

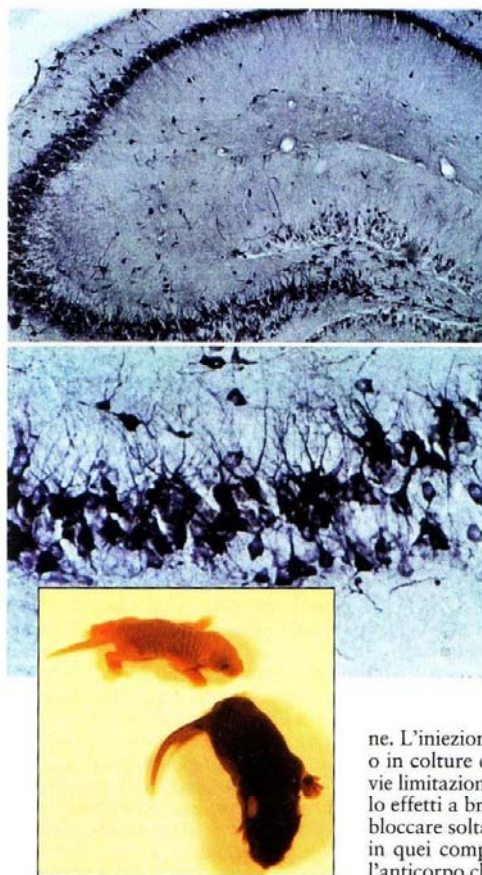
Anticorpi intracellulari

di Silvia Biocca e Antonino Cattaneo

La crescita esponenziale delle informazioni sulle sequenze di nuovi geni acquisite nei laboratori di tutto il mondo nell'ambito del Progetto Genoma sta rendendo sempre più rilevante il problema di comprendere la funzione di ciascuna delle proteine codificate dai singoli geni. Seguendo l'esempio classico fornito dallo studio delle mutazioni genetiche, possiamo oggi cercare di comprendere la funzione di una proteina inibendo in maniera controllata la sua azione, una metodica chiamata in gergo tecnico *knock-out* nei confronti di tale proteina. Si può interferire in modo efficace e mirato con l'attività biologica delle proteine che si vogliono studiare sia a livello genotipico (del DNA) sia a livello fenotipico (dell'mRNA o della proteina), e ciò può servire non solo a studiarne le funzioni, ma anche a conferire alla cellula una proprietà fenotipica d'interesse applicativo come, per esempio, la resistenza a un virus patogeno. Si parla in questo caso di immunizzazione intracellulare.

Anticorpi ricombinanti all'interno della cellula

Già negli anni sessanta Rita Levi-Montalcini aveva iniettato in ratti neonati anticorpi in grado di competere con l'attività biologica del fattore di crescita delle cellule nervose (*nerve growth factor*, o NGF), ottenendo così la distruzione del sistema nervoso simpatico e dimostrando formalmente che le cellule del sistema nervoso simpatico dipendono dall'NGF per la loro sopravvivenza. L'importanza di questi esperimenti consiste anche nell'aver fornito una dimostrazione dell'utilità degli anticorpi come strumenti per interferire con l'attività biologi-



L'espressione dell'anticorpo ricombinante diretto contro l'NGF nelle cellule del sistema nervoso di un topo transgenico permette di studiare gli effetti della neutralizzazione dell'NGF. Le fotografie qui a fianco mostrano due successivi ingrandimenti di una sezione di ippocampo ottenuta da un topo transgenico di 2 mesi, colorata in modo da evidenziare l'espressione di anticorpi ricombinanti anti-NGF nei neuroni. In basso sono ripresi due topi della stessa nidiata: come si può notare, solo il più piccolo, che esprime l'anticorpo ricombinante anti-NGF, ha sviluppato una complessa sindrome neuromuscolare dovuta alla neutralizzazione dell'attività di NGF.

ca di proteine bersaglio presenti nell'ambiente extracellulare del sistema nervoso.

Questo approccio è stato anche utilizzato con successo per bloccare l'attività di proteine intracellulari, mediante la microiniezione di anticorpi nel citoplasma di cellule di varia origi-

ne. L'iniezione di anticorpi in animali o in colture di cellule ha tuttavia ovvie limitazioni: si possono studiare solo effetti a breve termine e si possono bloccare soltanto gli antigeni presenti in quei compartimenti accessibili all'anticorpo che viene iniettato.

In particolar modo, dopo la scoperta del metodo degli anticorpi monoclonali da parte di Koehler e Milstein nel 1976 (si veda l'articolo *Gli anticorpi monoclonali* di Cesar Milstein in «Le Scienze» n. 148, dicembre 1980), il repertorio virtualmente illimitato di molecole anticorpali è stato sfruttato come sorgente di reagenti

Una nuova tecnologia di knock-out fenotipico e immunizzazione intracellulare non solo consentirà di studiare le funzioni delle proteine, ma potrà rendere le cellule resistenti agli organismi patogeni

specifici più controllati e riproducibili. La natura modulare degli anticorpi, unitamente alle loro proprietà di universalità e di specificità nel riconoscimento chimico, rende queste molecole uno strumento ideale per molte applicazioni scientifiche e terapeutiche. Lo sfruttamento applicativo degli anticorpi ha fatto nascere l'attivistissimo campo delle immunotecnologie.

La tecnologia degli ibridomi ha avuto un enorme successo non solo perché ha permesso di isolare una vasta gamma di reagenti anticorpali sotto forma di molecole proteiche pure, ma anche perché, grazie agli sviluppi della tecnologia del DNA ricombinante, ha permesso di clonare e manipolare i geni che codificano per gli anticorpi corrispondenti.

L'organizzazione strutturale degli anticorpi in domini funzionali separati e indipendenti tra di loro li rende particolarmente accessibili alle modificazioni realizzabili mediante ingegneria proteica. In particolare, i domini funzionali che legano l'antigene (le regioni variabili dell'anticorpo) possono essere separati dai domini che mediano le funzioni effettrici (le regioni costanti dell'anticorpo) ed essere combinati artificialmente tra di loro o uniti a domini proteici di varia natura, per formare nuove molecole anticorpali con proprietà di riconoscimento specifico accoppiate a funzioni effettrici nuove, in forme limitate solo dalla fantasia.

