



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

Produzione del fattore di inizio della traduzione eIF4E in *Escherichia coli*

**Production of recombinant translation initiation factor eIF4E in
*Escherichia coli***

Tesi di Laurea Magistrale di:

Veronica Di Fonzo

Relatore:

Prof. Daniele Di Marino

Correlatori:

Prof.ssa Anna La Teana

Dott.ssa Alice Romagnoli

Sessione Estiva

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

INTRODUZIONE	4
<i>1.1 Apparato di traduzione</i>	4
<i>1.2 Meccanismo della sintesi proteica</i>	6
<i>1.2.1 Fase di inizio</i>	7
<i>1.2.2 eIF4E: struttura e funzione</i>	10
<i>1.2.3 eIF4E: regolazione</i>	13
<i>1.2.4 eIF4E nelle patologie</i>	16
<i>Scopo della tesi</i>	20
MATERIALI E METODI.....	23
<i>2.1 Vettore pMCSG7</i>	23
<i>2.2 Propagazione del vettore in cellule competenti GC-5</i>	25
<i>2.3 Purificazione del plasmide</i>	26
<i>2.4 Analisi della sequenza</i>	26
<i>2.5 Ligation Independent Cloning</i>	29
<i>2.5.1 Trattamento del vettore e dell'inserto</i>	30
<i>2.5.2 LIC Annealing</i>	32
<i>2.6 Trasformazione in cellule competenti GC-5</i>	33
<i>2.7 Colony PCR</i>	34
<i>2.8 Trasformazione in ceppi di E. coli</i>	35
<i>2.9 Induzione dell'espressione tramite IPTG</i>	37
<i>2.10 Test di solubilità</i>	39
<i>2.11 Produzione della proteina su larga scala</i>	39

<i>2.12 Purificazione mediante cromatografia di affinità</i>	40
<i>2.13 Estrazione da corpi di inclusione</i>	41
<i>2.14 Dialisi – Refolding</i>	42
<i>2.15 Concentrazione della proteina</i>	43
<i>2.16 Cromatografia di esclusione molecolare</i>	44
<i>2.17 Elettroforesi</i>	44
<i>2.18 Western blot</i>	45
<i>2.19 m⁷GTP pull down assay</i>	46
RISULTATI	51
<i>3.1 Amplificazione di eIF4E DNA</i>	49
<i>3.2 Digestione pMCSG7 e amplificazione inserto</i>	50
<i>3.3 Colony PCR</i>	51
<i>3.4 Prove di induzione in piccola scala</i>	52
<i>3.5 Test di solubilità</i>	54
<i>3.6 Estrazione da corpi di inclusione e cromatografia di esclusione molecolare</i>	55
<i>3.7 Western blot</i>	59
<i>3.8 m⁷GTP pull down assay</i>	60
DISCUSSIONE	62
CONCLUSIONI	63
BIBLIOGRAFIA	65
RINGRAZIAMENTI	68

INTRODUZIONE

La sintesi proteica coinvolge interazioni tra tre tipi di molecole di RNA: l'mRNA (RNA messaggero), il tRNA (RNA di trasferimento) e l'rRNA (RNA ribosomiale). Tutti questi, prodotti in seguito al processo di *trascrizione*, subiscono una serie di importanti modificazioni per poter svolgere le loro funzioni. Oltre a questi RNA, sono necessari vari fattori proteici per le fasi di inizio, di allungamento e di terminazione della traduzione^[1].

1.1 Apparato di traduzione

I ribosomi rappresentano la componente principale dell'intero processo di traduzione. Questi sono particelle ribonucleoproteiche costituite da alcune molecole di RNA (rRNA) e da numerose proteine (r-proteine). rRNA e r-proteine sono assemblati a costituire due subunità ribosomiali distinte, che negli eucarioti sono una maggiore, definita 60S e una minore 40S. I ribosomi interagiscono con il tRNA per cui presentano tre siti di legame: il sito A (Accettore) che lega il tRNA aminoacilato in ingresso, il sito P (Peptidilico) che lega l'ultimo tRNA entrato e porta la catena peptidica nascente, e il sito E (Exit) che lega il tRNA ormai scarico che deve essere rilasciato.

I tRNA sono piccole molecole, per ognuna delle quali è associato almeno un tipo dei 20 aminoacidi utilizzati nella sintesi proteica. Presentano una caratteristica struttura secondaria a trifoglio in cui si riconoscono un braccio accettore formato dalle due estremità della molecola e tre bracci costituiti ciascuno da uno stelo a doppio filamento e da un'ansa di basi non appaiate, chiamati braccio TΨC, braccio D e braccio dell'anticodone.

I tRNA sono in grado di riconoscere, con l'aiuto del ribosoma ed enzimi, il codone tramite interazioni specifiche codone-anticodone.

L'RNA messaggero (mRNA) codifica e porta le informazioni durante la trascrizione dal DNA ai siti della sintesi proteica, per essere sottoposto alla traduzione. È caratterizzato da particolari modificazioni alle due estremità 5' e 3': il cappuccio (cap o 5'cap) all'estremità 5' e la coda di poli(A), costituita da una lunga sequenza di nucleotidi adenina, all'estremità 3'. Di particolare importanza per la sintesi proteica è il 5'cap, nucleotide guaninico modificato che viene aggiunto all'estremità 5' dell'mRNA appena dopo l'inizio della trascrizione; consiste in un residuo terminale di 7-metilguanosina legato tramite un legame 5'-5'-trifosfato al primo nucleotide trascritto (per questo il cap viene anche chiamato m⁷GTP) e la sua presenza è importante per il riconoscimento e il legame da parte dei fattori di inizio della traduzione permettendo il reclutamento del ribosoma. Inoltre, alle estremità sono presenti anche regioni

non tradotte, abbreviate con la sigla UTR (*untranslated region*): la 5' UTR (chiamata anche *sequenza leader*) inizia nel sito di inizio della trascrizione e finisce un nucleotide prima del sito di inizio della traduzione che è composto dalla sequenza AUG. Nei procarioti, solitamente contiene un sito di legame ribosomiale (RBS), anche nota come sequenza di Shine Dalgarno (AGGAGGU). Ha una lunghezza media di circa 150 nucleotidi negli eucarioti, ma può essere lunga diverse migliaia di basi; la 3' UTR (chiamata anche *sequenza trailer*) è la regione dell' mRNA collocata a valle della CDS (sequenza codificante di un gene) e segue immediatamente il codone di terminazione di traduzione di un gene. Tale regione influenza la poliadenilazione, l'efficienza di traduzione, la localizzazione e la stabilità dell' mRNA, e contiene siti di legame per fattori regolatori.

1.2 Meccanismo della sintesi proteica

L'interazione tra i vari componenti dell'apparato di traduzione, descritti precedentemente, risulta nella "traduzione" dell'informazione genetica portata dalla sequenza di basi dell'RNA messaggero nella sequenza di aminoacidi del prodotto proteico^[1]. Il processo è complesso ed è molto conservato in tutti gli organismi, fatta eccezione per l'inizio della sintesi proteica che differisce

leggermente tra procarioti ed eucarioti per via del numero e del meccanismo di interazione dei fattori coinvolti. L'intero processo si compone di tre fasi: fase di inizio, fase di allungamento e fase di terminazione.

1.2.1 Fase di inizio

La traduzione inizia con la formazione di un complesso tra la subunità ribosomiale minore, l'mRNA e il tRNA di inizio, che vanno a costituire il cosiddetto complesso di pre-inizio 43S. In questa fase sono necessari anche oltre 30 diverse proteine. Innanzitutto, il reclutamento del tRNA di inizio sulla subunità ribosomiale minore è mediato dalle proteine eIF2-GTP ed eIF5. Nel frattempo e indipendentemente, si forma il complesso eIF4F, composto da tre subunità: eIF4A, una RNA elicasi che separa le strutture secondarie al 5'UTR dell'mRNA; eIF4E, che è la proteina che lega il 5'cap; eIF4G, definita proteina *scaffold* in quanto interagisce con eIF4E e eIF4A, con la poly (A)-binding protein (PABP) all'estremità 3' dell'RNA messaggero e recluta il fattore eIF3, il quale richiama la subunità ribosomiale minore 40S partecipando così alla formazione del complesso di pre-inizio 43S.

La fase di inizio è lo step limitante dell'intero processo ed è soggetta ad un'estesa regolazione. Dopo l'assemblaggio e il legame al cap, il complesso di pre-inizio 43S scorre sul 5'UTR dell'mRNA in direzione 5' → 3', finché non

incontra il codone di inizio (AUG) dove si ferma e permette alla subunità ribosomiale 60S di legarsi per formare il complesso ribosomiale completo 80S, step seguito dalla fase di allungamento. Inoltre, l'interazione di eIF4G con la PABP porta alla circolarizzazione dell'mRNA, che aumenta l'efficienza di traduzione^[3].

