Bottom(B),
Medium(M) e
Top(T)



Dopo il primo taglio, le
piante vengono
mantenute in coltura e
le **foglie ottenute
dalla rigenerazione**
vengono campionate
insieme (Prig)





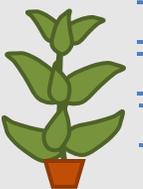
Legenda

- **Pianta intera**



Foglie della pianta
campionate insieme
P(n)

- **Pianta divisa in livelli:**



Top; **P(n)T**
Medium; **P(n)M**
Bottom; **P(n)B**

- **Pianta rigenerata:**



Foglie della pianta
rigenerata
campionate insieme
Prig

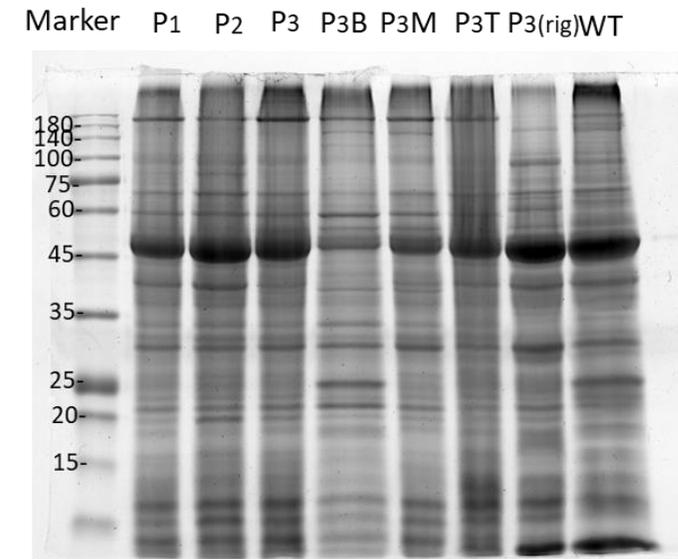
Screening

Estrazione delle proteine solubili totali (TSP)



Le foglie vengono grindate con
azoto liquido ed omogenate

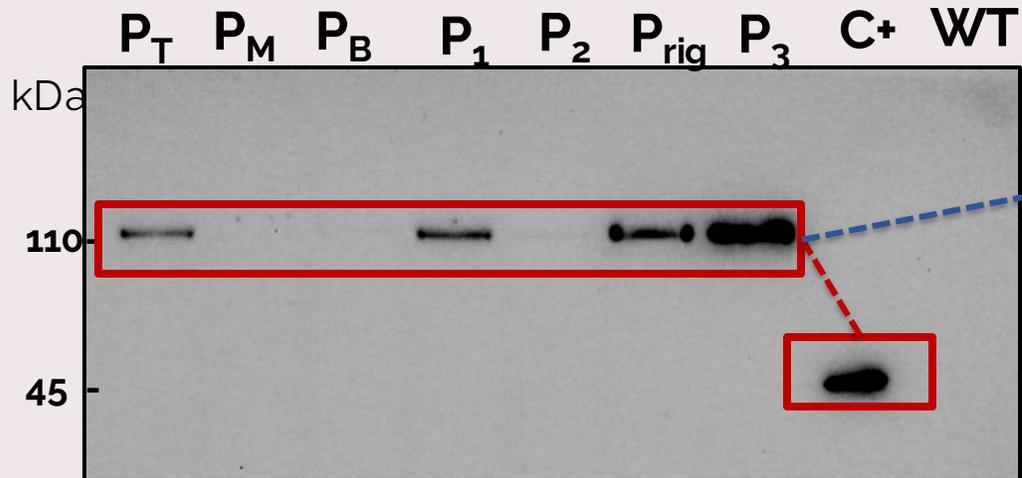
SDS-Page



Sono stati testati diversi sistemi di estrazione: i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando il tampone di omogeneizzazione + **4% di B-mercaptoetanololo**.