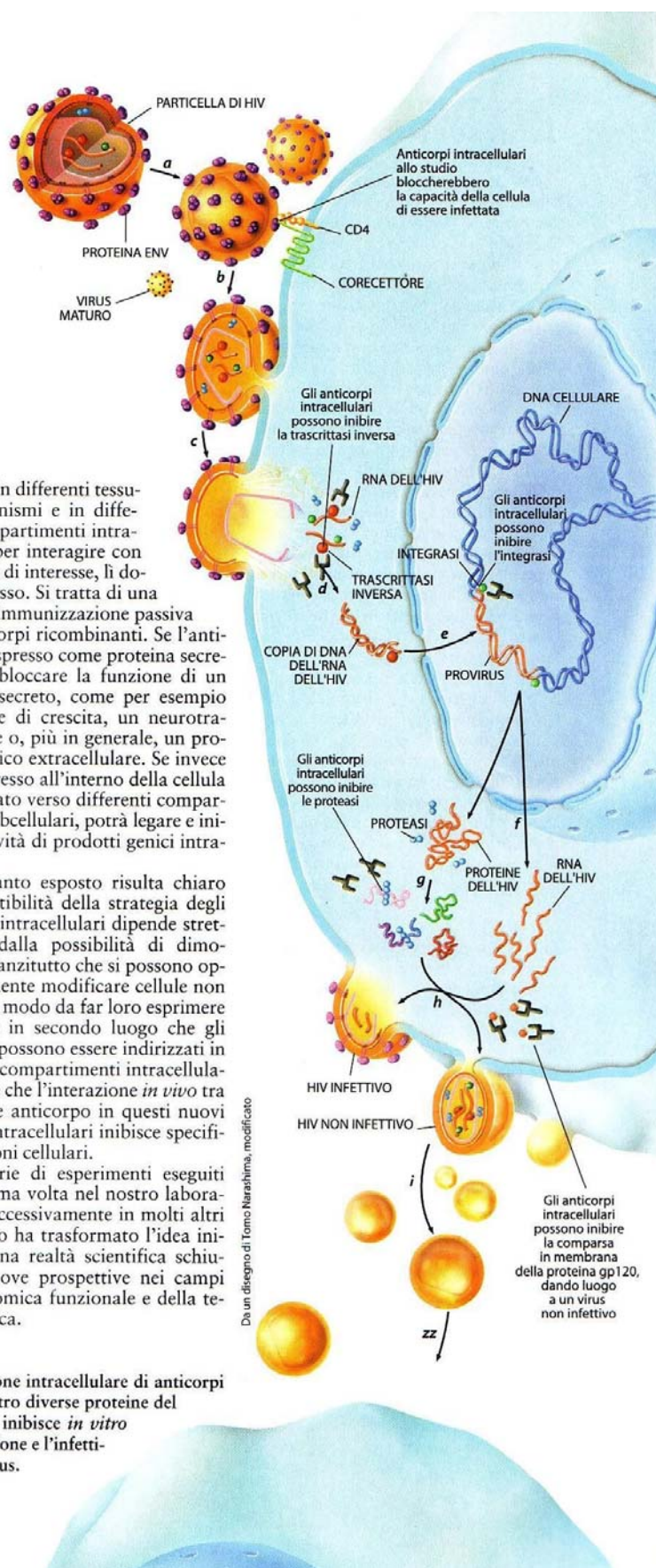
L'idea di far esprimere gli anticorpi in siti diversi dal consueto (espressione ectopica) si basa proprio sulla possibilità di manipolare i geni per gli anticorpi in modo da ottenere nuove molecole più efficaci e permettere la loro espressione in una grande varietà di cellule non linfoidi. Questo tipo di espressione anticorpale può essere

ottenuto in differenti tessuti o organismi e in differenti compartimenti intracellulari per interagire con l'antigene di interesse, lì dove è espresso. Si tratta di una forma di immunizzazione passiva con anticorpi ricombinanti. Se l'anticorpo è espresso come proteina secreta potrà bloccare la funzione di un antigene secreto, come per esempio un fattore di crescita, un neurotrasmettitore o, più in generale, un prodotto genico extracellulare. Se invece viene espresso all'interno della cellula e indirizzato verso differenti compartimenti subcellulari, potrà legare e inibire l'attività di prodotti genici intracellulari.

Da quanto esposto risulta chiaro che la fattibilità della strategia degli anticorpi intracellulari dipende strettamente dalla possibilità di dimostrare innanzitutto che si possono opportunamente modificare cellule non linfoidi in modo da far loro esprimere anticorpi; in secondo luogo che gli anticorpi possono essere indirizzati in differenti compartimenti intracellulari, e infine che l'interazione *in vivo* tra antigene e anticorpo in questi nuovi contesti intracellulari inibisce specifiche funzioni cellulari.

Una serie di esperimenti eseguiti per la prima volta nel nostro laboratorio e successivamente in molti altri nel mondo ha trasformato l'idea iniziale in una realtà scientifica schiudendo nuove prospettive nei campi della genomica funzionale e della terapia genica.

L'espressione intracellulare di anticorpi diretti contro diverse proteine del virus HIV inibisce *in vitro* la replicazione e l'infezione del virus.



Anticorpi secreti da cellule nervose

Normalmente gli anticorpi sono proteine secrete dalle cellule linfoidi. Per ottenere l'espressione di anticorpi in cellule di altro tipo occorre modificare il gene in modo che le sequenze geniche regolatrici non codificanti siano sostituite da analoghe sequenze permissive per la cellula su cui si intende agire. Il gene chimérico così modificato deve quindi essere trasferito per venire espresso nel nuovo contesto cellulare. Le cellule del sistema nervoso si sono dimostrate particolarmente efficienti nella secrezione di anticorpi funzionali ed è stato così possibile creare modelli animali in cui i geni che codificano per anticorpi specifici sono stati espressi nel sistema nervoso di topi transgenici, dove interagiscono con la proteina corrispondente inibendone la funzione. (Gli anticorpi così ottenuti prendono il nome di neuroanticorpi, mentre il risultato inibitorio è detto *knock-out* fenotipico.)

