

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE HORTICULTURĂ**

Ing. Mihail-Radu KANTOR

Rezumat al tezei de doctorat

**Obținerea unor plante transgenice la tomate, care să
conțină antigene pentru malarie**

**Conducător științific:
Prof. dr. Radu SESTRĂȘ**

Cluj-Napoca
2011

CUPRINS

CONȚINUT	Pag.
Introducere.....	1
Etape ale dezvoltării parazitului malariei.....	2
Stadiul actual al cunoașterii.....	3
Situația actuală a vaccinurilor comestibile.....	4
Procesul de obținere a plantelor transgenice.....	5
Transformarea genetică.....	5
Rezultate și discuții.....	6
Concluzii și recomandări.....	11
Bibliografie.....	13

Introducere

Malaria, una dintre cele mai periculoase boli, cauzată de un parazit protozor din genul *Plasmodium*, afectează anual aproximativ 300-500 milioane de persoane, dintre care în jur de 3 milioane își pierd viața. Peste un milion de copii (majoritatea sub 5 ani) sunt mai predispuși la boală decât populația adultă.

Cele mai multe tratamente împotriva infecției cu malarie sunt chimioterapice, cel mai comun medicament folosit fiind pe bază de chinină. Din punct de vedere tehnic, al modului de livrare, precum și al prețului final de livrare, crearea vaccinurilor împotriva malariei încă mai reprezintă o adevărată provocare greu de dus la îndeplinire. Pentru a ocoli aceste dificultăți logistice ce privesc administrarea vaccinului malariei la persoanele afectate de această boală la un preț accesibil lor, vaccinurile comestibile exprimate în plantele de tomate (în care diferite plante transgenice manifestă diferite tipuri de antigene, imunizarea persoanelor împotriva multiplilor antigeni care cauzează această boală și împotriva fiecărei etape a ciclului de viață a acestui parazit) ar putea fi un sistem eficient, ieftin și un mod sigur de vaccinare. Datorită faptului că parazitul malariei are un complex ciclu de viață, crearea de vaccinuri care să inhibe dezvoltarea lui ar fi o adevărată provocare. Pe de altă parte, acest complex ciclu de viață care se desfășoară în diferite organisme ne oferă posibilitatea de a interveni în diferite stadii de dezvoltare a acestui parazit.

Datorită faptului că pentru a transmite această boală la om este nevoie de mai multe gazde și parazitul trebuie să treacă prin diferite stadii de dezvoltare, este nevoie de un număr de aproximativ 10-15 antigene care să confere o protecție împotriva diferitelor stadii ale dezvoltării parazitului (CHOWDHURY și BAGASRA, 2007). Protocoalele standard de vaccinare folosite în prezent nu permit ca un număr așa mare de antigene să fie introduse în organismul uman printr-o singură vaccinare. Pentru a ocoli aceste dificultăți logistice și pentru a permite administrarea vaccinului la cele mai mici prețuri pacienților aflați în nevoie, vaccinurile comestibile exprimate în tomate ar putea deveni o modalitate ieftină și sigură de administrare a vaccinului (CHOWDHURY și KANTOR, 2008).

Combaterea malariei se poate face atât prin întreruperea ciclului de viață a acestui parazit odată ajuns în om, precum și în perioada în care acesta se găsește în vector.

Obiectivul principal al tezei de doctorat este crearea unui vaccin comestibil împotriva malariei care să fie exprimat în tomate. Motivația acestei cercetări este obținerea respectivului vaccin comestibil la un cost redus, în așa fel încât oamenii afectați de această boală să poată beneficia de un tratament cât mai ieftin și mai accesibil.

Etape ale dezvoltării parazitului malariei

Diverși cercetători au descris în cercetările lor diferiți candidați pentru vaccinul împotriva malariei, candidați care ar putea opri dezvoltarea paraziților în diferite etape ale dezvoltării (pre-eritrocitic și post-eritrocitic). Hematozoarele din genul *Plasmodium sp.* au un ciclu de viață complex. Acesta începe în momentul în care o femeie țânțar injectează sporozoitele în sângele unei persoane în momentul când aceasta se hrănește (LODISH și colab., 2008). După injectarea sporozoitelor, acestora le trebuie mai puțin de 30 de minute pentru a invada hepatocitele. Apoi este necesară o perioadă de 6-16 zile pentru ca aceste sporozoite să se maturizeze (OKITSU, 2006). Maturizarea sporozoitelor are loc în ficatul persoanei infectate. Etapa de dezvoltare a parazitului, ce are loc în ficatul persoanei infectate, se încheie prin eliberarea în sânge a zeci de mii de merozoite care invadează celulele roșii și încep să se înmulțescă și să se matureze, trecând astfel de la o etapă ce are formă de inel la următoarea etapă, și anume de trophozoite și apoi la cea de schizont (CDC, 2010). Schizontul va elibera o nouă generație de merozoite, care la rândul lor vor invada celule roșii pentru a repeta ciclul (CDC, 2010).