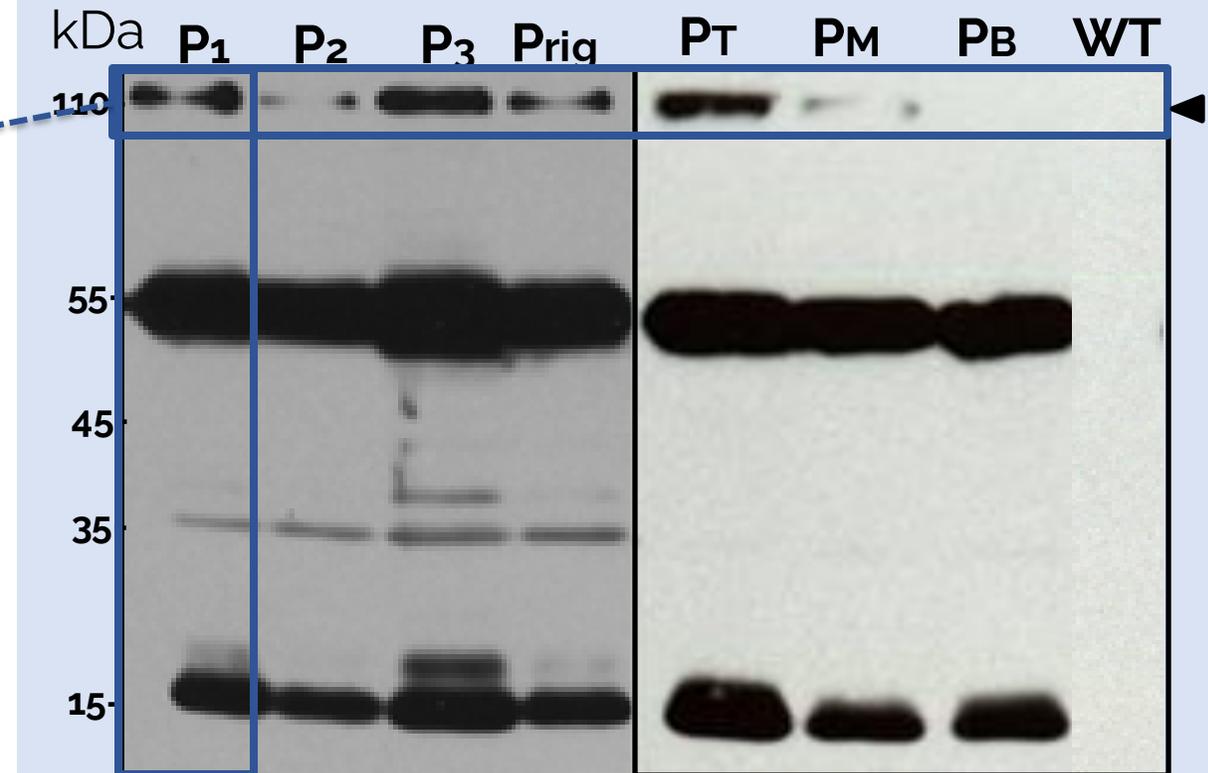
Monoclonale Anti-FLAG



Legenda dei campioni:

- P(n)**- tutte le foglie della pianta vengono campionate insieme
- PT** - foglie campionate all'apice della pianta
- PM** - foglie campionate al livello medio della pianta
- PB** - foglie campionate al livello basale della pianta
- Prig** - tutte le foglie della pianta rigenerata campionate insieme

Policlonale Anti- α -mannosidasi



% α -mannosidasi/TSP
(Stima densitometrica tramite ImageJ)

