



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze biologiche indirizzo biomolecolare

Physcomitrium patens come piattaforma per espressione di
proteine biofarmaceutiche
Physcomitrium patens as a platform for the expression of
biopharmaceutical proteins

Tesi di Laurea di:
di:

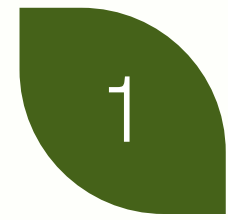
Giorgia Pelliccioni

Docente Referente
Prof.

Gerotto Caterina

Sessione: Luglio 2026 - Estiva

Anno Accademico 2025/2026



Introduzione

Le proteine biofarmaceutiche sono diventate strumento indispensabile per la medicina moderna, capaci di trattare un ampio range di patologie. Queste proteine sono troppo complesse per essere prodotte in vitro e vengono quindi utilizzati organismi opportunamente modificati come vettori di espressione.

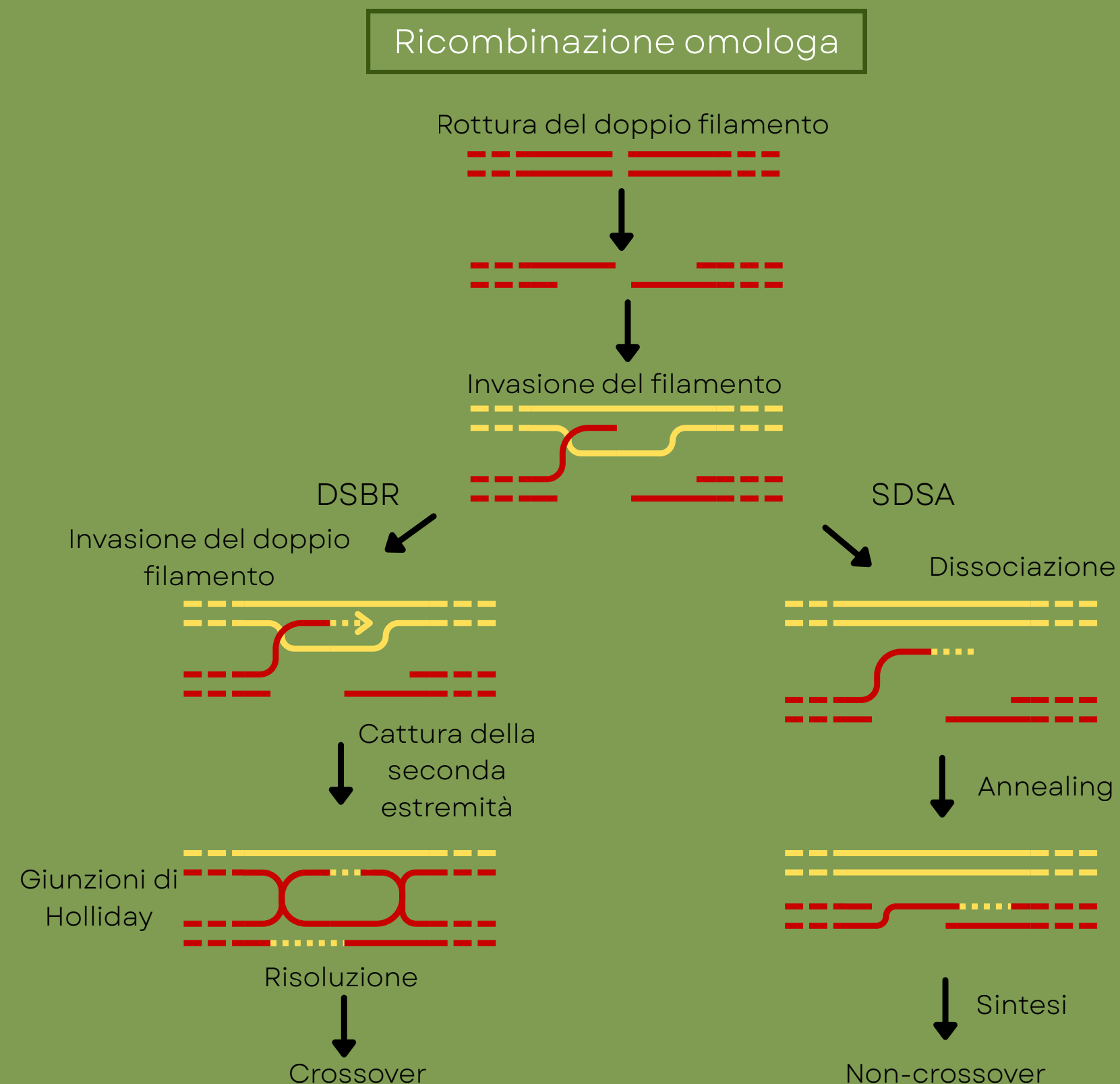
Noti sono il procariote *Escherichia coli* e la linea cellulare dell'ovaio del criceto cinese (CHO), ma entrambi presentano limitazioni:

- *E. coli* non presenta gli strumenti corretti per svolgere glicosilazioni eucariotiche.
- CHO è costoso, lento e non glicosila sempre in modo corretto.

L'interesse si è rivolto verso organismi vegetali, in particolare *Physcomitrium* (nota anche come *Physcomitrella*) *patens* per via delle sue peculiari caratteristiche. **L'obiettivo di questa tesi è fornire una panoramica riguardo le caratteristiche note del muschio *P. patens*.**

P. patens come specie modello

- *Physcomitrium patens* è una pianta appartenente al phylum delle briofite, ed è quindi priva di un sistema vascolare come le piante superiori.
- Il suo ciclo vitale è aplodiplonte eteromorfo, con **dominanza della fase aploide**. Questo è rilevante perché permette di osservare immediatamente le mutazioni senza un secondo gene a mascherarle.
- Il suo **genoma**, sia nucleare (27 cromosomi 500Mbp) che mitocondriale, è stato **interamente sequenziato**.
- *P. patens*, nonostante sia un eucariote superiore, presenta un **alto tasso di ricombinazione omologa (HR)** in maniera analoga agli eucarioti inferiori e procarioti.



Adattato da: Pezza Lab, The Homologous Recombination Pathway, OMRF.

3 Tecniche di coltivazione

P. patens è un organismo molto semplice ed economico da coltivare. Può essere cresciuto sia in agar che in colture liquide, come bioreattori.

Il protonema cresce in assenza di fitormoni, è quindi sufficiente la frammentazione dei filamenti per mantenerlo in sospensione.

Viene coltivato in colture axeniche, rendendo la contaminazione da parte dei patogeni umani improbabile, i fattori ambientali possono essere modificati a piacimento.