Questo approccio, ispirato agli studi originali di Rita Levi-Montalcini, non è ovviamente limitato al sistema nervoso, ma può essere esteso in particolar modo a tutti quegli organismi o tessuti nei quali il metodo genetico non è utilizzabile. Nel nostro laboratorio sono state prodotte linee di topi transgenici che esprimono nel sistema nervoso anticorpi diretti contro il neuropeptide sostanza P e contro l'NGF, ottenendo

così modelli sperimentali per lo studio del fenotipo derivante dal blocco dell'azione biologica di tali molecole.

Verso gli organelli cellulari

Le conoscenze acquisite nel campo del traffico intracellulare si sono dimostrate utili per trattenere gli anticorpi dentro la cellula e indirizzarli in compartimenti subcellulari differenti. (Lo scienziato Günter Blobel è stato il pioniere proprio di questi studi sul traffico intracellulare per i quali è stato insignito quest'anno del Nobel per la medicina.) Molte proteine raggiungono la loro destinazione cellulare appropriata mediante specifiche sequenze peptidiche di indirizzamento, che ne determinano la precisa localizzazione cellulare e, di conseguenza, il ripiegamento, la maturazione e la degradazione. Molti di questi segnali sono autonomi e dominanti, cioè possono essere artificialmente inseriti in una proteina estranea conferendole le proprietà di localizzazione della proteina di origine.

Il traffico intracellulare di una proteina va incontro a una serie di scelte gerarchiche successive. In prima istanza, la presenza della cosiddetta sequenza segnale di secrezione nella porzione N-terminale di una proteina ne determina la traslocazione all'interno del reticolo endoplasmatico. Questo consente a una proteina secretoria di risolvere il problema dell'attraversamento della

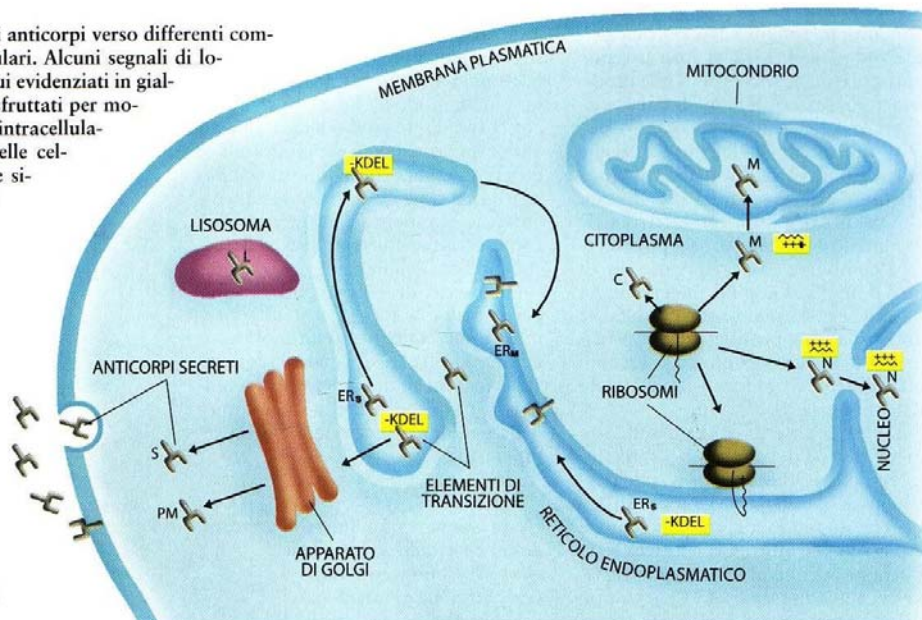
membrana plasmatica per passare nel mezzo extracellulare. La presenza di ulteriori segnali, oltre alla sequenza segnale per la secrezione, determina la successiva localizzazione in differenti tratti della via cellulare secretoria (nel reticolo endoplasmatico, nei compartimenti del Golgi, in vescicole di varia natura, nei lisosomi e così via) o la comparsa sulla membrana plasmatica.

In assenza della sequenza segnale per la secrezione, la proteina viene sintetizzata nel citoplasma, da dove può raggiungere, grazie a specifici segnali, altri compartimenti subcellulari e altri organelli (nucleo, mitocondri, porzione citoplasmatica della membrana plasmatica eccetera). Le proprietà di questi segnali sono state sfruttate per deviare o, come si usa dire, reindirizzare anticorpi e frammenti anticorpali verso diversi compartimenti intracellulari.

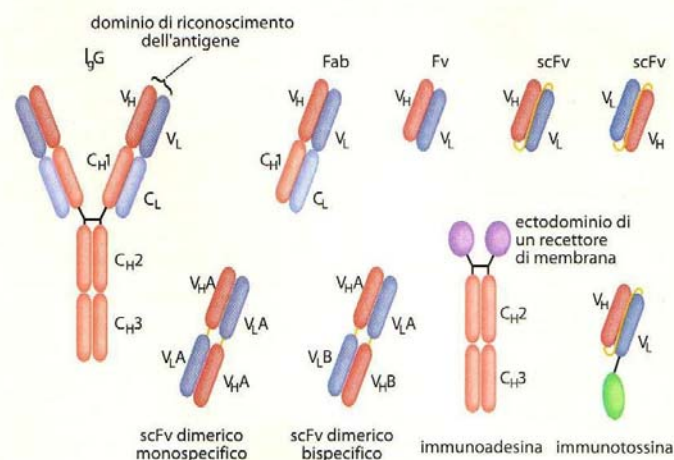
Negli esperimenti iniziali, condotti alla fine degli anni ottanta, si sono utilizzati segnali di localizzazione citoplasmatica e nucleare per reindirizzare immunoglobuline complete, cioè molecole anticorpali costituite da due catene pesanti e due leggere. Questi esperimenti hanno dimostrato che è possibile reindirizzare anticorpi funzionalmente associati verso compartimenti cellulari differenti da quello secretorio.