A fost dovedit că *Plasmodium sp.* se manifestă diferit de la o zonă geografică la alta, acest fapt reprezentând o altă provocare pe care trebuie să o luăm în calcul în elaborarea unui vaccin eficient împotriva malariei. Ca urmare a diversității cauzate de specificul zonei, un atare vaccin ar putea vindeca persoanele din zona de unde probele au fost colectate. Cu toate acestea, chiar dacă vaccinul acționează asupra aceluiași antigen, nu înseamnă că el va fi eficient într-un alt mediu.

Stadiul actual al cunoașterii

În momentul de față, cel mai avansat vaccin disponibil împotriva malariei este RTS,S, un vaccin creat în 1987 de către cercetătorii firmei GlaxoSmithKline Biologicals. Vaccinul RTS,S se află la ora actuală în cea de-a 3-a fază a testărilor (din mai 2009), fiind testat pe 15461 de copii din mai multe țări africane (WHO, 2011). În ceea ce privește eficacitatea respectivului vaccin, prin cea de-a două fază a testărilor s-a reușit inducerea imunității în 35% dintre pacienții care au prezentat semne clinice de boală și în 42% dintre pacienții afectați sever (ALONSO și colab., 2004; ALONSO și colab., 2005). Într-un studiu mai recent s-a demonstrat o eficacitate de 53% a vaccinului în momentul administrării acestuia copiilor cu vârste cuprinse între 5 și 17 luni (BEJON și colab., 2008).

Crearea cu succes a unui vaccin complex care să împiedice dezvoltarea parazitului și care să interacționeze cu parazitul în trecerea acestuia de la o etapă la altă etapă a vieții, ar fi candidatul ideal pentru vaccinul împotriva malariei (CHOWDHURY și colab., 2009). PfCSP-C și PfCSP-RC sunt două antigene recombinante derivate din *Plasmodium falciparum* CSP. Atunci când au fost testate pe iepuri și șoareci în asociere, acestea au indus o imunizare ridicată a organismului (PAN și colab., 2004, PAN și colab., 2007). Rezultatele au arătat că respectivele antigene pot fi utile pentru dezvoltarea unui vaccin polivalent împotriva malariei.

În rezultatele publicate anterior de către PAN și colab. (2004), asupra posibilităților candidați ai vaccinului malariei, aceștia au analizat proteina PfCP-2.9, care este antigena creată prin fuziunea MSP1-19 cu AMA-1 (III). Vaccinul candidat induce anticorpi care inhibă dezvoltarea parazitului în sânge la studiile efectuate *in vitro* (PAN și colab., 2004). După testarea PfCSP-C și PfCSP-RC ca antigene folosiți pentru imunizarea animalelor (folosind sau nefolosind PfCP-2.9 ca adjuvant), rezultatele experimentelor efectuate de PAN și colab. (2004) au arătat că nu este nici o concurență între acești doi antigeni. Cu toate că în momentul testării vaccinului PfCP-2.9 pe diferite animale acesta a indus un nivel ridicat de imunitate împotriva parazitului malariei, în urma testării vaccinului pe oameni a fost observat un nivel ridicat de anticorpi, fără ca aceștia să inhibe dezvoltarea parazitului (MALKIN și colab., 2008). În urma testării vaccinului pe subiecți umani PAN și colab. (2010), au demonstrat că componentele proteinei himerice create de ei (PfCP-2.9)

își păstrează structura și după fuzionare, sugerând mai departe că proteina himerică ar reprezenta un potențial candidat în crearea unui vaccin folosit în combaterea acestei maladii.

Situația actuală a vaccinurilor comestibile

Atât motivele enunțate anterior, cât și alte cercetări ce au fost efectuate cu succes având scop similar, sunt confirmate și prin faptul că cercetări efectuate pentru obținerea de vaccinuri comestibile au fost raportate și la alte culturi. De exemplu, producerea unui vaccin comestibil exprimat în porumb împotriva tulpinii enterotoxigenic ale organismului *Escherichia coli* a fost raportată de DANIELL și colab.(2001). Alte cercetări asupra vaccinurilor comestibile au fost raportate și în alte culturi de legume cum ar fi cartoful și morcovii (WALMSLEY și ARNTZEN, 2000).

Diferite vaccinuri au fost dezvoltate împotriva diferitelor boli virale, bacteriene, parazitare și antigeni împotriva alergenilor atât pentru oameni cât și pentru animale. Plantele producătoare de vaccinuri au fost utilizate pentru a produce cantități mari de proteine pentru diferite vaccinuri sau chiar folosite pentru a produce vaccinuri comestibile.