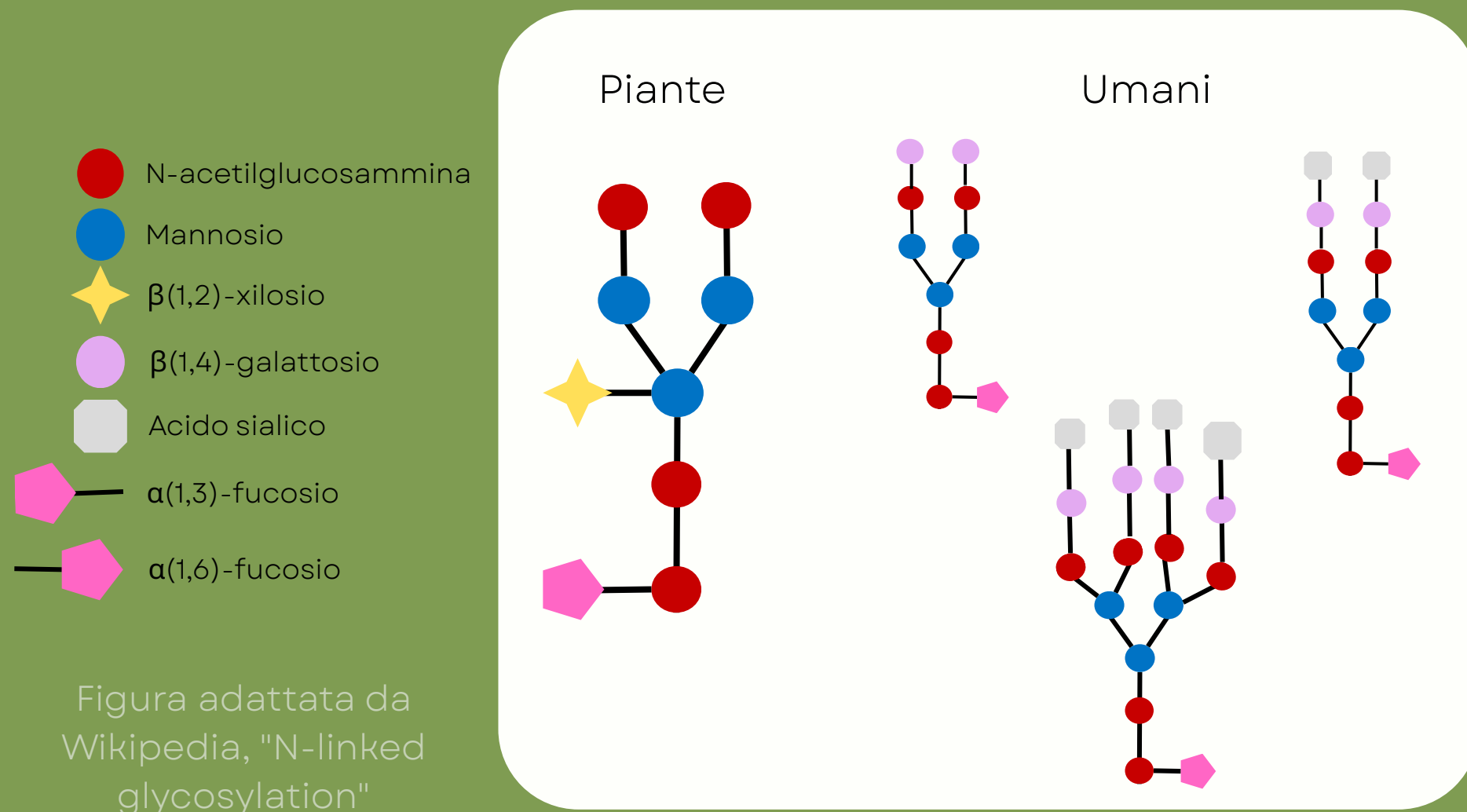
I sistemi di coltura utilizzati sono: shaking flasks, flasks areati, fotobioreattori, wave bag reactors (monouso).

Tecniche di ingegneria genetica utilizzate su *P. patens*

- **Trasformazione tramite particle bombardment del protonema**: Permette integrazione stabile del DNA. Viene utilizzata anche la trasformazione mediata da **polietilenglicole (PEG) dei protoplasti**, che sfrutta l'elevata efficienza di ricombinazione omologa di *P. patens*.
- Il **knock-out** presenta alcune limitazioni. I geni di *P. patens* presentano famiglie e sono ridondanti, oltretutto essendo aploide mirare a geni essenziali causa la morte della pianta.
 - RNA interference (RNAi): Permette di silenziare più geni contemporaneamente, ma l'efficienza del knockdown può essere variabile.
- **CRISPR-Cas9**: Supera sia i problemi della HR che degli RNAi. Molto efficiente.
- **Mutagenesi**:
 - Mutageni chimici e UV;
 - Inserzione di retrotrasposoni Tnt1

N-glicosilazione e O-glicosilazione: differenze tra mammiferi e *P. patens*

La glicosilazione è una modificazione post-traduzionale delle proteine. Avviene nel reticolo endoplasmatico (RE) e nell'apparato di Golgi, ed è specie-specifico. Una errata glicosilazione può causare gravi conseguenze nel paziente quindi è importante "umanizzare" il più possibile la glicosilazione di *P. patens*.