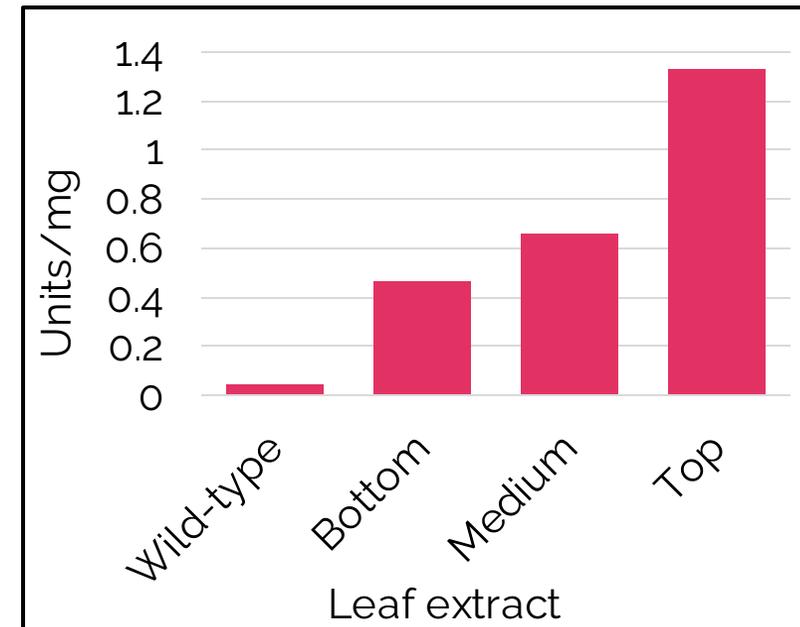


Risultati

La **quantificazione densitometrica** (ImageJ Fiji App) ha rivelato una produzione dell'1,2% di MAN2B1 ricombinante in alcune piante.

Sample	% α -mannosidasi/TSP
P ₁	0,32
P ₂	0,05
P ₃	1,22
P _{rig}	1,06
P _T	0,19
P _M	0,39
P _B	0,37
WT	n.d.

Analisi preliminari dell'**attività enzimatica** mediante test fluorimetrico hanno confermato una maggiore attività della proteina α -mannosidasi nelle foglie più giovani.





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Conclusioni



L' α -mannosidasi lisosomiale ricombinante può essere isolata da piante di tabacco coltivate in idroponica: ciò rappresenta una **nuova frontiera per la produzione su larga scala** di questa proteina.



La quantificazione dell' α -mannosidasi ha rivelato quantità simili nelle foglie campionate a diversi livelli: la differenza sta nel processo di maturazione



Caratterizzazione della sintesi e purificazione di MAN2B1 nelle piante per **ottimizzare la terapia enzimatica sostitutiva** contro la malattia α -mannosidosi



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU

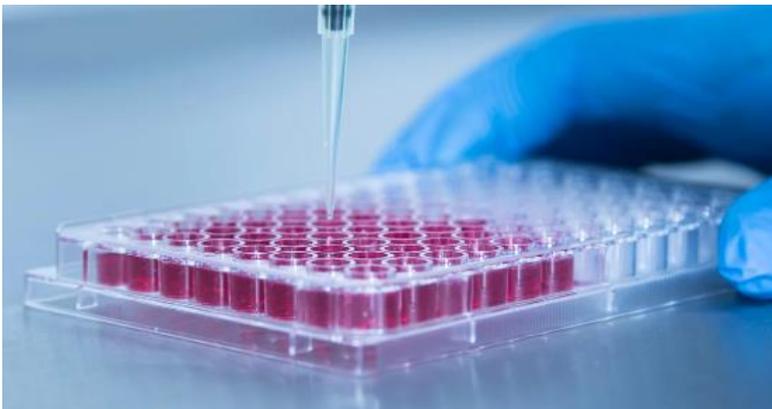


Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Prospettive future



Esplorare la produzione di questo enzima in **colture cellulari** vegetali

Valutare l'attività enzimatica della proteina estratta, assicurandone la **funzionalità e l'idoneità** all'uso terapeutico.

Test *in vivo* su cellule di mammifero per valutare l'efficacia dell'enzima e il suo potenziale di integrazione nelle strategie terapeutiche per il trattamento dell' α -mannosidosi.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Ringraziamenti



ORTO BOTANICO
URBINO

Prof. Andrea Pompa,
Prof.ssa Michela Osnato,
Pasquale Creanza

Dipartimento di Scienze Biomolecolari,
Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo",
Italia



Prof. Matteo Ballottari,
Prof. Nico Betterle,
Kristina Ljumovic

Dipartimento di Biotecnologie,
Università di Verona, Italia



Dott. Michele Bellucci,
Dott.ssa Francesca De Marchis,
Istituto di Bioscienze e Biorisorse
(IBBR, CNR) Perugia, Italia