În ceea ce privește situația vaccinurilor comestibile împotriva malariei, lucrări publicate recent menționează expresia unor antigene împotriva malariei în salată și tutun (DANIELL și colab., 2010), în semințele de *Arabidopsis thaliana* (SUN și colab., 2010) , cât și în alge verzi (DAUVILLEE și colab., 2010). În lucrările mai sus menționate au fost folosite antigenele malariei AMA1, MSP 1(DANIELL și colab., 2010; DAUVILLEE și colab., 2010), MSP₁₄₂ (SUN și colab., 2010). Nivelul de expresie al proteinelor de interes în plantele transformate au fost de 10.11% pentru plantele de tutun transformate cu gena AMA1, 13.17% în cele transformate cu MSP1 și între 6.1% (AMA1) și 7.3% (MSP1) în plantele de salată (DANIELL și colab., 2010). Din semințele de *Arabidopsis* transformate cu gena MSP₁₄₂ s-a reușit extragerea a aproximativ 5% proteină de interes din proteina totală (SUN și colab., 2010) .

Procesul de obținere a plantelor transgenice

Diferite metode de lucru necesare atât culturii de țesuturi, precum și pentru transformarea plantelor, au trebuit optimizate cu scopul creării de tomate transgenice care să fie folosite în vaccinare. Obiectivul nostru a fost acela de a dezvolta un mod de lucru eficient cu ajutorul căruia să obținem un nivel maxim de proteine pentru candidații vaccinului pentru malarie. Pentru a realiza acest obiectiv a fost necesară optimizarea producției de tomate transgenice, aceasta putându-se realiza prin îndeplinirea următoarelor cerințe:

- 1) testarea mai multor soiuri de tomate pentru a identifica soiurile care au cea mai ridicată capacitate de regenerare;
- 2) analiza și determinarea celor mai favorabile medii de cultură pentru dezvoltarea de plântuțe folosind diferite medii de cultură;
- 3) optimizarea celui mai eficient mod de lucru pentru transformarea genetică a tomatelor folosind metoda *Agrobacterium*;
- 4) identificarea plantelor transgenice prin utilizarea diferitelor tehnici moleculare și de regenerare a plantelor transgenice;
- 5) testarea nivelului de expresie a proteinei dorite în plantele/fructele transgenice.

Transformarea genetică

Informația genetică a plantelor, la fel ca în cea mai mare parte a eucariotelor, este stocată sub formă de polimeri, numiți și ADN. Fiecare genă a plantei codifică pentru o proteină, ceea ce face ca numărul total de gene dintr-o plantă să fie foarte mare. Diferența dintre procariote și eucariote constă în faptul că ADN-ul din compoziția cromozomului bacteriilor are formă circulară. Numărul și dimensiunea cromozomilor poate varia de la o specie la alta. Transformarea este un pas din procesul de inginerie genetică în care o genă nouă (transgenă) este introdusă în cromozomul unei celule. Transferul de gene poate fi realizat prin două metode de transformare: metoda directă și metoda indirectă. Metoda de transformare indirectă va fi prima descrisă, transformarea explantelor folosind această metodă implicând bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

Pentru a realiza o transformare reușită a plantelor trebuie mai întâi să transformăm bacteria *Agrobacterium*, iar mai apoi să utilizăm bacteriile transformate cu genele de interes pentru a transforma tomatele. În urma procesului de transformare a plantelor, acestea pot dobândi caracteristici valoroase cum ar fi: rezistența la diferite erbicide, diferiți viruși sau agenți patogeni, obținerea de plante vaccin. Plantele modificate genetic (GMO) sunt exemple de plante obținute în urma transformărilor genetice. Cele mai folosite plante pentru modificările genetice și care ocupă cele mai mari suprafețe, sunt bumbacul și porumbul.

Agrobacterium tumefaciens este o bacterie ce crește în sol și care invadează plantele prin rănilor plantelor de la nivelul rădăcinii sau tulpinii. Acesta este capabil să transfere o parte a ADN-ului propriu în celulele plantei parazitată (pot fi diferite plante ornamentale sau diferite specii de pomi fructiferi și legume), cauzând tumori sau gale (TRIGIANO și GRAY, 1999). Pentru acest motiv *Agrobacterium tumefaciens* este unul dintre cele mai convenabile metode de transformare genetică.

ADN-T este un segment al plasmidei Ti din *Agrobacterium* care este transferat în celulele plantei atunci când bacteria infectează planta. Regiunea ADN-T-ului este încadrată de latura stângă și de latura dreaptă. Tot ce se găsește între aceste 2 laturi este transferat în planta parazitată.

Regiunea ADN-T-ului aparținând plasmidei Ti poate fi modificată pentru a introduce gena de interes după dezarmarea acestei regiuni de genele care induc formarea de tumori. Acest fapt a constituit începutul dezvoltării procedurilor de transfer ale genelor sau a ADN-ului în plante.

Rezultate și discuții

Primul pas important al studiului de față l-a constituit selectarea a două antigene (PfcSP-RC și PfCP-2.9) din multitudinea de antigene raportate de diferiți cercetători (BEJON și colab., 2008, CHENET și colab., 2008, WEEDALL și colab., 2007, BOJANG și colab., 2005).

Vectorul binar pPS1 a fost ales pentru introducerea genelor malariei în *E.coli*, clonarea genelor în vector fiind realizată de către compania GenScript.