N-glicosilazione

	Umana (mammiferi)	Vegetale
Fucosilazione del core	$\alpha(1,6)$ -Fucosio	$\alpha(1,3)$ -Fucosio (immunogenico)
Xilosilazione	Assente	$\beta(1,2)$ -Xilosio (immunogenico)
Allungamento	$\beta(1,4)$ -Galattosio	$\beta(1,3)$ -Galattosio
Terminazione	Acido Sialico	Assente o struttura di Lewis A
Epitopi rari	Rari	Lewis A

O-glicosilazione

	Umana (mammiferi)	Vegetale
Aminoacido	Serina/Treonina	Idrossiprolina
Zucchero iniziale	GalNAc	Arabinosio o Galattosio
Acido sialico	Presente	Assente

6

Effetti di una glicosilazione errata

1. **Immunogenicità e reazioni avverse:** rischi più importanti per la sicurezza del paziente. Dovuti a:

- a. Residui come $\alpha(1,3)$ -Fucosio e $\beta(1,2)$ -Xilosio, riconosciuti come estranei dal sistema immunitario;
- b. Risposta IgE e IgG che causano reazioni allergiche e ipersensibilità;
- c. L'epitopo "Lewis a" è fortemente immunogenico;
- d. Conformazione 3D della glicoproteina.

2. **Farmacologia ed emivita**

- a. Mancanza di sialilazione, che riduce l'emivita dei farmaci.

Glicosilazione piante

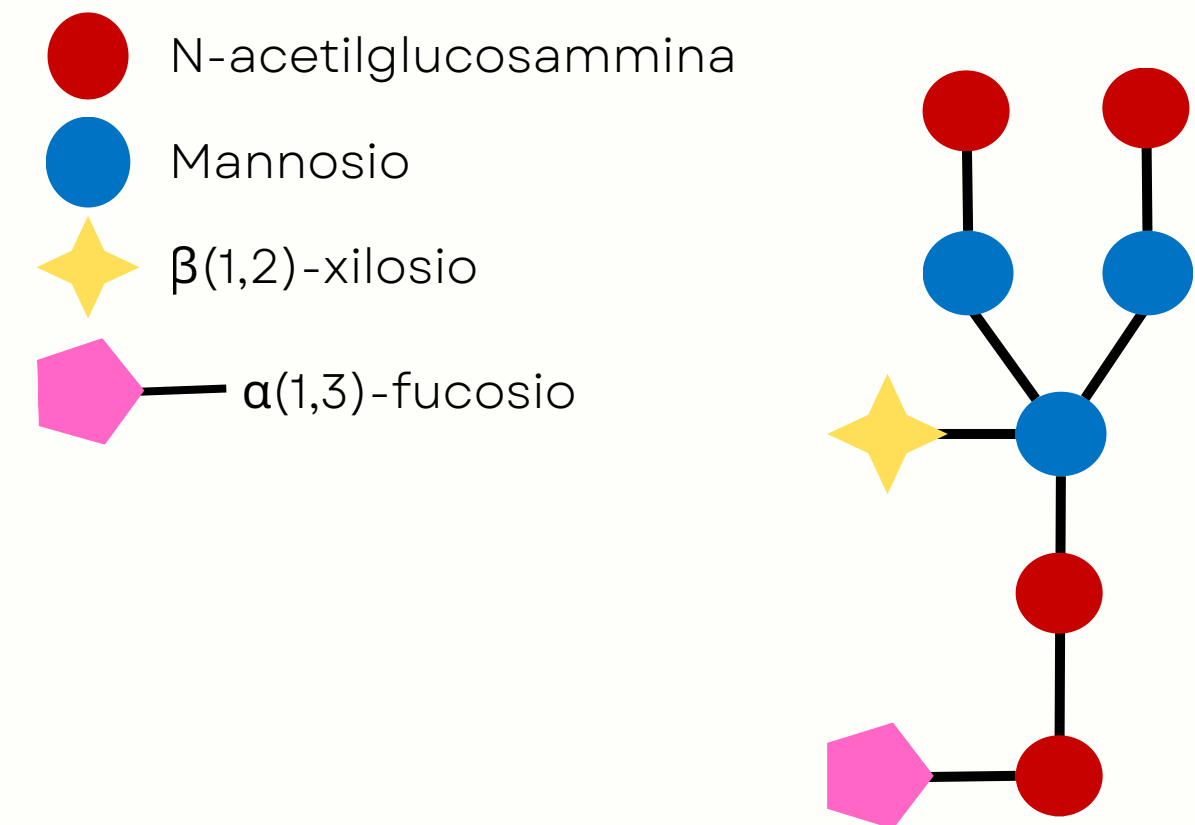


Figura adattata da Wikipedia, "N-linked glycosylation"