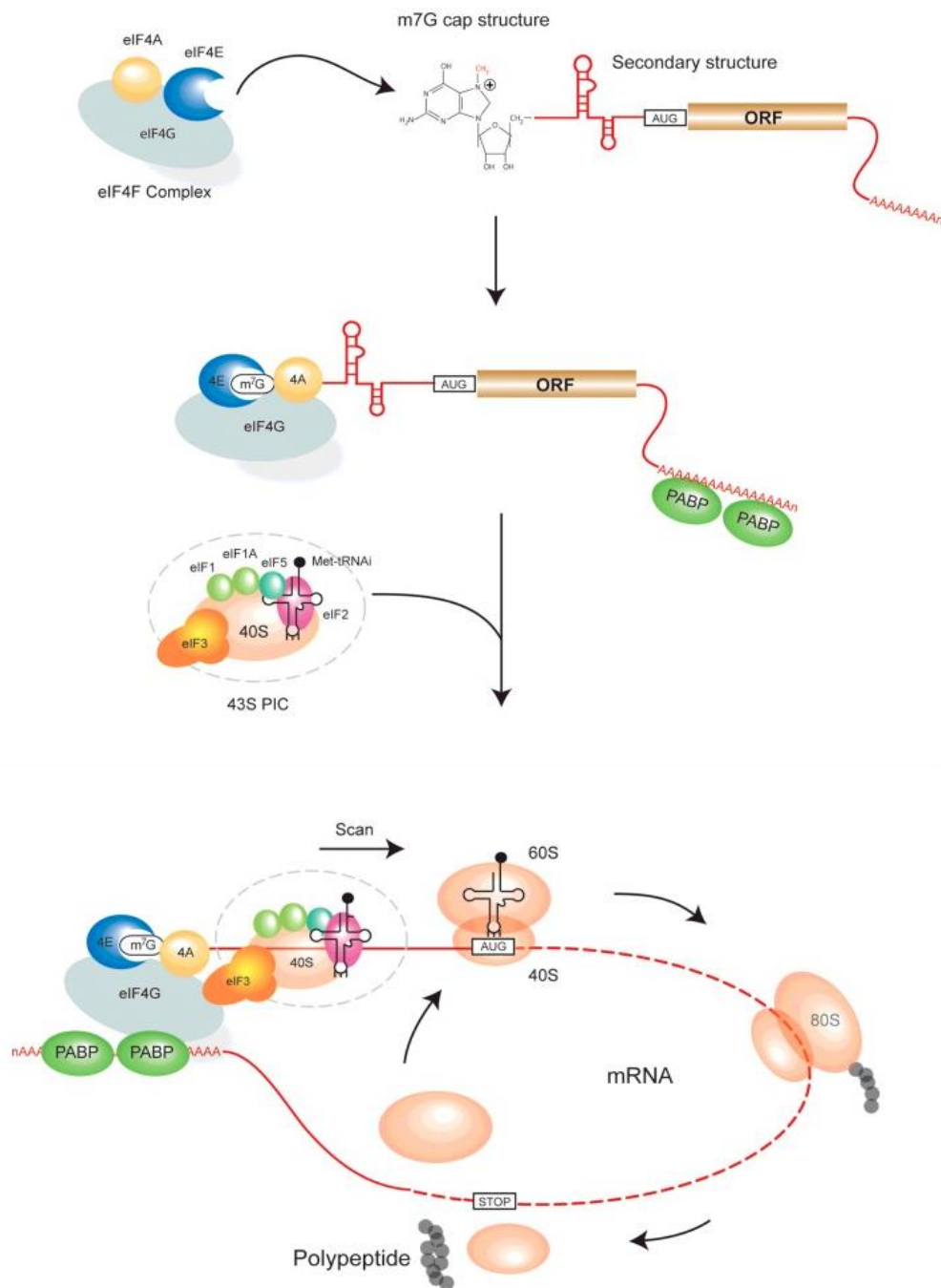


Figura 1. Inizio della traduzione cap-dipendente^[3]. eIF4F si lega alla struttura del cap m⁷G tramite eIF4E. eIF4G è una proteina *scaffold* che si lega anche all'RNA elicasi eIF4A ed eIF3, che a loro volta reclutano il complesso di pre-inizio 43S (PIC). Il PIC è costituito dalla subunità ribosomiale 40S, eIF2-GTP-Met-tRNA_i e diversi altri fattori. eIF4A svolge la struttura secondaria in 5'-UTR e il PIC esegue la scansione dell'mRNA fino a quando non incontra il codone di inizio AUG dove si unisce la subunità 60S, seguita dalla sintesi della catena peptidica. eIF4G si lega anche alla PABP che determina la circularizzazione dell'mRNA consentendo un'efficiente scansione della sequenza da parte del ribosoma.

1.2.2 eIF4E: struttura e funzione

Il fattore di traduzione eIF4E è codificato dal gene EIF4E situato sul cromosoma 4, presenta una struttura primaria costituita da 217 aminoacidi e ha un peso molecolare di circa 25 kDa. La struttura tridimensionale è stata ben caratterizzata in diversi organismi, tra cui l'uomo ed è composta da 8 foglietti β antiparalleli e 3 α -eliche sulla superficie dorsale. Sono presenti due principali siti di legame: il sito di legame per il 5'cap e quello situato sulla superficie dorsale. L'interazione tra eIF4E il 5'cap è determinata dalla formazione del legame tra la 7-metilguanina e due residui conservati di triptofano situati all'interno della tasca che lega il cap (Trp-56 e Trp-102)^[2]. La superficie dorsale mostra una porzione idrofobica responsabile dell'interazione tra eIF4E e eIF4G e tra eIF4E e le 4E-binding proteins (4E-BPs), come 4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3. Poiché eIF4G e le 4E-BPs hanno lo stesso sito di legame, competono tra di loro per l'interazione con eIF4E.

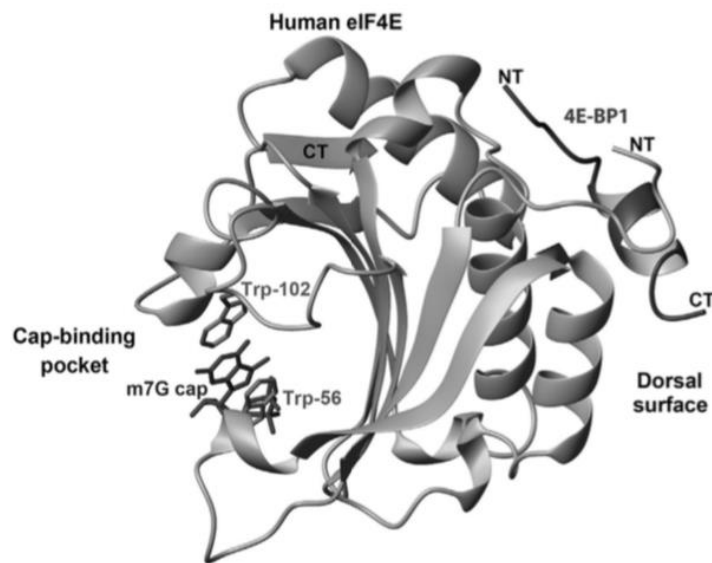


Figura 2. Struttura di eIF4E umano. La struttura tridimensionale di eIF4E umano è caratterizzata da otto foglietti β antiparalleli e tre α -eliche. L'interazione di eIF4E con la struttura del cap avviene all'interno della tasca di legame del cap, mentre il legame con eIF4G e le 4E-BPs avviene sulla superficie dorsale di eIF4E. CT: C-terminus; NT: N-terminus.

eIF4G e le 4E-BPs interagiscono con eIF4E attraverso un motivo conservato, definito per questo sito di legame canonico, il quale ha una struttura a α -elica composta dalla sequenza YXXXXLF (dove Y indica Tyr, X indica qualsiasi amminoacido, L indica Leu e F indica un residuo idrofobico) ^[4]. La presenza di questo sito di legame canonico fa sì che le 4E-BPs competano con eIF4G per l'interazione a livello dello stesso sulla superficie dorsale di eIF4E, consentendo una regolazione dell'inizio della traduzione. Tuttavia, negli ultimi anni, è stato visto che le 4E-BP contengono, a valle dei motivi canonici, anche motivi definiti non canonici; i due siti sono connessi tra loro da una regione detta *linker* di 15-30 residui^[4]. La composizione in aminoacidi del motivo non canonico tra le diverse 4E-BPs e eIF4G non è conservata, questa differenza

conferisce alle 4E-BPs, in assenza di altre modificazioni, un'affinità con eIF4E maggiore di tre ordini di grandezza rispetto a eIF4G.