Nel sistema immunitario i domini costanti di un anticorpo hanno funzioni effettrici che non sono però sfruttabili nel contesto intracellulare. Per questo motivo, si preferisce utilizzare porzioni di anticorpi che preservino il do-

Indirizzamento degli anticorpi verso differenti compartimenti intracellulari. Alcuni segnali di localizzazione noti - qui evidenziati in giallo - possono essere sfruttati per modificare il traffico intracellulare degli anticorpi nelle cellule eucariotiche. Le sigle poste accanto agli anticorpi indicano i rispettivi compartimenti cellulari di destinazione: N, nucleo; C, citoplasma; ER, reticolo endoplasmatico; ER_M ed ER_S, rispettivamente reticolo endoplasmatico della membrana e solubile; M, mitocondrio; PM, membrana plasmatica; S, vescicola di secrezione.



Gli anticorpi ricombinanti

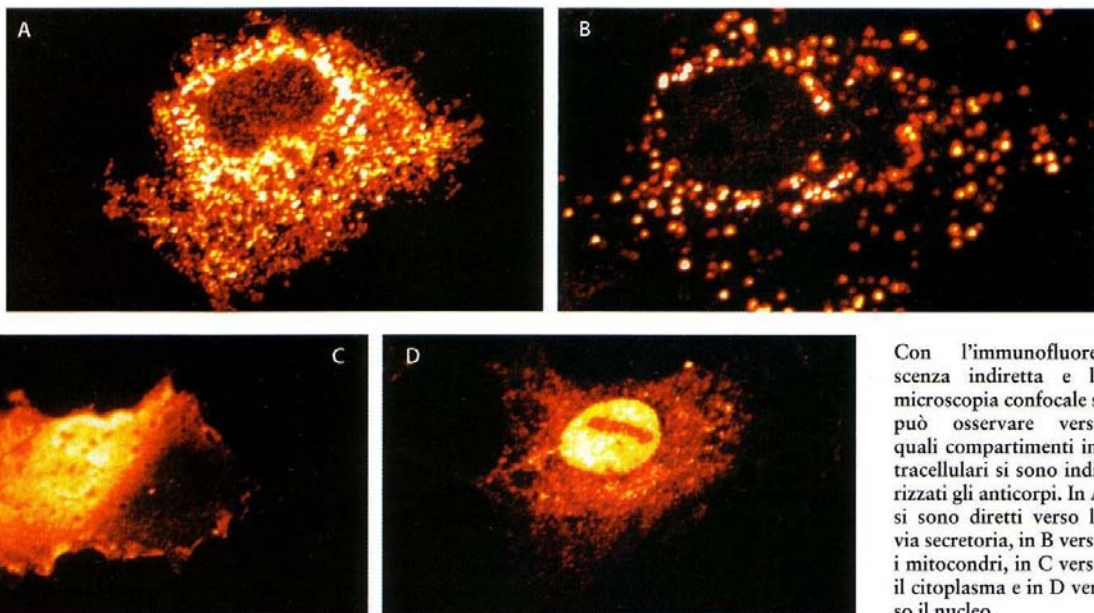


Un anticorpo è composto da due catene pesanti (H) e due catene leggere (L), con le due regioni di riconoscimento dell'antigene formate dalle regioni variabili della catena pesante (VH) e della catena leggera (VL). Il frammento anticorpale (Fab) è formato dall'unione VH-CH1/VL-CL e in questo caso è monovalente nella sua capacità di legare l'antigene. Unità di riconoscimento monovalenti possono essere create dall'unione delle regioni variabili, associate sia in modo non covalente (Fv) sia tramite un peptide di collegamento (scFv o frammento Fv a singola catena). I frammenti scFv rappresentano l'unità base più utilizzata per la costruzione di anticorpi monospecifici monovalenti, anticorpi bispecifici, immunotossine e immunoconjugati di varia natura. Frammenti Fc possono essere uniti a domini di riconoscimento non anticorpali, provenienti per esempio da ectodomini di recettori di membrana (immunoadesine).

minio di riconoscimento dell'antigene, come i frammenti a singola catena (scFv). Essi si sono dimostrati più versatili degli anticorpi completi e attualmente sono i più utilizzati per l'espressione all'interno della cellula. La distribuzione intracellulare di frammenti scFv indirizzati verso l'apparato secretorio, rilevata con immunofluorescenza indiretta e microscopia confocale, è mostrata nel riquadro A della figura di questa pagina in basso. In C si vede come la rimozione della sequenza di secrezione impedisca la traslocazione del frammento scFv nel reticolo e ne determini l'espressione nel citoplasma. Se si aggiungono i segnali di localizzazione nucleare e mitocondriale, si ottengono frammenti scFv che si distribuiscono nei nuclei (D) e nei mitocondri (B).

Costruire cellule resistenti alle malattie

La prima dimostrazione dell'efficacia degli anticorpi intracellulari è stata ottenuta nel nostro laboratorio utilizzando un anticorpo diretto contro la proteina p21Ras, un proto-oncogene localizzato sulla faccia citoplasmatica della membrana plasmatica e coinvolto in modo essenziale nella trasduzione di segnali che regolano la crescita e la proliferazione cellulare. Forme oncogeniche di questa proteina sono presenti in un'alta percentuale di tumori e portano a una crescita cellulare incontrollata. L'espressione intracellula-



Con l'immunofluorescenza indiretta e la microscopia confocale si può osservare verso quali compartimenti intracellulari si sono indirizzati gli anticorpi. In A si sono diretti verso la via secretoria, in B verso i mitocondri, in C verso il citoplasma e in D verso il nucleo.

re negli oociti di *Xenopus laevis* di un anticorpo ricombinante diretto contro la proteina p21Ras si è dimostrata in grado di inibire la maturazione meiotica indotta dall'insulina, un complicato processo biologico che dipende in modo essenziale dalla funzionalità della proteina p21Ras. Così pure, l'espressione nel citoplasma di cellule di mammifero di anticorpi intracellulari diretti contro p21Ras blocca la loro proliferazione in risposta a fattori di crescita (si veda la figura a pagina 93).