Glyco-engineering di *P. patens*

Attraverso il glyco-engineering *P. patens* viene modificata per produrre glicoproteine con pattern di glicosilazione simili a quelli umani, riducendone l'immunogenicità.

Interventi di glyco-engineering

Eliminazione della N-glicosilazioni specifiche delle piante, tramite knock-out dei geni della $\beta(1,2)$ -xilosiltransferasi (XylT) e la $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasi (FucT).

Il Fucosio in posizione $\alpha(1,6)$ è assente nelle piante ma presente negli umani. Non rappresenta uno svantaggio, anzi aumenta la risposta delle Natural Killer di 40 volte rispetto ad anticoripi fucosilati prodotti in CHO.

Rimozione della struttura di Lewis A tramite il knock-out del gene *galt1*, questo non porta ad effetti negativi nella pianta.

Andando ad effettuare knock-out del gene della proteina *prolil-4-idrossilasi* (*p4h*), in particolare *p4h1*. Importante perché molte proteine umane possono essere suo substrato.

La sialilazione rappresenta ancora una sfida, in quanto le piante non presentano il substrato e l'enzima per svolgerla.

La ritenzione nel RE è un approccio alternativo al knock-out. Si impediscono in questo modo le modifiche nel Golgi. Si attua aggiungendo un segnale di ritenzione al C-terminale della proteina.

Confronto con i sistemi tradizionali

	<i>Escherichia coli</i>	Linea cellulare dell'ovaio del criceto cinese	<i>Physcomitrium patens</i>
Costo	Basso	Elevato: richiede terreni costosi e gestione complessa	Medio-basso: costi ridotti per terreni e purificazioni semplificate
Glicosilazione	Assente: non supporta modificazioni post-traduzionali complesse	Presente: capace di glicosilazione complessa, ma può commettere errori	Elevata: capace di glicosilazione complessa, può produrre pattern specifici
Sicurezza	Rischio endotossine	Rischio virus e contaminazione	Elevata: assenza di patogeni umani, virus o endotossine
Resa	Alta: tra 0,5-0,8g/L	Molto alta: tra 1-3g/L	Tra 0,005-200mg/L

9 Conclusioni

L'utilizzo di *P. patens* per la produzione di biofarmaci risulta essere un approccio economico, semplice e rapido rispetto ai metodi classici. Il suo ciclo vitale aplodiplonte eteromorfo, che permette l'identificazione immediata dei mutanti, unito alla disponibilità del genoma completamente sequenziato ed il suo alto tasso di ricombinazione omologa, lo rendono uno strumento di precisione per il glyco-engineering.

Rimangono comunque delle sfide aperte per l'utilizzo di questo organismo come il problema della sialilazione, che causa emivita piuttosto brevi delle proteine prodotte. Ma i successi con anticorpi monoclonali e altre proteine indicano che *P. patens* è un organismo che può essere utilizzato su larga scala, offrendo dei biofarmaci sicuri ed economici.