Vectorul a fost primit cadou de la HUGH MASON împreună cu harta acestuia și instrucțiunile de multiplicare.

Bacteriile *Agrobacterium* au fost transformate cu ADN-ul malariei prin metoda electroporării, aceasta fiind metoda recomandată de către literatura de specialitate (HUANG și MASON, 2004).

În studiile efectuate asupra celor două colonii (în cazul electroporării bacteriei cu gena PfCP-2.9), și respectiv 18 colonii (pentru gena PfCSP-RC) s-a urmărit identificarea coloniilor transformate cu genele de interes. Au fost identificate câteva colonii transformate cu gena PfCSP-RC care au prezentat ambele gene de interes în urma migrării ADN-ului probelor de interes în gelul de agaroză, mai precis coloniile numărul 3, 5, 10, 12, 15, 16, și 18. Colonia numărul doi rezultată în urma procesului de transformare cu gena PfCP-2.9 a prezentat ambele gene de interes în momentul migrării ADN-ului în gelul de agaroză.

Au fost selectate varietăți cu o perioadă de vegetație cuprinsă între 58 de zile (Summer Sweet) și 95 de zile (Pineapple), de diferite forme [ovale (Roma), rotund-aplatizate (Pineapple, Brandywine), rotunde (Rutgers, Pink-girl, Summer Sweet)]. Greutatea fructelor tomatelor selectate a variat între 57 g (Summer) și 900 g (Pineapple). Diversitatea mare a varietăților de tomate utilizate în studiul de față a pornit de la dorința de a obține vaccinuri comestibile exprimate în fructe de diferite forme, mărimi și culori (CHOWDHURY și BAGASRA, 2007). Rezultatele obținute de la cultura de țesuturi au fost analizate cu ajutorul programului statistic SPSS. Ca rezultat, cel mai bun mediu de cultură dintre cele șase medii de cultură testate a fost MS +1Z + .05IAA.

În urma studiilor efectuate asupra transformării plantelor de tomate a reieșit că un număr mai mare de regeneranți pot fi produși la concentrația de *Agrobacterium* $OD_{600}=0.4nm$, această concentrație fiind folosită în majoritatea experimentelor de transformare ale plantelor de tomate. Cu toate că valorile ideale ale densității celulelor de *Agrobacterium* a fost raportată de diferiți cercetători ca fiind 0.8 nm (BETCHTOLD și colab., 1993, YONG și colab., 2006), 1 nm (VAIN și colab., 2007, PARK și colab., 2003) sau 0.2 nm (QIU și colab., 2007), pentru experimentele desfășurate de noi aceste concentrații nu au dat cele mai bune rezultate. Concentrația de *Agrobacterium* folosită în experimentul

de față a fost inițial de 1nm, iar mai târziu a fost redusă la 0.4 nm. Rezultatele obținute în urma transformării plantelor au depins și de concentrația antibioticelor din mediul de selecție; spre exemplu, concentrația folosită de către VELCHEVAA și colab.(2005), a fost de 350mg/l de Timentină și 100 mg/l Kanamicină, în timp ce concentrația folosită în cazul de față în primele două săptămâni de cultivare a explantelor pe mediul de inducere a fost de 300mg/l de Timentină și 50 mg/l Kanamicină. S-a recurs la folosirea de concentrații mai mici pentru a permite regenerarea a cât mai multor explante, cu toate că concentrațiile mai mici pot duce la un număr mai mare de explante netransformate, „escapes” (McCORMICK, 1991). Pentru evitarea regenerării de explante netransformate explantele au fost transferate ulterior pe medii de selecție conținând 400 mg/l Timentină și 100 mg/l Kanamicină. Procentul de explante regenerate obținute în experimentul de față a variat între 0 și 24.1%, valoarea maximă fiind înregistrată în momentul transformării plantelor aparținând varietății Pink Girl cu gena PfCSP-RC colonia 18. Acest procent corespunde unui număr de 20 de regeneranți inițiali obținuți din 83 de explante inițiale. În ceea ce privește raportul dintre numărul de explante inițiale și numărul de regeneranți inițiali calculat pentru explantele transformate cu gena PfCSP-RC15, cel mai mare procentaj a fost obținut de varietatea Pineapple cu 3.96%, urmată de varietatea Summer cu 2.41%. Acest procent corespunde unui număr total de 12 regeneranți obținuți din 497 de explante. Și în cazul explantelor transformate cu gena PfCP-2.9 raportul a fost mult mai mic decât cel obținut de gena PfCSP-RC-18, procentul cel mai mare de regeneranți fiind obținut de varietatea Roma cu 4% regeneranți, procent ce corespunde unui număr de 4 regeneranți din 100 de explante. A doua varietate cu cel mai mare procent de regeneranți a fost Pineapple cu 2.9%, acest procent corespunzând unui număr de 25 de regeneranți din 854 de explante.