La strategia della immunizzazione intracellulare ha trovato molti campi di applicazione che vanno dalla terapia genica somatica di patologie virali e tumorali, alle biotecnologie vegetali e alla ricerca di base. L'uso degli anticorpi intracellulari in terapia genica rappresenta una forma di «immunizzazione passiva» in cui i geni che codificano per gli anticorpi sono forniti dall'esterno. Così come fanno i più recenti vaccini genetici (si veda il numero di ottobre di «Le Scienze»), i geni per gli anticorpi intracellulari possono essere introdotti nelle cellule dell'organismo anche mediante iniezioni di DNA o RNA. In alternativa si possono utilizzare vettori di tipo virale o retrovirale.

L'applicazione con potenzialità terapeutica di maggiore successo è stata finora la creazione di cellule umane resistenti all'infezione e alla replicazione del virus HIV. Questo risultato è stato ottenuto mediante espressione di frammenti anticorpali diretti contro proteine virali nella via secretoria (gp120) o nel citoplasma e nel nucleo (trascrittasi inversa, rev, tat, integrasi). Alcuni anticorpi bloccano la replicazione, l'integrazione e/o l'assemblaggio del virus, mentre altri (come per esempio gli anticorpi anti-gp120) danno luogo alla formazione di particelle virali non infettive. In ogni caso, l'espressione di tali anticorpi impartisce un'efficace protezione delle cellule, messe a contatto con il virus HIV in coltura.

È prevedibile che l'espressione contemporanea di più anticorpi intracellulari, diretti contro proteine differenti e reindirizzati verso i compartimenti opportuni, possa aumentarne l'efficacia terapeutica (approccio combinato). La valutazione clinica di questa metodologia è tuttora in corso e prevede l'introduzione *ex vivo* dei geni per anticorpi intracellulari in cellule staminali del sistema ematopoietico, o in linfociti periferici, e la reintroduzione delle cellule modificate nei pazienti (si veda lo Speciale AIDS in «Le Scienze» n. 361, settembre 1998).

Le patologie tumorali rappresentano un naturale campo di applicazione

degli anticorpi intracellulari, per la loro capacità di inibire la proliferazione cellulare, come dimostra l'inibizione della proteina p21Ras. Studi successivi hanno dimostrato che è possibile bloccare l'esposizione sulla superficie cellulare di recettori di membrana coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento del fenotipo tumorale, quali il recettore erb-B 2, il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) o il recettore per l'interleuchina 2.

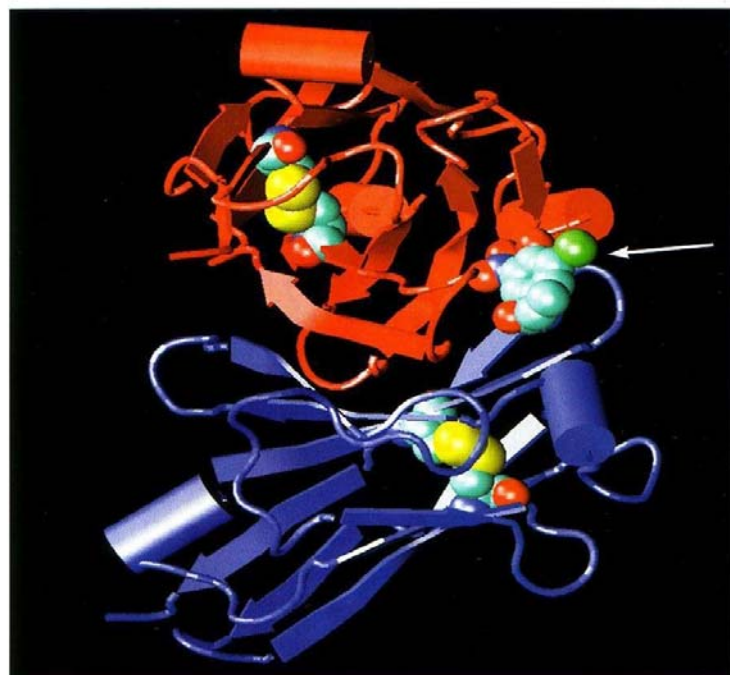
In questo caso, anticorpi intracellulari diretti contro tali recettori - e trattenuti nel reticolo endoplasmatico da segnali di ritenzione costituiti dai quattro amminoacidi carbossiterminali: lisina, acido aspartico, acido glutammico e leucina (in sigla KDEL) - impediscono il normale traffico dei recettori stessi verso la superficie esterna della cellula (si veda la figura a pagina 88).

La tecnologia degli anticorpi intracellulari ha trovato nelle biotecnologie vegetali un'applicazione particolarmente promettente. Infatti le piante si sono dimostrate un sistema particolarmente versatile per l'espressione di anticorpi ricombinanti anche intracellu-

lari. Quest'ultima tecnica è stata usata con successo nelle piante transgeniche per conferire loro la resistenza a un virus patogeno.

Come agiscono gli anticorpi intracellulari

In linea di principio, gli anticorpi intracellulari possono modulare la fisiologia e il metabolismo della cellula mediante diversi meccanismi d'azione. Per esempio, il legame di un anticorpo può essere usato per neutralizzare direttamente un sito attivo della proteina bersaglio. In questo caso, essi sono competitori, o inibitori dominanti negativi dell'antigene. In un altro meccanismo d'azione, essi possono agire in modo più indiretto, fuorviando il normale traffico dell'antigene intracellulare. Questo è il caso dei recettori di membrana, la cui esposizione sulla superficie cellulare può essere bloccata dall'interazione con un anticorpo intracellulare trattenuto, con un segnale di ritenzione opportuno, nel reticolo endoplasmatico. In questo caso gli an-



Struttura di un frammento anticorpale a catena singola legato all'antigene (NIP, 4-idrossi-5-iodo-3-nitrofenilacetato, freccia bianca). Le regioni variabili sono mostrate in rosso e in viola. Le frecce indicano i foglietti beta e i cilindri le regioni ad alfa elica. Gli atomi di zolfo, che formano i due ponti disolfuro che connettono i residui di cisteina in ciascun dominio anticorpale, sono mostrati in giallo, mentre gli atomi in rosso rappresentano l'ossigeno, quelli in azzurro il carbonio, in verde lo iodio e in blu l'azoto.

ticorpi agiscono come ancore intracellulari. In prospettiva, si può ipotizzare di dotare gli anticorpi di funzioni effettive particolari, adattate alle condizioni intracellulari. Per esempio, l'introduzione di sequenze segnale per la degradazione proteolitica potrebbe trasformarli in anticorpi suicidi, indirizzando il complesso antigene-anticorpo verso compartimenti di degradazione intracellulare.