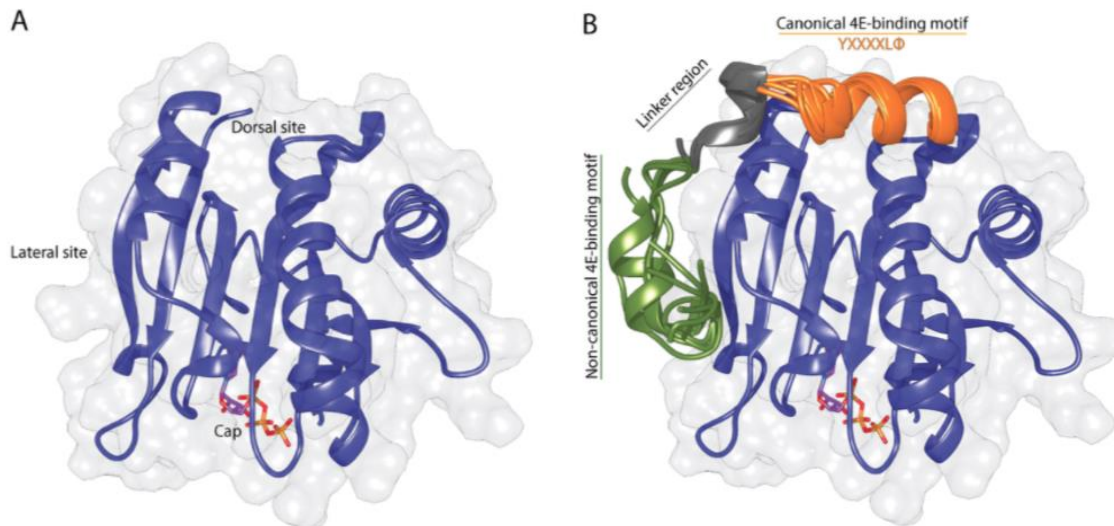


Figura 3. (A) Rappresentazione a nastro della superficie molecolare di eIF4E in cui sono riportati il cap, la superficie laterale e quella dorsale. (B) Rappresentazione della struttura a nastro di eIF4E insieme alla sovrapposizione di 7 diverse 4E-BP e eIF4G, che sono stati co-cristallizzati con eIF4E. Il motivo canonico, la regione *linker* e il motivo non canonico sono riportati rispettivamente in arancione, grigio e verde.

eIF4E rappresenta un elemento chiave all'interno delle cellule in quanto, oltre alla sua funzione citoplasmatica come fattore di traduzione, la sua presenza è stata rilevata anche nel nucleo, dove è coinvolto nel trasporto nucleocitoplasmatico di alcuni mRNA che presentano il cap m7G e una sequenza di circa 50 nucleotidi al 3'-UTR chiamata "*eIF4E sensitivity element*" (4E-SE)^[2]. Inoltre, la funzione di eIF4E nel nucleo è associata anche ad un'attività di repressione della traduzione, in quanto eIF4E è coinvolto nel processamento di mRNA specifici nei corpi P (*processing bodies*, implicati nella degradazione degli mRNA)^[2]. Infine, è stato dimostrato anche che eIF4E migliora fortemente

l'attività dell'elicasi eIF4A, indipendentemente dalla sua funzione di associazione al 5'cap^[2].

1.2.3 eIF4E: regolazione

La regolazione del fattore eIF4E avviene a diversi livelli. 4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3 sono i principali regolatori di eIF4E, in quanto sequestrano il fattore di traduzione dal legame con eIF4G, impedendo così l'assemblaggio del complesso eIF4F^[5]. La regolazione da parte delle 4E-BPs è fondamentale nel controllare i livelli di traduzione e quindi l'attività di eIF4E poiché molte evidenze mostrano che una sua deregolazione è associata alla progressione di diverse patologie^[5,6,7,8].

Diversi stimoli extracellulari influenzano l'abbondanza di eIF4E mediante attivazione trascrizionale mediata da Myc (proto-oncogene) e modulano positivamente la sua attività attraverso la fosforilazione dovuta all'attivazione del *pathway* delle chinasi Ras / MAPK, responsabili della regolazione dei processi di proliferazione e differenziazione cellulare.

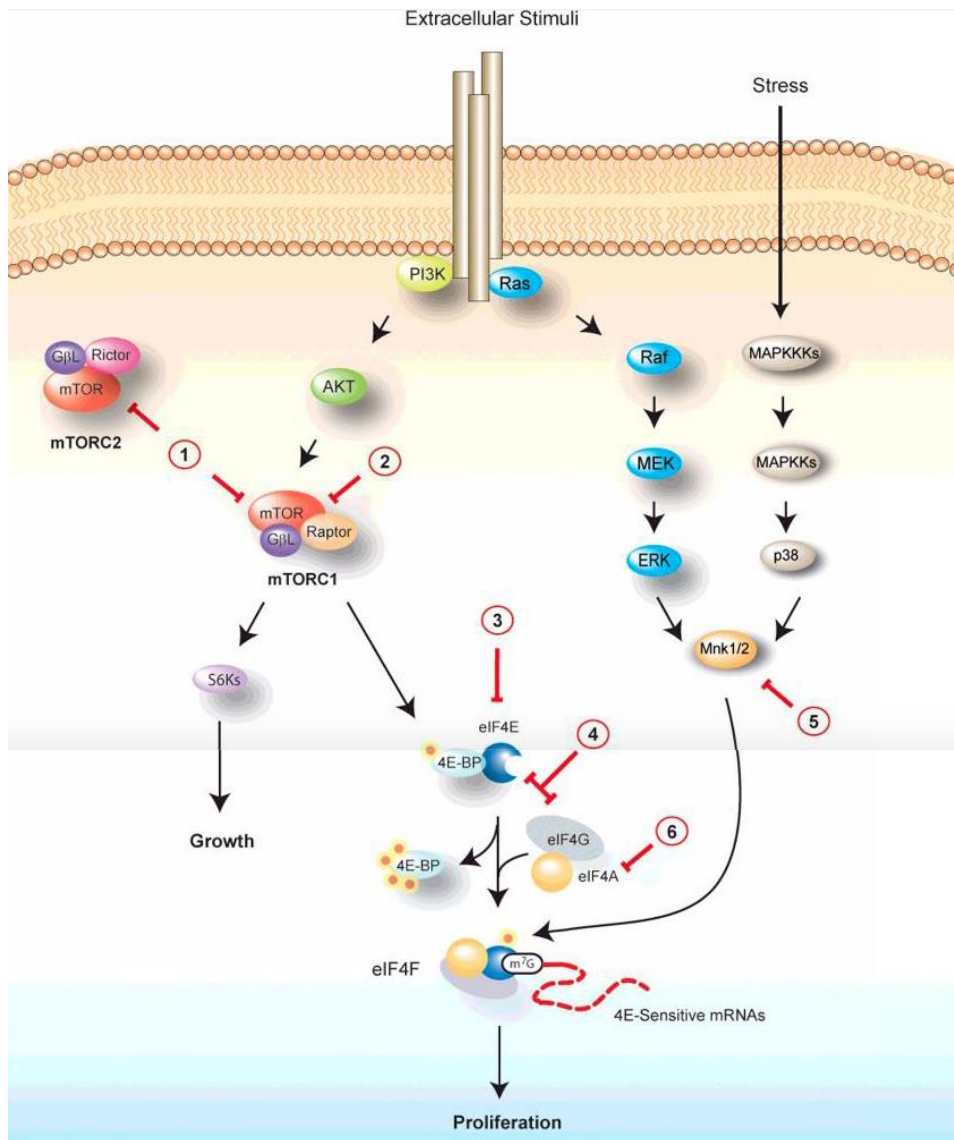


Figura 4. Percorsi di trasduzione del segnale convergenti su eIF4E^[3]. Il pathway PI3K viene attivato in risposta a molti stimoli extracellulari con conseguente attivazione della serina / treonina chinasi a valle, mTOR. mTOR è una proteina multi-dominio che si associa a diversi partner di legame per formare due diversi complessi mTORC1 e mTORC2. mTORC1 fosforila i repressori della traduzione, le 4E-BP, che poi si dissociano da eIF4E, consentendo la formazione di eIF4F e promuovendo così la traduzione. I segnali mitogeni e di stress attivano i componenti del pathway MAPK, inclusi ERK e chinasi p38 MAP. Entrambi convergono per attivare Mnk1 / 2, che si lega a eIF4G e fosforila eIF4E sul residuo Ser209. Entrambi i pathway sono iper-attivati nella maggior parte dei tumori maligni umani. Questi pathway e fattori di inizio della traduzione possono essere usati come target, e quindi essere bloccati (mostrati in rosso).

Mentre la fosforilazione di eIF4E, ad opera del *pathway* della MAPK sul residuo Ser²⁰⁹, modifica l'affinità di eIF4F per il cap, la stimolazione del *pathway* della fosfatidilinositolo 3-chinasi / AKT / mTOR (*mammalian target of rapamycin*) porta alla fosforilazione gerarchica delle 4E-BP, allontanandole da eIF4E e consentendo l'assemblaggio del complesso eIF4F^[6].