Numărul final de plante transformate care au ajuns la maturitate a fost de 13, dintre acestea 5 plante rezultând în urma transformării plantelor cu gena PfCP-2.9 și 8 în urma transformării plantelor cu gena PfCSP-RC.

ADN-ul extras din fructele verzi și din frunzele plantelor transformate a fost testat prin metoda PCR, toate plantele testate prezentând benzile de interes specifice genei de interes, mai puțin planta numărul 3 (aceasta fiind testată pozitiv pentru prezența genei *nptII*).

Toate cele 4 plante aparținând cultivarului Summers au fost testate pozitiv pentru prezența ambelor gene de interes în ADN-ul extras din fructele coapte ale plantelor.

Plantele generației a doua de plante transformate cu gena PfCP-2.9 (planta 1, 2 și 3) au fost analizate folosind PCR, toate probele analizate testând pozitiv pentru prezența ambelor gene de interes. Plăntuțele rezultate în urma germinării semințelor provenite de la plantele 1, 2 și 3 transformate cu gena PfCSP-RC15 au fost testate pentru prezența genelor de interes. Toate plantele testate au prezentat ambele gene de interes, inclusiv planta numărul 3, care a fost testată negativ pentru prezența genei malariei în momentul analizării ADN-ului extras din fructe. Plantele generației a doua de plante transformate și aparținând varietății Pineapple transformate cu gena PfCSP-RC15 au fost analizate, toate prezentând banda de interes specifică genei *nptII*, însă fără ca vreuna din plantele testate să prezinte gena malariei în gelul de agaroză.

După cum se poate observa din datele prezentate, din 13 plante care au rezultat în urma transformării cu ambele gene de interes doar 11 au prezentat ambele gene de interes.

După demonstrarea prezenței ADN-ului în plantele transformate, următorul pas al experimentelor a constat în demonstrarea integrării ADN-ului de interes în genomul plantei transformate. Pentru a realiza acest lucru ARN-ul din plantele transformate a fost extras, iar mai apoi a fost analizat cu ajutorul metodelor Real Time PCR și Reverse Transcriptase PCR.

În urma analizării primelor probe testate folosind metoda Reverse Transcriptase PCR, plantele 1 și 2 transformate cu gena PfCP-2.9 a varietății Summer au fost testate pozitiv pentru prezența ambelor gene de interes.

Plantele identificate pozitiv pentru prezența genelor de interes prin metoda Real Time PCR au fost cele cu numărul 1,4,5,6, și 7 transformate cu gena PfCSP-RC15 aparținând varietății Summer.

De la plantele 4,5,6 și 7 ARN-ul testat a fost cel extras din plantele generației a doua de plante, în timp ce ARN-ul testat pozitiv pentru planta numărul 1 a fost extras din fructele plantei. Și plantele numărul 1,2 și 3 transformate cu gena PfCP-2.9 aparținând varietății Summer au fost testate pozitiv pentru prezența genei malariei în urma analizării gelului de agaroză și a temperaturii de denaturare.

Restul probelor (16 la număr) de ARN au fost testate folosind metoda Reverse transcriptase PCR datorită costului mai scăzut al materialelor necesare pentru realizarea acestuia. Cu ajutorul respectivei metode a fost analizat ARN-ul extras din frunzele plantelor transformate. Plantele 2,5 și 7 transformate cu gena PfCSP-RC au fost testate pozitiv pentru prezența ambelor gene de interes (atât în probele provenite din frunze cât și cele din fructe), la fel și planta numărul 4 (ARN-ul testat a fost extras numai din frunzele plantei) transformată cu gena PfCP-2.9. Alte 3 plante aparținând varietății Summer (planta 1,4 și 6) transformate cu gena PfCSP-RC au fost testate pozitiv pentru prezența genei malariei (în frunzele plantelor) în momentul analizării gelului de agaroză. Doar plantele 1,2 și 3 aparținând generației 2-a de plante transformate cu gena PfCSP-RC15 au fost testate prin metoda RT-PCR. În momentul analizării gelului de agaroză plantele 1 și 2 au prezentat benzile de ADN specifice genei malariei, planta 3 ne prezentând nici de această dată banda de ADN.

Rezultatele experimentelor Real Time PCR și Reverse Transcriptase PCR au reconfirmat rezultatele obținute în urma analizării ADN-ului plantelor transformate prin metoda PCR. În lucrarea de față s-a reușit așadar demonstrarea, prin intermediul metodei PCR și a metodei RT-PCR, transmiterii cu succes a genelor de interes aparținând generației a doua de plante transgenice. Originalitatea rezultatelor recurge din faptul că este singura lucrare în care se prezintă prezența antigenelor împotriva malariei în generația a doua de plante transformate.