Gli anticorpi, come entità leganti, agiscono stechiometricamente. L'impiego intracellulare di anticorpi con attività catalitica (si veda l'articolo *Anticorpi catalitici* in «Le Scienze» n. 237, maggio 1988), intrinseca o introdotta mediante fusione dei domini anticorpali con enzimi, rappresenta una prospettiva di notevole interesse, soprattutto se accoppiata con metodi di selezione metabolica, sulla base dell'attività catalitica degli anticorpi intracellulari.

Il problema del ripiegamento

Il successo della tecnologia degli anticorpi intracellulari dipende in modo

cruciale dalla capacità dei domini anticorpali di ripiegarsi correttamente nei differenti compartimenti cellulari dove vengono indirizzati. In generale, il ripiegamento delle proteine è un processo che coinvolge condizioni fisico-chimiche e proteine di supporto (ciaperonine) proprie del compartimento cellulare dove ciascuna proteina viene sintetizzata e indirizzata.

Non in tutti i compartimenti intracellulari vi sono le condizioni ottimali per il ripiegamento degli anticorpi. Normalmente, la biosintesi degli anticorpi avviene nel reticolo endoplasmatico, ed è un processo che viene regolato da enzimi e proteine specifiche e favorito dall'ambiente chimico.

Nel citoplasma l'assenza di ciaperonine specifiche e l'ambiente riducente inibiscono la formazione dei ponti disolfuro tra residui di cisteina, che rappresentano un aspetto strutturale di notevole importanza per il ripiegamento e la stabilità dei frammenti anticorpali (si veda l'illustrazione in alto a pagina 90, nella quale sono evidenziati i residui di cisteina), e rendono talora poco effi-

cienti le condizioni di ripiegamento di alcuni anticorpi in questo compartimento.

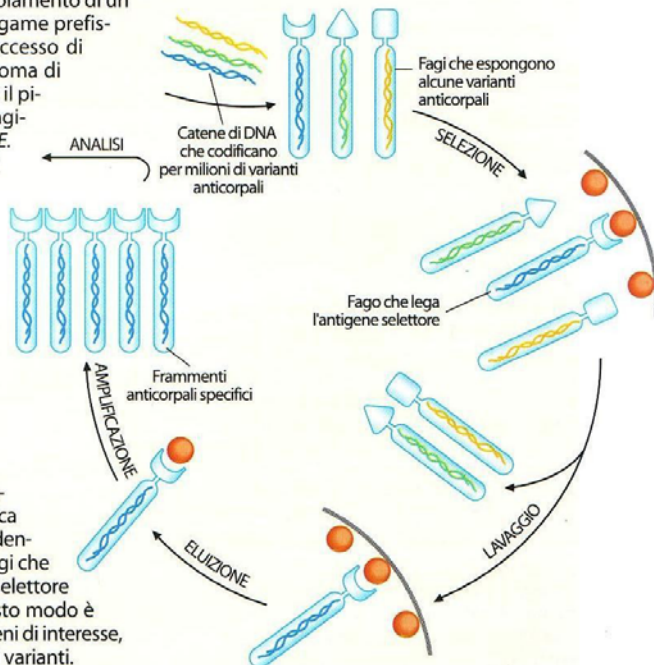
Lo studio del contributo dei ponti disolfuro alla stabilità e al ripiegamento delle regioni variabili ha dimostrato che esistono domini che, essendo intrinsecamente più stabili di altri, tollerano l'assenza di questi legami. La maggiore o minore stabilità intrinseca di un anticorpo, che lo rende più o meno adatto all'espressione intracellulare, dipende dalla sua sequenza amminoacidica primaria in modo non ancora prevedibile a priori.

L'identificazione dei residui amminoacidici che rendono un anticorpo più stabile e in grado di ripiegarsi correttamente anche in assenza di ponti disolfuro rappresenta un traguardo importante per le applicazioni future. Il raggiungimento di questo obiettivo sarà grandemente facilitato dalla messa a punto di nuovi metodi di selezione di anticorpi ricombinanti basati o sulla loro capacità di essere espressi in modo funzionale nell'ambiente intracellulare o sulla presenza di un caratteristico fenotipo indotto dalla loro espressione.

Anticorpi à la carte da una libreria di fagi

L'espressione di frammenti anticorpali sulla superficie di un virus che infetta un batterio (il fago filamentoso Ff) permette l'isolamento di un singolo frammento anticorpale, con una specificità di legame prefissata, da una libreria complessa contenente un vasto eccesso di frammenti non leganti. I fagi filamentosi hanno un genoma di DNA a singola elica, e infettano *Escherichia coli* attraverso il pilo F. Il riconoscimento del pilo F da parte della proteina fagica p3 determina l'ingresso del DNA virale nella cellula di *E. coli*, dove viene replicato, passando per una fase a doppia elica. A differenza di altri fagi che si propagano per lisi della cellula batterica ospite, il fago filamentoso viene esportato dalla cellula mediante un processo di secrezione attiva. I frammenti anticorpali sono fusi all'estremità N-terminale della proteina p3. Nella fusione risultante, il dominio anticorpale è esposto all'esterno del fago, senza peraltro inibirne la capacità di infettare la cellula batterica bersaglio.