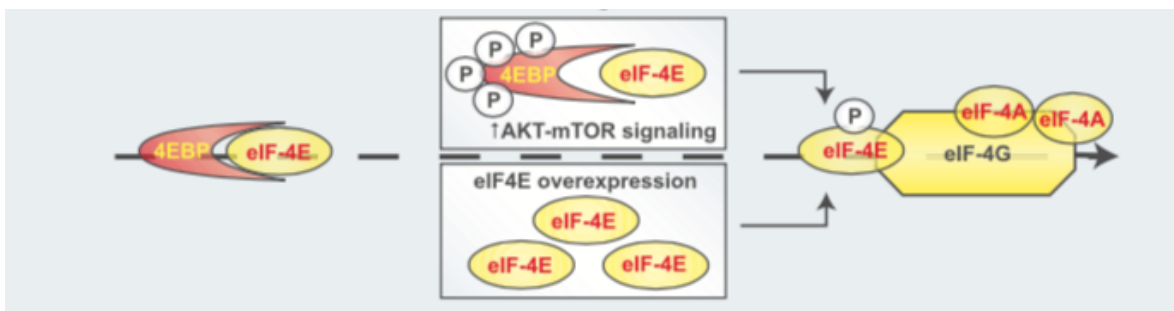


Figura 5. La disponibilità di eIF4E è aumentata con lo sviluppo e la progressione del tumore a causa della sovraespressione di eIF4E e / o aumento della segnalazione attraverso mTOR, che fosforila le 4E-BP, rilasciando eIF4E^[5].

Fattori di crescita e di sopravvivenza regolano positivamente la formazione di eIF4F promuovendo la fosforilazione sequenziale delle 4E-BP su sei siti serina / treonina attraverso segnali da parte delle protein-chinasi Ras-dipendenti.

La 4E-BP iperfosforilata ha una ridotta affinità per eIF4E, rendendolo così libero di interagire con eIF4G e iniziare la traduzione.

1.2.4 eIF4E nelle patologie

Nella cellula eucariotica, alcuni mRNA codificano per citochine e fattori anti-apoptotici o pro-tumorali, e sono maggiormente influenzati dalla disponibilità e da alti livelli di eIF4E, per questo definiti “mRNA deboli”; presentano regioni 5’UTR lunghe, ricche di G + C, altamente strutturate per cui vengono scarsamente tradotti in condizioni normali. Al contrario, la maggior parte degli mRNA cellulari, come quelli che codificano per geni costitutivi o *housekeeping*, ha 5’UTR relativamente brevi, non strutturati e meno influenzati dalla presenza di eIF4E, definiti “mRNA forti”.

È stato osservato che un aumento di eIF4E, a causa di una diminuzione della sua regolazione come descritto precedentemente, aumenta la traduzione di mRNA deboli, incrementando il trasporto nucleocitoplasmatico di quelli che codificano per proteine regolatrici della crescita, come la ciclina D1, della sopravvivenza cellulare, angiogenesi e metastasi (ad esempio, c-myc, ODC, VEGF.). È interessante notare che la maggior parte degli mRNA che sono caratterizzati da 5’UTR brevi e non strutturati (ad esempio, β -actina) non sono particolarmente influenzati da cambiamenti nell'attività di eIF4E^[7].

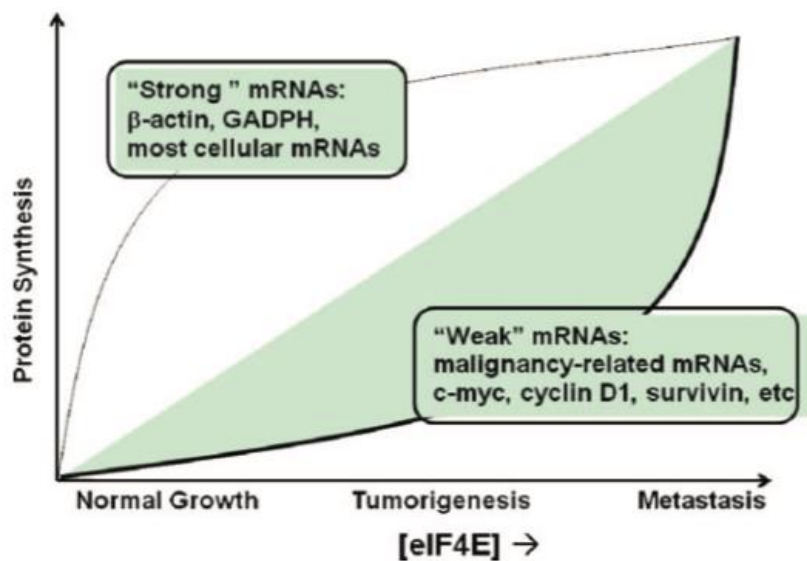


Figura 6. Gli mRNA cellulari possono essere suddivisi in due grandi categorie: gli mRNA ‘forti’, che sono ben tradotti anche quando la disponibilità di eIF4E è limitante, e gli mRNA ‘deboli’, che sono tradotti solo quando la disponibilità di eIF4E è aumentata, come nel cancro.

Non sorprende quindi che aumentando selettivamente l'espressione proteica di fattori di crescita, angiogenesi e sopravvivenza, un'elevata espressione di eIF4E può indurre trasformazione cellulare e oncogenesi.

È stato visto, per esempio, che nelle cellule del cancro alla mammella la 4E-BP1 è altamente fosforilata e il fattore eIF4G è over-espresso, e ciò permette l'assemblaggio del complesso con eIF4E che dà inizio alla traduzione di fattori di sopravvivenza cellulare, i quali sviluppano resistenza nei confronti del processo di apoptosi^[8].

Un altro esempio è il ruolo di eIF4E nelle malattie neurodegenerative o disturbi del neurosviluppo, come nel caso dell'autismo, della sindrome dell'X fragile e

di disturbi dello spettro autistico (ASD). Alcuni dati suggeriscono che la ridotta efficienza o mancanza della 4E-BP2 e un'aumentata espressione di eIF4E portano ad un'intensificazione della traduzione delle neuroligine, proteine post-sinaptiche collegate all'ASD^[9].

Considerando i dati riportati, ridurre o inibire la funzione di eIF4E potrebbe essere utile nel trattamento di numerose patologie in cui il fattore di traduzione è direttamente o indirettamente implicato, a questo proposito sono in fase di sperimentazione diverse molecole in grado di interferire con l'attività di eIF4E^[3,5,7].

Diverse strategie sono state adottate per bloccare, per esempio, l'interazione tra eIF4E e il 5' cap; il maggiore rappresentante di questa categoria è la ribavirina, un analogo di 7 m-GTP che esercita la sua funzione attraverso la competizione per l'associazione con eIF4E^[7].

Un'altra strategia consiste nell'utilizzare oligonucleotidi antisenso (ASO), brevi molecole a singolo filamento di DNA complementari all'mRNA di eIF4E, che impediscono la traduzione della proteina legandosi specificamente all'acido ribonucleico^[7].

L'interazione tra eIF4E e eIF4G rappresenta, inoltre, un altro *target* promettente per ridurre l'attività di eIF4E. Una strategia utilizzata in questo senso, è stata il disegno di molecole in grado di competere con eIF4G per il

legame a eIF4E, come ad esempio, analoghi di eIF4G (eIF4GI-1)^[9] o peptidi strutturalmente basati sulle 4E-BPs, con elevata affinità per il fattore di traduzione^[7].

Degni di nota, infine, sono gli inibitori dei *pathway* di regolazione, come ad esempio gli inibitori di mTOR, in grado di interrompere i segnali a monte per la fosforilazione delle 4E-BPs e, di conseguenza, impedendo la dissociazione tra eIF4E e le 4E-BPs.

Scopo della tesi

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di produrre il fattore d'inizio della traduzione umano eIF4E attraverso tecniche di clonaggio, espressione e purificazione nel sistema di espressione batterico *E. coli*.

Il lavoro di tesi è stato svolto presso il centro di ricerca di biologia molecolare e strutturale NY-MaSBiC (New York-Marche Structural Biology Center) dell'Università Politecnica delle Marche e si inserisce all'interno di un progetto di ricerca più ampio, che prevede il disegno e la caratterizzazione di nuove molecole, chiamate peptidomimetici, in grado di regolare la traduzione di specifici messaggeri. Visto l'importante ruolo che eIF4E sembra avere in varie patologie, l'identificazione di nuovi composti ha un ruolo cruciale nella ricerca. Questi peptidi potrebbero rappresentare nuove potenziali molecole terapeutiche in quanto, rispetto alle altre molecole precedentemente citate e ad oggi sviluppate, sono composti organici con proprietà fisico-chimiche e caratteristiche strutturali paragonabili ai classici oligopeptidi ma hanno come vantaggio quello di garantire una protezione avanzata contro le peptidasi, un migliore trasporto sistemico e una maggiore penetrazione cellulare, una elevata specificità per il target e una scarsa risposta immunitaria.

Il Professor Di Marino, relatore di questa tesi e capo del progetto, essendo esperto nel disegno computazionale di peptidi, ha disegnato e caratterizzato

alcuni peptidi sulla base delle informazioni strutturali delle 4E-BPs. Tra questi peptidi uno in particolare è stato selezionato, chiamato Cy_9B, in quanto basato sulla struttura di una delle 4E-BP scoperta recentemente, chiamata CYFIP1 (*cytoplasmic Fragile X interacting protein 1*). La proteina CYFIP1, a differenza delle altre 4E-BP, lega eIF4E attraverso un piccolo dominio a alfa-elica poco conservato, in quanto la tirosina in posizione 1 e la leucina in posizione 6 del sito di legame canonico sono sostituite rispettivamente da una leucina e da un'arginina, mentre il residuo idrofobico in posizione 7 è sostituito dalla serina idrofila^[11], rendendo così più specifica l'interazione tra CYFIP1 ed eIF4E. Queste informazioni strutturali hanno permesso di disegnare peptidi che bloccano la funzione di eIF4E, allo scopo di ottenere molecole con potenza e specificità possibilmente superiori a quelli attualmente disponibili.