După demonstrarea prezenței genei de interes în probele de ARN s-a realizat extragerea proteinelor din plantele transformate, urmată de cuantificarea și analiza lor prin intermediul metodelor ELISA și Western Blot. Prin experimentul respectiv proteinele au fost extrase din organe diferite ale plantelor (frunze, fructe) cu ajutorul kit-ului de extracție al firmei Sigma. Extragerea proteinelor din fructele tomatelor este un proces dificil, tomatele fiind incluse în categoria plantelor recalcitrante (SARAVANAN și colab., 2004), din acest motiv cantitatea de proteine extrase din fructele plantelor fiind în unele cazuri scăzută.

Cea mai mare cantitate de proteină ($17.57\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a fost extrasă din planta numărul 3 rezultată în urma transformării varietății de tomate Summer cu gena PfCP-2.9. Deoarece nu s-a reușit obținerea de anticorpi și de proteine purificate pentru niciuna din genele folosite în transformarea plantelor, cât și datorită faptului că genele de interes sunt himerice, s-a recurs la detectarea proteinei de interes din plantele transformate cu ajutorul unor anticorpi împotriva uneia din cele două gene care alcătuiesc genele de interes.

Analizarea proteinelor extrase din plantele transformate cu gena PfCP-2.9 a fost efectuată cu metoda Western Blot. Au fost identificate benzile proteice corespunzătoare genei PfCP-2.9 (32 kDa) în planta numărul 2 și planta numărul 4.

Studiile efectuate asupra proteinelor extrase din plantele transformate cu gena PfCSP-RC au permis identificarea proteinei de interes în plantele transformate, pentru demonstrarea acestui lucru proteinele fiind analizate prin metoda ELISA. Planta numărul 4 a înregistrat cea mai mare concentrație ($31.59\text{pg}/\mu\text{l}$) a proteinei de interes din totalul proteinei solubile, fiind urmată de planta numărul 5. Valori pozitive au fost înregistrate și de către planta numărul 6 și 7, concentrația proteinei de interes în acestea fiind însă mult mai mică decât în celălalte plante transformate. Expresia diferitelor proteine în plante transgenice a fost raportată în numeroase lucrări științifice până la ora actuală (ALVAREZ și colab., 2006, LI și colab., 2005, SUN și colab., 2010, MARTINEZ-GONZALEZ și colab., 2011, KOYA și colab., 2005, QIU și colab., 2006, MASON și colab., 2006, MASON și colab., 2005, HUANG și MASON, 2004), foarte puține dintre acestea prezentând însă date referitoare la mai multe generații de plante transformate.

Concluzii și recomandări

(Concluzie)

Datele obținute din cultura de țesuturi au fost în concordanță cu cele ale altor cercetători (SHEEJA și colab., 2004; ICHIMIURA și ODA, 1995; BHATIA și colab., 2004; CORTINA și CULIANEZ, 2004; CHAUDHRY și colab., 2007; HAMZA și CHUPEAU, 1993), reconfirmând faptul că mediul de cultură cel mai propice pentru regenerarea plantelor trebuie să aibă în compoziția sa auxina IAA (auxina cea mai frecvent folosită în cultura

țesuturilor de tomate, cea mai frecvent utilizată concentrație fiind cea de 0.05 mg/l), acest mediu dând naștere unui număr semnificativ mai mare decât mediul de cultură cu auxina NAA.

(Concluzie)

Rezultatele obținute din experimentul de transformare a plantelor de tomate sunt asemănătoare cu cele raportate de literatura de specialitate, procentajele variind între 6 și 40% (QIU și colab., 2006; PARK și colab., 2003); între 5 și 32.9% (CORTINA și CULIANEZ, 2004), între 1.4 și 34 % (VELCHEVA și colab., 2004). Cu toate că în urma primelor experimente de transformare genetică s-a obținut un număr relativ mare de regeneranți, în momentul transferului acestora pe mediul de selecție cu un conținut de antibiotic mai ridicat mulți dintre regeneranți nu au reușit să dezvolte rădăcini, iar după câteva săptămâni de cultură pe mediul de selecție cu o concentrație mai mare de kanamicină multe dintre explante au murit.

(Concluzie)

Cantitatea destul de mică a proteinei de interes detectată prin metoda ELISA se poate datora și optimizării kit-ului ELISA în vederea detectării proteinei CS din țânțari și nu din plante.

(Recomandare)

Un obiectiv important care poate fi luat în calcul pentru studiile viitoare se referă la introducerea genelor pentru malarie în genomul cloroplastic pentru a evita polenizarea nedorită a plantelor transgenice de tomate cu alte specii înrudite. Cu toate că tomatele sunt plante autopolinizatoare, pentru a crește producția de proteine și pentru a evita eventualele probleme datorate faptului că această cultură este una modificată genetic, genele malariei pot fi exprimate în genomul cloroplastic al plantelor de tomate.

Transformarea cloroplastelor prezintă avantajul unui nivel de expresie ridicat al genei introduse unui număr mare de copii datorită prezenței unui număr ridicat (10000) de copii ale genomului cloroplastelor în fiecare celulă (KOYA și colab., 2005).