Bibliografia

- Rensing, S. A., Goffinet, B., Meyberg, R., Wu, S. Z., & Bezanilla, M. (2020). The Moss *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. *The Plant cell*, 32(5), 1361–1376. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00828>
- Kamisugi, Y., Schlink, K., Rensing, S. A., Schween, G., von Stackelberg, M., Cuming, A. C., Reski, R., & Cove, D. J. (2006). The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic acids research*, 34(21), 6205–6214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl832>
- Decker, E. L., Parsons, J., & Reski, R. (2014). Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Frontiers in plant science*, 5, 346. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00346>
- Sakil, M.A. *Physcomitrium patens*: an emerging model for autophagy study. *Protoplasma* (2025). <https://doi.org/10.1007/s00709-025-02148-9>
- Schaefer DG. Principles and protocols for the moss *Physcomitrella patens* [Internet]. Lausanne: Institute of Ecology, Laboratory of Plant Cell Genetics, University of Lausanne; 2001 [citato il 29 lug 2025]. <https://www.zryd.net/LPC-2005/docs/pdf/PPprotocols2001.pdf>
- Gorres, K. L., & Raines, R. T. (2010). Prolyl 4-hydroxylase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(2), 106–124. <https://doi.org/10.3109/10409231003627991>
- Varki A, Cummings R, Esko J, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999. Chapter 8, O-Glycans. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20721/>
- Kaulfürst-Soboll, H., Mertens-Beer, M., Brehler, R., Albert, M., & von Schaewen, A. (2021). Complex N-glycans are important for normal fruit ripening and seed development in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635962>
- Fogarty, C. A., Harbison, A. M., Dugdale, A. R., & Fadda, E. (2020). How and why plants and human N-glycans are different: Insight from molecular dynamics into the "glycoblocks" architecture of complex carbohydrates. *Beilstein journal of organic chemistry*, 16, 2046–2056. <https://doi.org/10.3762/bjoc.16.171>
- Brockhausen I, Wandall HH, Hagen KGT, et al. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579921/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.10
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fitchette-Lainé, A. C., Gomord, V., & Faye, L. (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology*, 38(1–2), 31–48. <https://doi.org/10.1023/A:1006012005654>
- Gomord, V., Fitchette, A.-C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., & Faye, L. (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), 564–587. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x>
- Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant biotechnology journal*, 10(3), 249–268. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x>
- Reski, R., Parsons, J., & Decker, E. L. (2015). Moss-made pharmaceuticals: From bench to bedside. *Plant Biotechnology Journal*, 13(8), 1191–1198. <https://doi.org/10.1111/pbi.12401>



Riassunto esteso

Le proteine biofarmaceutiche, come anticorpi e fattori di crescita, sono essenziali per il trattamento di numerose patologie moderne, ma essendo molto complesse non è possibile produrle in vitro e risulta necessario l'utilizzo di organismi geneticamente modificati per la loro sintesi. *Escherichia coli* e la linea cellulare dell'ovario del criceto cinese (CHO) sono largamente utilizzate, ma presentano delle limitazioni importanti: la prima non può svolgere glicosilazioni eucariotiche, la seconda è costosa e presenta rischi di contaminazione da parte di patogeni umani.

Questa tesi analizza l'utilizzo del muschio *Physcomitrium patens* come piattaforma innovativa per l'espressione di proteine biofarmaceutiche “umanizzate”. *P. patens* si distingue come organismo modello per diverse caratteristiche: la dominanza della fase aploide nel suo ciclo vitale, che permette di vedere subito eventuali mutazioni; un genoma interamente sequenziato, ma più importante, l'alta frequenza di ricombinazione omologa, che ne permette la facile manipolazione genetica.

Quest'ultima caratteristica è rilevante in quanto le piante presentano dei pattern di glicosilazione differenti da quelli umani, presentando residui come il $\beta(1,2)$ -xiloso e l' $\alpha(1,3)$ -fucosio, che se non eliminati possono scatenare reazioni immunitarie nel paziente. Le tecniche utilizzate sono la trasformazione mediata da PEG e CRISPR-Cas9, è stato possibile generare delle linee di *P. patens* “knock-out” prive di questi residui, “umanizzando” il profilo di glicosilazione. Altre modificazioni sono la rimozione della struttura di Lewis A tramite il knock-out del gene *galt1* e la rimozione del gene della prolil-4-idrossilasi.

In conclusione, nonostante rimangano sfide come l'implementazione della sialilazione per aumentare l'emivita proteica, *P. patens* rappresenta una piattaforma sicura (priva di endotossine e virus umani), economica e con possibilità di essere prodotto su scala globale per la produzione di biofarmaci.