La proteina eIF4E, oggetto di questa tesi, è stata quindi prodotta e purificata per valutare l'affinità di legame tra il peptide ed eIF4E, attraverso esperimenti in vitro, sfruttando la tecnologia della risonanza plasmonica di superficie (*SPR*). Inoltre, servirà per la cristallizzazione del complesso tra la eIF4E ed il peptide, allo scopo di ottenere maggiori informazioni strutturali sulla loro interazione.

MATERIALI E METODI

Materiali e metodi

2.1 Vettore di espressione pMCSG7

Il vettore scelto per la produzione di eIF4E è un vettore della serie pMCSG originariamente prodotta dal Midwest Center for Structural Genomics (MCSG) e modificata all'NYCOMPS con l'aggiunta di 4 istidine per un totale di 10 (His) all'estremità N-terminale.

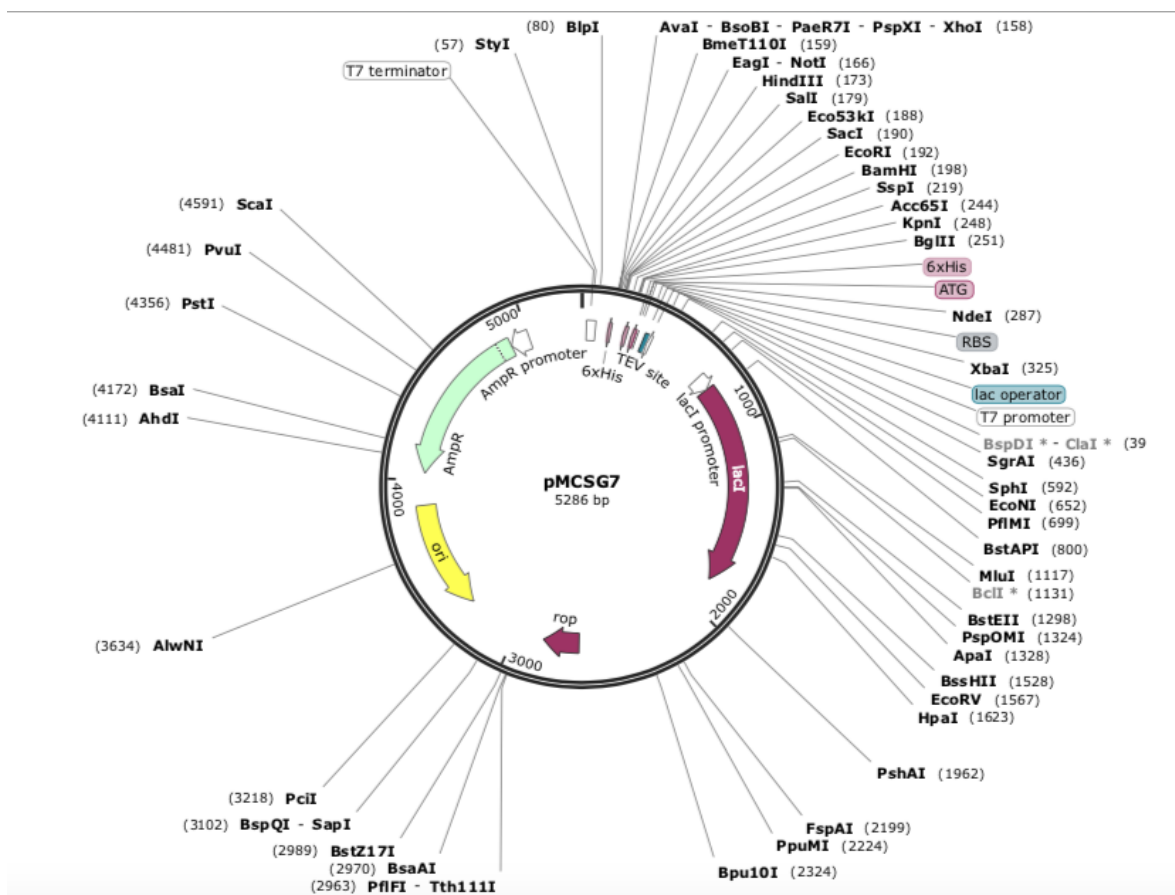


Figura 7. Mappa del vettore pMCSG7.

Il vettore pMCSG7 è un plasmide batterico, opportunamente modificato per permettere l'espressione della proteina di interesse. Presenta:

- promotore forte di T7, promotore del gene 10 del batteriofago T7, inducibile;
- operatore lac, per controllo produzione e induzione del gene target;
- sequenze RBS (siti di legame per i ribosomi), per la traduzione;
- 6X His-tag (a cui ne sono state aggiunte altre 4), per purificazione proteina di interesse;
- marker di selezione, cioè resistenza all'ampicillina;
- sito di taglio TEV, proteasi;
- sito di clonaggio LIC;
- terminatore di T7.

Il vettore è stato progettato e viene utilizzato per un tipo particolare di clonaggio, definito Ligation Independent Cloning (LIC)

2.2 Propagazione del vettore pMCSG7 in cellule competenti GC-5.

Prima del clonaggio è stata effettuata la propagazione del vettore in cellule competenti, le GC-5, ottenute con trattamento con CaCl₂ e stoccate a -80°C. Prima del loro utilizzo sono state scongelate per circa 30' in ghiaccio.

Circa 20 ng di plasmide p7 sono stati usati per trasformare 50 µl di cellule. La trasformazione è avvenuta tramite shock termico, quindi le cellule sono state lasciate 30 minuti in ghiaccio, 45 secondi a 42°C (nel bagnetto termostato) e in incubazione per altri 2 minuti in ghiaccio. Sono stati poi aggiunti 800 µl di S.O.C Medium (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) per la ripresa delle cellule, lasciate poi ad incubare per circa 1 ora a 37°C in agitazione a 400-500 rpm nell'incubatore *Shel Lab*. Successivamente le cellule sono state piastrate su terreno solido contenente LB+Ampicillina e lasciate in incubatore overnight.

Il giorno seguente è stato preparato un pre-inoculo stemperando una colonia in 5 ml di terreno e lasciando in incubatore *overday* (circa 8 ore). Dopodiché per l'inoculo sono stati prelevati 5 ml di cellule in 50 ml di terreno. Le cellule sono state lasciate in incubatore a 37°C *overnight*.

2.3 Purificazione del plasmide

Le cellule lasciate crescere *overnight* sono state centrifugate per 20 minuti a 4°C a 4000g. Il plasmide poi è stato purificato utilizzando **QIAGEN Plasmid Midi kit** ed eluito in un volume di 30 µl, ottenendo una concentrazione di 225 ng/µl.

2.4 Analisi della sequenza

La sequenza codificante per eIF4E è stata ottenuta dal vettore plasmidico pHA-eIF4E (*Addgene*) e amplificata con la tecnica PCR (reazione a catena della polimerasi).

Tenendo conto della sequenza nucleotidica, quindi, sono stati disegnati i *primer forward* e *reverse* in modo che, oltre ad amplificare il gene, avessero anche basi complementari alla sequenza LIC del vettore pMCSG7 per permettere il successivo step di clonaggio.

Sequenza nucleotidica eIF4E (651 nt) :
ATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCCGACTACAGA
AGAGGAGAAAACGGAATCTAATCAGGAGGTTGCTAACCCAGAACACTATATT
AAACATCCCCTACAGAACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTTAAAAATGATAAAAG

CAAAACTTGGCAAGCAAACCTGCGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAG
ACTTTTGGGCTCTGTACAACCATATCCAGTTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCT
GTGACTACTCACTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAGAAA
AACAAACGGGGAGGACGATGGCTAATTACATTGAACAAACAGCAGAGACGAA
GTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAGACACTTCTGTGCCTTATTGGAGAATCTT
TTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCTGTTGTTAATGTTAGAGCTAAA
GGTGATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAACAGAGAAGCTGTTA
CACATATAGGGAGGGTATACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCAAAGATAGT
GATTGGTTATCAGTCCCACGCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCACTA
AAAATAGGTTTGTGTTTAA.