În concluzie, teza reprezintă un studiu unic până în momentul de față al expresiei antigenelor malariei (PfCSP-RC și PfCP-2.9) în generația a doua de plante de tomate. Rezultatele obținute reprezintă un pas major în domeniu, oferind nu doar o soluție economică la problema actuală cu care se confruntă țările afectate de malarie, ci și un salt semnificativ în drumul spre eradicarea acestei boli. Succesul studiului de față demonstrează încă o dată (printr-un protocol original) fezabilitatea vaccinurilor comestibile în medicina viitorului.

BIBLIOGRAFIE

1. ALONSO P.L., SACARLAL J., APONTE J.J., și colab., 2004, Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*, Oct 16-22;364(9443):1411-20
2. ALONSO P.L., SACARLAL J., APONTE J.J., și colab., 2005, Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial, *The Lancet*.; 10;366(9502):2012-2018.
3. ALVAREZ M.L, PINYERD H, RIGANO MM, PINKHASOV J, WALMSLEY AM, MASON H.S, CARDINEAU GA., 2006, Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine*, 24: 2477-2490.
4. BEJON P, LUSINGU J, OLOTU A, și colab., 2008, Efficacy of RTS,S/AS01E: clinical malaria in 5 to 17 month old children, *The New England Journal of Medicine*. 359: 2521-2532
5. BETCHTOLD N., ELLIS J. & Pelletier, G., 1993, *In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316:1194-1199.

6. BHATIA P., ASHWATH N., SENARATNA T., MIDMORE D., 2004, Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 1–21. *Kluwer Academic Publishers*.
7. BOJANG K.A, OLODUDE F, PINDER M, OFORI-ANYINAM O, VIGNERON L, FITZPATRICK S, NIJE F, KASSANGA A, LEACH A, MILMAN J, și colab., 2005, Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in Gambian children, *Vaccine* , 23:4148-4157.
8. CHAUDHRY Z., AFROZ A., RASHID H., 2007, Effect of variety and plant growth regulators on callus proliferation and regeneration response of three tomato (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*). *Pak. J. Bot.*, 39(3): 857-869
9. CHENET S. M, BRANCH L. H, ESCALANTE A. A, LUCAS C. M, BACON D. J, 2008, Genetic diversity of vaccine candidate antigens in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon basin of Peru. *Malaria Journal*. 7:93. doi:10.1186/1475-2875-7-93.
10. CHOWDHURY K. & BAGASRA O, 2007, An edible vaccine for malaria using transgenic tomatoes of varying sizes, shapes and colors to carry different antigens. *Medical Hypotheses, Volume 68, Issue 1, Pages 22-30*
11. CHOWDHURY K. și KANTOR M, 2008, Transformation of tomato with anti-malarial genes with an aim to produce edible vaccines, *Society for In Vitro Biology World Congress*.
12. CHOWDHURY K., KANTOR M., SESTRAS R., 2009, Vaccine candidate diversity offers challenges and opportunities for effective vaccine development, *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 37(1): 9-16 Print ISSN 0255-965X; Electronic ISSN 1842-4309.
13. CORTINA C, CULIANEZ M.F.A., Tomato transformation and transgenic plant production, 2004, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 269–275. *Kluwer Academic Publishers*.
14. DANIELL H, STREATFIELD S.J, WYCOFF K, 2001, Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6: 219-226
15. DANIELL H., SEMIROMI A., SCHREIBER M., NALAPALLI S., VERMA D., SINGH N.D., BANKS R.K., CHAKRABARTI D., 2010, Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery, *Plant Biotechnology Journal*, 8, pp. 223-242.

16. DAUVILLEE D., DELHAYE S., GRUYER S., SLOMIANNY C., MORETZ S.E., D'HULST C., LONG C.A., BALL S.G., TOMAVO S., 2010, Engineering the Chloroplast Targeted Malarial vaccine Antigens in *Chlamydomonas* Strach Granules, *PLOS ONE* 5(12): e15424. doi:10.1371/journal.pone.0015424
17. HAMZA S., CHUPEAU Y., 1993, Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Exp Bot* 44: 1837–1845.
18. HUANG Z. și MASON H.S., 2004, Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusion in an *Agrobacterium*-mediated transient expression system, *Plant Biotechnology Journal*, 2, pp.241-249.
19. ICHIMURA K., & ODA M., 1995, Stimulation of shoot regeneration from cotyledon segments of tomato by agar and its extract. *Japan.Soc.Hort.Sci.* 64 (1) : 135-141.
20. KOYA V., MAHTAB M., LEPPLA S.H. & DANIELL H., 2005, Plant-Based Vaccine: Mice Immunized with Chloroplast-Derived Anthrax Protective Antigen Survive Anthrax Lethal Toxin Challenge; *Infection and immunity*, p. 8266–8274.
21. LI D., O'LEARY J., HUANG Y., HUNER N.P.A., JEVNIKAR A.M., MA S. 2006, Expression of cholera toxin B subunit and the B chain of human insulin as a fusion protein in transgenic tobacco plants, *Plant cell rep*, 25:417-424, DOI 10.1007/s00299-005-0069-2.
22. LODISH H.F., BERK A., KAISER K.A., KRIEGER M., SCOTT M.P., BRETSCHER A., PLOEGH H., MATSUDAIRA P., 2008, Molecular cell biology, sixth edition, *W.H. Freeman and Company*.
23. MALKIN E., HU J., LI Z., CHEN Z., BI X., REED Z., DUBOVSKY F., LIU J., WANG Q., PAN X., CHEN T., GIERSING B., XU L., KANG X., GU J., SHEN Q., TUCKER K., TIERNEY E., PAN W., LONG C., CAO Z., 2008, *Vaccine* 26, 6864-6873.
24. MARTINEZ-GONZALES L., ROSALES-MENDOZA S., SORIA-GUERRA R., MORENO-FIERROS L., LOPEZ-REVILLA R., KORBAN S.S., GUEVARA-ARAUZA J.C., ALPUCHE-SOLIS A.G., 2011, Oral immunization with a lettuce-derived *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, DOI 10.1007/s11240-011-9994-7.
25. MASON H.S., HUANG Z., ELKIN G., MALONEY B.J., BEUHNER N., ARNTZEN C.J., THANAVALA Y., 2005, Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses, *Vaccine* 23, 1851-1858.