Il DNA codificante per milioni di domini anticorpali differenti (libreria di domini anticorpali) viene inserito nel genoma di un batteriofago filamentoso, come fusione del gene 3. Una volta espressa, la proteina di fusione viene incorporata nella particella fagica matura, che viene secreta da ciascuna cellula ed esposta sulla sua superficie. Si genera così una libreria di fagi, in cui ciascuna particella fagica espone un dominio anticorpale differente, con il corrispondente genotipo all'interno della particella fagica stessa. Solo fagi che espongano un dominio anticorpale che leghi l'antigene selettore vengono trattiene e utilizzati per un nuovo ciclo. In questo modo è possibile selezionare domini anticorpali diretti contro antigeni di interesse, da librerie contenenti fino a decine o centinaia di miliardi di varianti.



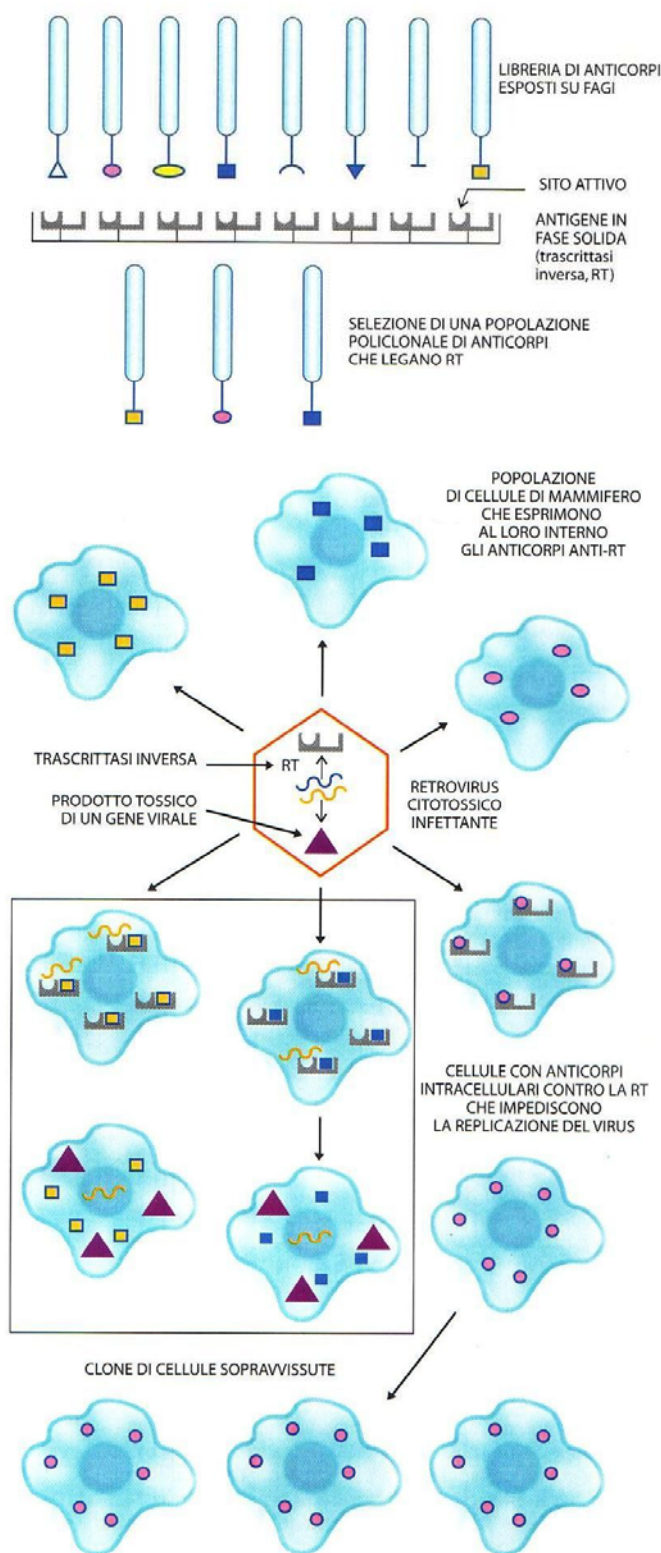
Una ricca collezione di anticorpi

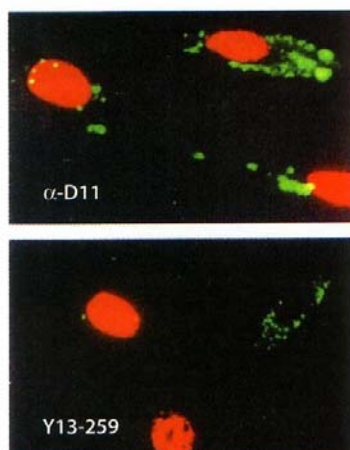
Nella ingegneria anticorpale classica, il materiale di partenza per il clonaggio di anticorpi è costituito da linee di ibridomi a specificità antigenica nota. Con l'avvento della tecnica basata sulla reazione a catena della polimerasi (si veda l'articolo *La scoperta della reazione a catena della polimerasi* in «Le Scienze» n. 262, giugno 1990) e la produzione di oligonucleotidi sintetici universali, è stato possibile amplificare intere famiglie di geni per regioni variabili, utilizzando come sorgenti linfociti primari della milza, o sintetizzare repertori sintetici di tali geni.

L'espressione di repertori di regioni variabili sulla superficie di batteriofagi filamentosi ha permesso di ottenere librerie di anticorpi per i quali disponiamo di geni corrispondenti. In pratica è come se avessimo un sistema immunitario in provetta, dal quale selezionare gli anticorpi che ci interessano. Questa nuova sorgente di anticorpi presenta numerosi vantaggi ai fini dell'espressione dell'immunità intracellulare: innanzitutto gli anticorpi derivati da librerie fagiche sono per loro natura ricombinanti e quindi i geni non devono essere clonati dagli ibridomi; in secondo luogo, le librerie fagiche sono spesso raccolte di catene variabili umane da cui selezionare anticorpi umani, un aspetto importante in una prospettiva di terapia genica; e infine gli anticorpi stessi possono essere migliorati dal punto di vista dell'affinità, stabilità e specificità con i metodi della tecnologia dei fagi.