Primer forward (F): sequenza complementare a quella LIC del vettore (in rosso), codone di inizio della traduzione (sottolineato) e sequenza del gene

5'-**TACTTCCAATCCAATGCC**ATGCGACTGTCTCGAACCG- 3'

Primer reverse (R): sequenza complementare a quella LIC del vettore (in rosso), codone di stop della traduzione (sottolineato) e sequenza del gene:

5'- **TTATCCACTTCCAATG**TTAAACAACAAACCTATTTTTAG- 3'

Per l'amplificazione il plasmide è stato diluito 1:400 partendo da una concentrazione iniziale di 454 ng/μl. Il protocollo utilizzato è *Green Taq* e la mix di reazione la seguente:

pHA-eIF4E	2 μ l (circa 2 ng)
F	1 μ l
R	1 μ l
Ready mix 2x Green Taq	12,5 μ l
H ₂ O	8,5 μ l
	<hr/> 25 μ l

Protocollo:

94°C 2'

94°C 30''

55°C 30''

68°C 1'

} 35 cicli

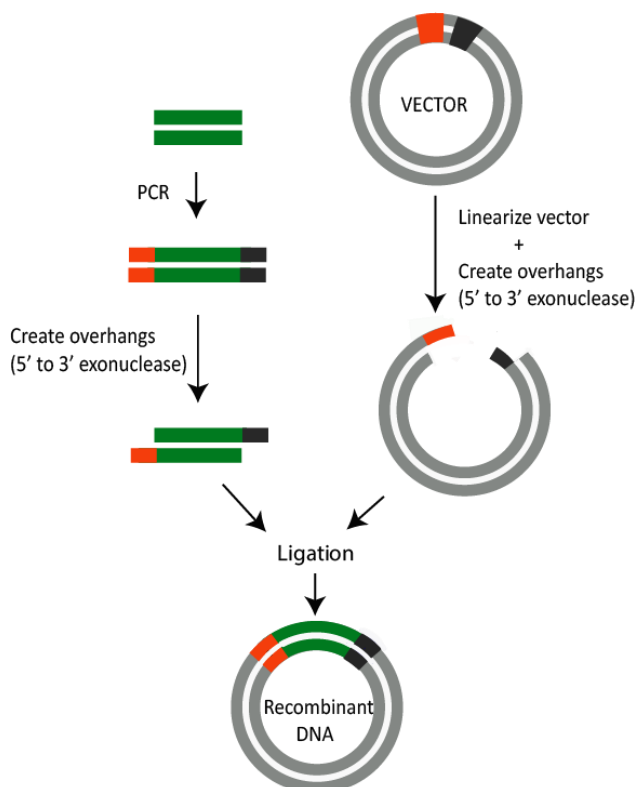
68°C 5'

È stata poi effettuata elettroforesi su gel di agarosio per valutare l'efficienza dei *primer* e dell'amplificazione.

2.5 Ligation Independent Cloning (LIC)

È una tecnica che prevede l'inserimento della sequenza di interesse all'interno del vettore senza l'intervento di enzimi. Utilizza l'attività esonucleasica 3' → 5' della DNA polimerasi T4 per creare sporgenze con complementarità tra il vettore e l'inserto. È un processo molto efficiente in quanto permette di ottenere solo i prodotti desiderati. Il protocollo consiste principalmente di due fasi:

1. preparazione del vettore e dell'inserto;
2. *annealing* tra vettore e inserto.



**Figura 8. Schema
semplificato della LIC**

2.5.1 Trattamento del vettore e dell'inserto

Il vettore viene preparato usando un enzima di restrizione che permette di linearizzarlo ottenendo estremità accessibili per l'attività da parte della T4 polimerasi. L'enzima di restrizione usato è SspI, 20 U/ μ l (*Neb*), insieme al Buffer Cutsmart 10X (*Neb*). Quindi, nella provetta di reazione sono stati aggiunti 1 μ l di SspI, 3 μ l di Buffer Cutsmart 10X, 20 μ l di p7 (circa 5 μ g) e 6 μ l di H₂O per un volume finale di 30 μ l. La reazione è avvenuta a 37°C per 3 ore seguita dall'inattivazione dell'enzima a 65°C per 20 minuti.

Per quanto riguarda l'inserto, invece, questo è stato amplificato utilizzando i *primer* illustrati nel paragrafo 2.5 e la seguente mix di reazione:

DNA eIF4E (circa 1 ng/ μ l)	2 μ l
Buffer 10X	2,5 μ l
MgSO ₄ (25 mM)	1,5 μ l
dNTP (2 mM)	1,5 μ l
F 10 μ M	1 μ l
R 10 μ M	1 μ l
KOD 1 U/ μ l	0,5 μ l
H ₂ O	14 μ l

25 μ l

La PCR è stata eseguita su tre aliquote per aumentare la sensibilità del risultato utilizzando il seguente protocollo:

95°C 2'
95°C 25''
55°C 20''
70°C 1'30''

} 45 cicli

Per verificare se la linearizzazione del vettore fosse avvenuta e l'inserto fosse stato amplificato, è stata eseguita elettroforesi su gel di agarosio. Vettore e inserto poi sono stati estratti utilizzando il kit *Nucleospin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel) ed eluiti in 20 μ l di H₂O. Infine, utilizzando lo spettrofotometro *NanoDrop*, è stata misurata concentrazione di pMCSG7 (157 ng/ μ l) e di eIF4E (290 ng/ μ l).

2.5.2 LIC Annealing

In questa fase, vettore e inserto vengono messi insieme per fare in modo che si leghino; prima di procedere, però, entrambi vengono trattati separatamente con la T4 polimerasi (*Neb*) e dNTPs (deossinucleosidi trifosfato). In particolare, sfruttando l'attività esonucleasica 3' → 5' dell'enzima, al vettore viene aggiunto dGTP in modo che la polimerasi digerisca i nucleotidi all'interno della sequenza fino ad incontrare la base guanina (G), mentre all'inserto viene aggiunto dCTP. Questo porta ad avere estremità coesive in entrambi gli elementi, che faciliterà l'inserimento dell'inserto nel vettore nella successiva fase di annealing. Le mix di reazioni preparate sono le seguenti:

	Mix per inserto (diluito 1:2, 145 ng/μl) (x3)	Mix per vettore (x3)
Buffer 10X	3 μl	3 μl
BSA 1 mg/ml *	3 μl	3 μl
dCTP 10 mg/ml *	7,5 μl	/
dGTP 10 mg/ml *	/	7,5 μl
T4 0,3 U/μl	1 μl	1 μl
H₂O	12,5 μl	12,5 μl

*diluiti dalle soluzioni madri

Nelle provette da PCR è stato aggiunto 1 μ l di DNA (inserto/vettore) e 9 μ l della mix, incubati a 22°C per 60 minuti e poi a 75°C per bloccare la reazione.

Successivamente vettore e inserto sono stati uniti, nella fase di annealing: sono stati prelevati 2 μ l di vettore e 4 μ l di inserto e incubati a 22°C per 60 minuti.

Infine, sono stati aggiunti 2 μ l di EDTA 25 mM per interrompere la reazione, in incubazione per 5 minuti a 22°C.

2.6 Trasformazione in cellule competenti GC-5

Per la trasformazione sono stati utilizzati 50 μ l di cellule GC-5 e 2 μ l del plasmide ricombinante ottenuto tramite la LIC. È stata effettuata trasformazione fisica *heat-shock*: le cellule sono state incubate per 45 secondi a 42°C tramite l'ausilio di un bagnetto termostato e subito rimesse in ghiaccio per due minuti. Successivamente sono stati aggiunti 800 μ l di SOC. Le cellule sono state poi incubate per 60 min a 37°C in incubatore *Shel Lab* in agitazione a 500 rpm. Successivamente sono state piastrate su terreno solido contenente LB+Ampicillina e lasciate in incubatore a 37°C overnight.

2.7 Colony PCR

Una volta ottenute le colonie, è stata eseguita la *Colony PCR*, un metodo conveniente ad alto rendimento per determinare la presenza o l'assenza di DNA inserito nei costrutti plasmidici. I *primer* sono gli stessi utilizzati per il DNA dell'inserito per determinare, quindi, se il costrutto contiene il frammento di DNA di interesse. Sono state prelevate tre colonie dalla piastra e messe in una *filter plate* insieme ad 1 ml di LB+Ampicillina, lasciandole in agitazione su *shaker plate* per 10 minuti. Poi sono state incubate per un'ora e 30 minuti in *Shel Lab (Sheldon Manufacturing.Inc)* a 600 rpm. Una parte è stata piastrata per avere una piastra di mantenimento in attesa del risultato della PCR, mentre il resto è stato bollito a 100°C per 10 minuti utilizzando il termociclatore e sono stati prelevati 2 µl di ogni campione, usati come *template* per la PCR, e aggiunti a 23 µl della mix di reazione contenente: *primer F* 1 µl, *primer reverse* 1 µl, *Ready mix 2x Green Taq* 12,5 µl, H₂O a volume. I risultati sono stati poi determinati tramite elettroforesi accanto ad uno standard di dimensioni del DNA su un gel di agarosio. Le colonie positive poi sono state prelevate dalla piastra e messe a crescere in 10 ml di terreno LB+Ampicillina, in seguito centrifugate, ed il DNA plasmidico ricombinante (pMCSG7+eIF4E) è stato estratto utilizzando il kit *QIAprep Spin Miniprep Kit*.

2.8 Trasformazione di pMCSG7+eIF4E in ceppi di espressione di E. coli

Ottenuti i plasmidi ricombinanti dopo la purificazione, questi vengono utilizzati per la trasformazione di cellule deputate all'espressione del costrutto. Per la produzione di eIF4E, in particolare, sono stati utilizzati due diversi ceppi di *E. coli*, *Rosetta* e *BL21*, principalmente per comprendere quale ceppo fosse il più adatto per l'espressione della proteina, per migliorarne la resa.