26. MASON H.S.,ZHANG X., BUEHNER N.A., HUTSON A.M., ESTES M.K., 2006, Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein; *Plant Biotechnology Journal*, Volume 4 Issue 4, Pages 419 – 432.
27. MCCORMICK S., Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*, 1991, *Plant tissue culture manual*, B6:1-9
28. OKITSU S.L., 2006, Development of a Malaria Vaccine Candidate Based on Virosome Technology, http://edoc.unibas.ch/538/1/DissB_7772.pdf
29. PAN W., HUANG D., ZHANG Q., QU L., ZHANG D., ZHANG X., XUE X., & QIAN F., 2004, Fusion of Two Malaria Vaccine Candidate Antigens -Enhances Product Yield, Immunogenicity, and Antibody-Mediated Inhibition of Parasite Growth In Vitro, *The Journal of Immunology*, 172: 6167–6174.
30. PAN W., PENG H., HU Y., ZHOU A., JIN C., 2010, Solution structure of a *Plasmodium falcioarum* AMA-1/MSP1 chimeric protein vaccine candidate (PfCP-2.9) for malaria, *Malaria Journal*, 9-76.
31. PAN W., ZHANG Q., XUE X., QU L., 2007, Construction and evaluation of a multistage combination vaccine against malaria, *Vaccine* 25, 2112-2119.
32. PARK S.H., MORRIS J.L., PARK J.E., HIRSCHO K.D., R.H.M. SMITH,2003, Efficient and genotype independent *Agrobacterium* mediated tomato transformation. *J. Pl. Physio.* 160(10): 1253-1257.
33. QIU D., DIRETTO G., TAVARZA R., & GIULIANO G., Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *CsZCD*, 2007, *Scientia Horticulturae*, Volume 12, Issue 2, pages 172-175
34. SARAVANAN R. S. and ROSE J. K. C., 2004, A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues, *Proteomics*, Sep;4(9):2522-32.
35. SHEEJA T.E., MONDAL A.B., RATHORE R.K.S., 2004, Efficient Plantlet Regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Tissue Cult.* 14(1): 45-53.

36. SUN S.S.M., LAU O.S., NG D.W.K, CHAN W.W.L., CHANG S.P., 2010, Production of the 42-kDa fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1, a leading malaria vaccine antigen, in *Arabidopsis thaliana* seeds, *Plant Biotechnology Journal*, 8, pp. 994-1004.
37. TRIGIANO R. N., GRAY D.J., 1999, Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. *CRC Press*. 213-221
38. VAIN P., THOLE V., WORLAND B., SNAPE J.W., 2007, The pCLEAN Dual Binary Vector System for Agrobacterium-Mediated Plant Transformation, *Plant Physiology*, Vol. 145, pp.1211-1219
39. VELCHEVAA M., FALTINB Z., FLAISHMANB M., ESHDATB Y., PERL A., 2005, A liquid culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato, *Plant Science* 168; 121–130.
40. WALMSLEY A.M., ARNTZEN C.J., 2000, Plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 11:126-129.
41. WEEDALL G. D., PRESTON B.M.J., THOMAS A.W., SUTHERLAND C.J. & CONWAY D. J., 2007, Differential evidence of natural selection on two leading sporozoite stage malaria vaccine candidate antigens, *International Journal for Parasitology*. 37:77-85.
42. YONG W.T.L., ABDULLAHA J.O., & MAHMOODB M., 2006, Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastomataceae* spp. using green fluorescent protein (GFP) as a reporter, *Scientia Horticulturae Volume 109, Issue 1, 9, Pages 78-85*
43. Centers for disease control and prevention (CDC), Life Cycle of malaria parasite, 2010, <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
44. *** World malaria report , 2008, *World Health Organization*