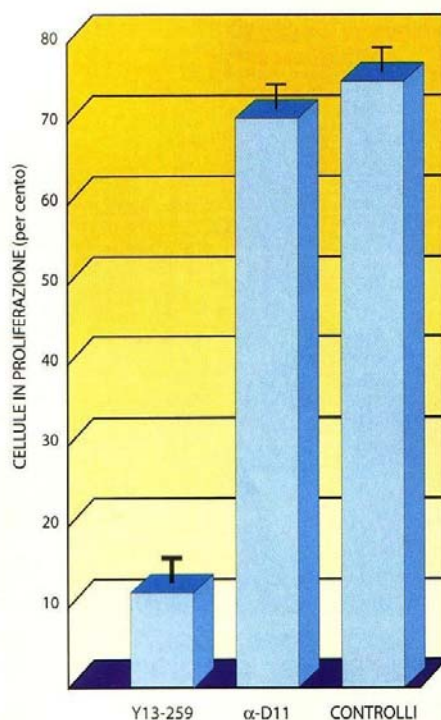
Ma il vantaggio maggiore offerto dalla tecnologia delle librerie di anti-

Rappresentazione schematica di una procedura di selezione di anticorpi intracellulari in grado di conferire resistenza a un virus citotossico. La figura mostra come si possa selezionare una popolazione policlonale di anticorpi diretti contro la trascrittasi inversa del virus HIV da una libreria di anticorpi esposti sulla superficie di frammenti scFv che legano la trascrittasi inversa è clonata in vettori per l'espressione in cellule di mammifero, ed espressa in cellule mediante trasfezione del DNA. Solo le cellule che esprimono un frammento anticorpale capace di inibire efficientemente la trascrittasi inversa sopravviveranno, in quanto il virus non potrà replicarsi. Il corrispondente frammento scFv potrà poi essere recuperato e caratterizzato dal clone di cellule sopravvissute.





Questo esperimento mostra come gli anticorpi intracellulari anti-Ras possano inibire la proliferazione cellulare nei fibroblasti di mammifero. Le fotografie rappresentano fibroblasti che esprimono anticorpi intracellulari (segnale verde) anti-Ras (Y13-259) o anticorpi di controllo (α D11) e incorporano brodeossisuridina (nuclei rossi, un indice di proliferazione). Il grafico a fianco evidenzia la percentuale di cellule in proliferazione tra le cellule che esprimono gli anticorpi.



corpi sulla superficie di fagi è la possibilità di manipolare miscele complesse di anticorpi, insieme con i corrispondenti geni, fornendo l'equivalente ricombinante di un antisiero policlonale. Tale possibilità permette di sviluppare nuovi metodi per la selezione di anticorpi idonei all'espressione intracellulare. Per esempio, un repertorio di geni per anticorpi può venire espresso all'interno di una popolazione di cellule,

in modo che ogni cellula della popolazione esprima un singolo anticorpo tra quelli presenti nel repertorio iniziale. Tale popolazione di cellule è poi sottoposta a una pressione selettiva opportuna, in modo che le cellule in cui un anticorpo intracellulare interagisce efficacemente con l'antigene abbiano un vantaggio selettivo e sopravvivano a scapito delle altre.

Questa procedura di selezione è sta-

ta sviluppata nel nostro laboratorio sfruttando la resistenza contro un virus citotossico conferita da anticorpi intracellulari. La selezione fenotipica è stata estesa al caso in cui alcune cellule possono essere selezionate sulla base della semplice interazione intracellulare tra l'anticorpo e l'antigene, sfruttando il metodo del doppio ibrido. In questo caso l'interazione antigene-anticorpo induce la trascrizione di un gene reporter la cui attività conferisce un vantaggio selettivo. In prospettiva, l'uso sistematico di queste procedure di selezione permetterà l'isolamento di anticorpi in grado di interagire efficacemente con il corrispondente antigene intracellulare, aumentando così le prospettive terapeutiche.

Anche dal punto di vista della genomica funzionale, ossia dell'insieme di metodi sviluppati per studiare e identificare

la funzione delle proteine, gli anticorpi intracellulari possono dare un contributo importante, in quanto consentono di ottenere il knock-out fenotipico della funzione di una proteina. Ciò è di grande attualità perché si prevede che i progetti internazionali sul sequenziamento di interi genomi produrranno un enorme numero di sequenze geniche codificanti per proteine dalla funzione per ora del tutto ignota.

SILVIA BIOCCA e ANTONINO CATTANEO sono stati i pionieri della strategia sperimentale degli anticorpi intracellulari, contribuendo significativamente ai suoi successivi sviluppi.

Dopo essersi laureata in biologia, Silvia Biocca ha lavorato dapprima presso la Washington University di St. Louis, negli Stati Uniti, poi all'Istituto di neurobiologia del CNR e quindi presso l'Università di Roma «Tor Vergata», dove attualmente dirige un gruppo di ricerca.

Antonino Cattaneo, laureatosi in fisica, ha lavorato su molteplici aspetti della neurobiologia e dell'immunologia molecolare, presso l'Istituto di neurobiologia del CNR (Roma) e presso il Laboratory of Molecular Biology (MRC) di Cambridge. È ora vicedirettore della SISSA (Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati) di Trieste.

BIOCCA SILVIA, NEUBERGER M. S. e CATTANEO ANTONINO, *Expression and Targeting of Intracellular Antibodies in Mammalian Cells* in «EMBO Journal», 9, pp. 101-108, 1990.

WINTER G., GRIFFITHS A. D., HAWKINS R. E. e HOOGENBOOM H. R., *Making Antibodies by Phage Display Technology* in «Annual Review of Immunology», 12, pp. 433-455, 1994.

PICCIOLI P. e altri, *Neuroantibodies: Ectopic Expression of a Recombinant Anti-substance P Antibody in the Central Nervous System of Transgenic Mice* in «Neuron», 15, pp. 373-384, 1995.

CATTANEO A. e BIOCCA S., *Intracellular Antibodies: Development and Applications*, Springer-Verlag, 1997.

CATTANEO A. e BIOCCA S., *Selection of Intracellular Antibodies* in «Trends in Biotechnology», 17, pp. 115-121, 1999.

VISINTIN M. e altri, *Selection of Antibodies for Intracellular Function Using a Two-Hybrid in Vivo System* in «Proc. of Nat. Academy of Sciences USA» 96, pp. 11723-11728, 1999.