Grazie per l'attenzione

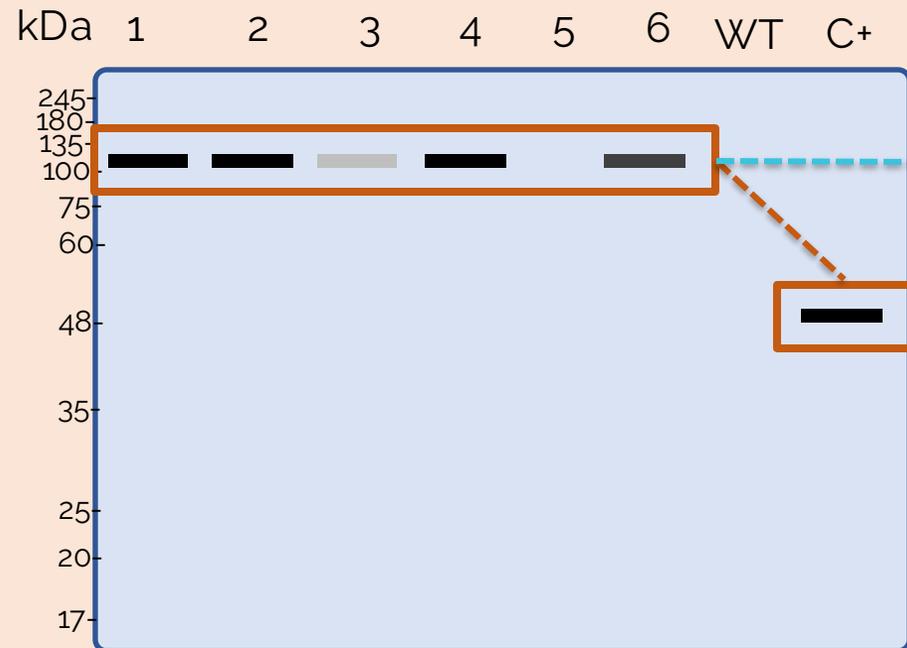
Supplementari



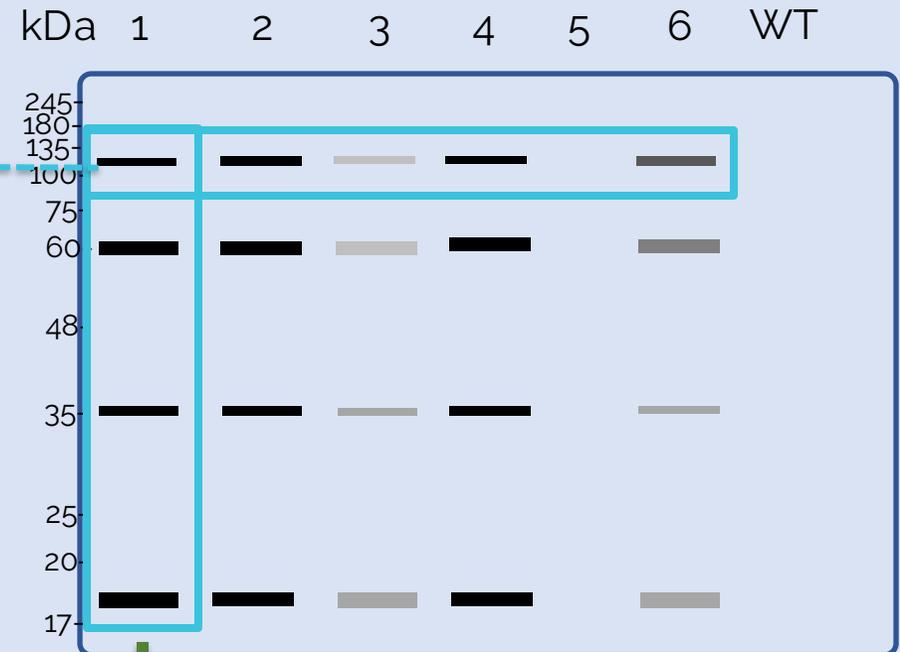
Sample screening

Western Blot analysis

Anti-FLAG monoclonal antibody



Anti-alpha-mannosidase polyclonal antibody



Total alpha-mannosidase amount