Il ceppo BL21(DE3) pLysS (Novagen) di *E. coli* presenta il gene della T7 polimerasi il quale è controllato dall'induzione da parte dell'IPTG, analogo dell'allolattosio, che lega il promotore lacUV5. A causa dell'attività estremamente elevata della T7 RNA polimerasi si ha generalmente un livello di espressione basale del gene di interesse in cellule non indotte. Questo crea problemi nei casi in cui il prodotto del gene sia tossico per le cellule batteriche. Queste, infatti, spesso non sono in grado di esprimere alti livelli del gene e di conseguenza della proteina sotto induzione di IPTG.

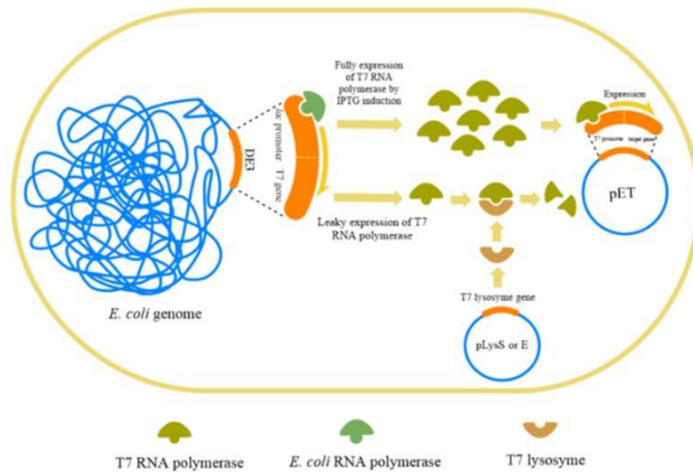


Figura 9. Cellule BL21(DE3)pLysS di *E. coli*.

Il ceppo *Rosetta (DE3) pLysS (Novagen)* è adatto per l'espressione per via ricombinante di proteine eucariotiche, perché generalmente le proteine eucariotiche contengono codoni diversi rispetto a quelli utilizzati in sistemi procariotici (*codon usage*).

La trasformazione in questi ceppi segue lo stesso protocollo descritto nel paragrafo 2.7, utilizzando quindi 50 μl di cellule e 2 μl di DNA ricombinante (circa 15 $\text{ng}/\mu\text{l}$). Le cellule sono state quindi piastrate su piastra a settori LB+Ampicillina e lasciate in incubazione *overnight* a 37°C.

2.9 Prova di espressione di eIF4E in piccola scala

Le cellule vengono indotte utilizzando l'isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG), un analogo dell'allolattosio non idrolizzabile, usato per indurre l'espressione dei geni sotto il controllo dell'operone *Lac*. Come descritto nel paragrafo precedente, i ceppi utilizzati presentano al loro interno due vettori: il pET che contiene il gene della RNA polimerasi di T7 che attiverà la trascrizione della sequenza di interesse, e il pLysS che contiene il gene del lisozima T7 in grado di reprimere l'espressione e di conseguenza l'attività della polimerasi. Il pLysS riveste un ruolo molto importante in quanto blocca i livelli basali di trascrizione quando le cellule non vengono indotte, evitando così una over-espressione e un'over-produzione che porterebbero ad una formazione troppo rapida di proteine che potrebbero risultare tossiche per la cellula.

Dalla piastra sono state prelevate due colonie (BL21 + pMCSG7 + eIF4E e Rosetta + pMCSG7 + eIF4E). Queste poi sono state incubate ognuna in 10 ml di terreno a 37°C a 500 rpm. Dopo tre ore sono stati misurati i valori di densità ottica (O.D.) a 600nm, che per procedere con l'induzione devono essere normalmente tra 0.5-0.6. Questi valori indicano una densità cellulare tale da permettere la produzione di una quantità adeguata di proteina. Per identificare le condizioni ideali di crescita sono stati testati vari parametri di temperatura e

concentrazioni di IPTG. Inoltre, è stato prelevato 1 ml di cellule utilizzato come controllo, prima dell'induzione, centrifugando a 5000 g per 10 minuti. Il pellet poi è stato risospeso in SB2X secondo la formula $1\text{OD}:500\mu\text{l}=\text{OD}_{(\text{misurato})}:\text{X}$.

Una volta raggiunti i valori di O.D. necessari, 1 ml di cellule è stato messo in una *plate* per una prova di induzione in doppio aggiungendo 0,5 mM e 1 mM di IPTG e lasciate in incubazione a 37°C a 500 rpm (*Shel Lab*) per 3 ore trascorse le quali è stata effettuata una nuova misurazione della O.D. a 600 nm.

In seguito sono state prelevate e centrifugate e il pellet risospeso con SB2X.

Nel frattempo, i pre-inoculi sono stati mantenuti a 4°C e poi incubati per 15 minuti a 37°C per la ripresa. Dopodiché è stato prelevato 1 ml e messo in una *plate* per l'induzione con 0,5 mM e 1mM di IPTG a 20°C overnight a 500 rpm.

Il giorno seguente, le cellule sono state prelevate e centrifugate e il pellet risospeso in SB2X. Le prove di induzione effettuate sono state infine analizzate mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis). Le restanti cellule nella *plate* sono state centrifugate a 5000 g per 10 minuti e i pellet sono stati mantenuti a -80°C.

2.10 Test di solubilità

I pellet sono stati scongelati e risospesi aggiungendo ad ogni pozzetto 600 μ l di *Lysis Buffer* contenente: 50 mM Hepes pH 7.8, 150 mM NaCl, 0,5 mg/ml lisozima, 1,6 μ l benzonasi (dil 1/10), 1 mM MgCl₂. Successivamente è stata effettuata la sonicazione: ago piccolo, Amp 30%, programma 7, due cicli, permettendo così la rottura delle cellule. Il lisato è stato poi centrifugato separando il pellet dal surnatante. Su entrambi è stata effettuata elettroforesi su gel SDS-PAGE.

2.11 Produzione di eIF4E su larga scala

Dalla piastra a settori sono state prelevate due colonie BL21 + pMCSG7 + eIF4E e stemperate ognuna in 10 ml di terreno LB+Ampicillina+Cloramfenicolo e incubate a 37°C *overnight*. Il giorno seguente, una volta misurati i valori di O.D., i 10 ml sono stati inoculati ciascuno in 500 ml di LB+Amp+Clo e le cellule lasciate crescere per 2 ore e 30 minuti fino a raggiungere un O.D. di 0.4. Dopodiché sono state indotte con 1 mM di IPTG a 20°C *overnight*. Il giorno seguente sono state centrifugate a 5000g per 30' a 4°C e il pellet (circa 1,7 g) mantenuto a -80°C.

2.12 Purificazione mediante cromatografia di affinità

La tecnica utilizzata è la IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) e la resina è la Ni-NTA (*G-Biosciences*). Questa è composta da agarosio al 6%, reticolato e derivatizzato con acido Nitrilotriacetico (NTA). L'NTA è caricato con ioni Nickel bivalenti (Ni^{2+}) che permettono di legare selettivamente e con elevata affinità ($> 50 \text{ mg/ml}$) la coda di istidine unita all'estremità N-terminale della proteina. Per la prova di purificazione il pellet (paragrafo 2.12) è stato scongelato e trattato con 12,5 ml di buffer di lisi contenente: 25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl, benzoni 4U/ml (16 μl in 100 ml, dil 1/10), 1mM MgCl_2 , 0,5 mM PMSF (fenilmetilsolfonil fluoruro), 0,5 mM TCEP (tris(2-carbossietil)fosfina) e TRITON X-100 0,5%. Una volta aggiunto il buffer, il campione è stato tenuto in agitazione per 10 minuti a 4°C e poi sonicato. Dopodiché è stato centrifugato a 12000 g per 30 minuti a 4°C. Il surnatante (lisato chiarificato) è stato utilizzato per la prova con la resina Ni-NTA, mentre il pellet è stato mantenuto a -80°C. Per la purificazione sono stati utilizzati 500 μl di resina (1 ml *slurry*) e centrifugati a 800 g per 1 minuto lasciando sedimentare. L'etanolo è stato rimosso e successivamente la resina è stata lavata con 10 volumi di colonna di H_2O ed equilibrata con 5 ml di *buffer* contenente 25 mM Hepes pH 7.8 e 300 mM NaCl centrifugando a 800 g per 1 minuto, operazione eseguita due volte. Il lisato chiarificato è stato poi aggiunto

alla resina per favorire il *binding* e lasciato un'ora a 4°C in rotazione. Trascorso il tempo, lisato e resina sono stati trasferiti su una colonna ed è stato raccolto il *flow-through*. Dopodiché sono stati effettuati lavaggi con il *buffer* descritto sopra e sono state raccolte 13 frazioni da 2 ml, per allontanare eventuali aspecifici. Infine, l'eluizione è stata fatta utilizzando 25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazolo e sono state raccolte 10 frazioni da 500 µl. L'imidazolo compete con le istidine nel legame con il Nichel, permettendo il distacco della proteina dalla resina. La presenza della proteina nelle frazioni raccolte è stata evidenziata effettuando delle letture allo spettrofotometro a 280 nm e confermata tramite SDS-PAGE.

2.13 Estrazione da corpi di inclusione

Due pellet da 2 grammi ciascuno ottenuti in seguito a crescita ed induzione su larga scala sono stati risospesi con *buffer* di lisi contenente: 20 mM Hepes pH 7.8, 300 mM KCl, 1mM EDTA, 2 mM DTT, 10% glicerolo, cocktail di proteasi 1X. Considerando che il volume di *Lysis Buffer* viene aggiunto in base alla quantità di pellet (10 ml per grammo), i pellet sono stati risospesi ciascuno con 20 ml di buffer. Successivamente sono stati sonicati e centrifugati a 12000 g per 30 minuti a 4°C. I pellet poi sono stati risospesi e lavati in 20 ml di *Wash*

Buffer contenente 20 mM Hepes pH 7.8, 1 M guanidina, 10% glicerolo, 2 mM DTT, e poi centrifugati in ultracentrifuga a 30000 g (19000 rpm) per 30 minuti a 4°C. Lo *step* è stato ripetuto altre due volte. Infine, i pellet sono stati risospesi in 10 ml di 20 mM Hepes pH 7.8, 6 M guanidina, 10% glicerolo, 2 mM DTT e centrifugati a 43000 g (22800 rpm) per 30 minuti a 4°C. Il surnatante, contenente le proteine solubilizzate, è stato poi prelevato per il successivo *step* di dialisi.

2.14 Dialisi - Refolding

La dialisi è la tecnica scelta per la rimozione dell'agente solubilizzante la cui concentrazione diminuisce lentamente permettendo alla proteina di ripiegarsi in modo ottimale. Il surnatante ottenuto dopo lo *step* di estrazione da corpi di inclusione e contenente le proteine solubilizzate è stato diluito 10 volte per avere una concentrazione proteica tale da consentire il corretto refolding.

Quindi, i 10 ml di campione sono stati aggiunti a 90 ml di *buffer* contenente 20 mM Hepes pH 7.8, 300 mM KCl, 2 mM DTT. Per la dialisi è stato usato un tubo a membrana (*Spectra/Por*TM) da 3,5 kDa cutoff (6,4 ml/cm) e il tampone utilizzato costituito da 20 mM Hepes pH 7.8, 300 mM KCl. Il campione è stato mantenuto in dialisi a 4°C overnight.

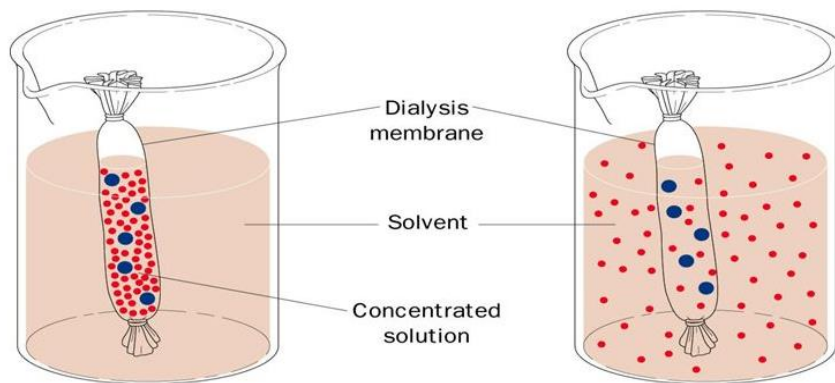


Figura 10. Dialisi

2.15 Concentrazione della proteina

La proteina è stata concentrata utilizzando il concentratore *Centricon* (*Millipore*[®]) da 10 kDa cutoff (15 ml). Quindi sono stati centrifugati 15 ml di campione alla volta a 2500 g per 15' a 4°C, fino ad arrivare ad un volume finale di circa 9 ml. Dopodiché sono stati prelevati 5 µl ed è stata effettuata una misura della concentrazione con il *metodo di Bradford* (*Bradford Reagent, Sigma-Aldrich*).

2.16 Cromatografia di esclusione molecolare

La cromatografia è stata eseguita utilizzando colonne *HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-200 HR* con un *range* di separazione di 5000-250000 Da e un *flow rate* di 0,5 ml/min. Innanzitutto è stata fatta una gel-filtrazione preparativa con due volumi di colonna (CV) di H₂O (A) e due di *Equilibration Buffer* (B) contenente 20 mM Hepes pH 7.8, 300 mM KCl. Dopodiché il campione concentrato è stato caricato con *superloop*, dopo aver equilibrato con 0,05 CV di (B). L'eluizione poi è stata fatta con 1,5 CV raccogliendo frazioni da 2 ml. Il picco corrispondente a eIF4E poi è stato visualizzato sul cromatogramma.

2.17 Elettroforesi

- Elettroforesi bidimensionale del DNA: è stato utilizzato un gel di agarosio (1%) preparato sciogliendo a 100°C 0,5 grammi di agarosio in 50 ml di tampone TBE (Tris-Borato-EDTA) (1X). In seguito sono stati aggiunti 3 µl di SYBR SAFE. I campioni sono stati preparati aggiungendo una soluzione di caricamento contenente *BlueJuice™ Gel Loading Buffer*.

- Elettroforesi su gel di proteine: SDS-PAGE. Il tampone di corsa utilizzato è il TGS (1X) (Tris-Glicina-SDS) ed il gel al 12% considerando le dimensioni della proteina (circa 25 kDa). I campioni sono stati preparati aggiungendo il *Sample Buffer 2X* e trattati a 100°C per 10 minuti prima del caricamento su gel.

2.18 Western blot

La tecnica è stata eseguita per identificare eIF4E, utilizzando anticorpi anti-eIF4E e anti-His (anti-istidina). Dopo la corsa elettroforetica su SDS-PAGE, i gel sono stati equilibrati per 20 minuti in tampone di trasferimento e in agitazione. Le membrane utilizzate (*PVDF membrane, Bio-Rad*) sono state equilibrate per qualche secondo in etanolo e poi in acqua per qualche minuto. Dopodiché sono state equilibrate insieme ai gel per 10 minuti in tampone di trasferimento. Successivamente è stato effettuato il trasferimento utilizzando *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad)* metodo Standard SD (1A, 25V) e, una volta terminato, le membrane sono state saturate con TBST (soluzione salina tamponata con tris e Tween) e BSA (albumina sierica bovina) al 3%. Poi sono stati aggiunti gli anticorpi primari anti-eIF4E (diluito 1:5000) e anti-His (diluito 1:6000) lasciando in agitazione a 4°C overnight. Il giorno seguente sono stati effettuati 3 lavaggi, ognuno di 5 minuti, in TBST per rimuovere gli anticorpi non legati. Successivamente sono stati aggiunti gli anticorpi secondari, anti-rabbit (diluito 1:20000) per anti-eIF4E e anti-mouse (diluito 1:10000) per anti-His, lasciando in agitazione a 37°C per un'ora per permettere il legame. Infine, dopo aver effettuato altri lavaggi con TBST, gli anticorpi sono stati rilevati utilizzando due substrati in grado di reagire con la perossidasi legata agli anticorpi secondari, per questo è stato utilizzato il kit *Clarity™ Western*

ECL Substrate (Bio-Rad). Sono stati aggiunti 500 μ l di entrambe le soluzioni e lasciati ad incubare al buio per 5 minuti per permettere la reazione chemioluminescente. I risultati e le immagini sono stati poi visualizzati attraverso il ChemiDoc (*Bio-Rad*).

2.19 *m*⁷GTP pull down assay

Il 7-metil-GTP sefarosio è una resina di affinità che presenta un estere p-amminofenilico della 7-metilguanosina-5'-trifosfato come ligando per la purificazione della proteina eIF4E legante il cap dell'mRNA. La prova di purificazione è stata eseguita per ulteriore conferma della produzione del fattore di traduzione. Sono stati utilizzati 30 μ l di *beads* ed equilibrati con 3 x 500 μ l di *Wash Buffer* (50 mM HEPES pH 7.8, 150 mM KCl). Successivamente le *beads* sono state saturate con 0,1 mg/ml BSA (*BSA Promega 10 mg/ml*) in *Wash Buffer* a 4°C e in rotazione per un'ora. Dopodiché è stato effettuato un lavaggio con 500 μ l di *Wash Buffer* e alle *beads* saturate sono stati aggiunti 50 μ l di eIF4E e GTP 0,1 mM e lasciate in incubazione per un'ora e 30 minuti a 4°C in rotazione. Dopo centrifugazione a 1000 g per un minuto, è stato recuperato il surnatante. Sono stati poi aggiunti 3 x 500 μ l di *Wash Buffer* e sono state recuperate le 3 frazioni. Infine, l'eluizione è stata fatta con 60 μ l di

m^7 GTP 250 μ M lasciando in rotazione a 4°C per 30 minuti. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato recuperato e i campioni sono stati preparati e caricati su SDS-PAGE.

RISULTATI

Risultati

3.1 Amplificazione della sequenza nucleotidica codificante per eIF4E

Per la costruzione di un vettore di espressione che permettesse la produzione eterologa della proteina ricombinante eIF4E è stato scelto il plasmide pMCSG7 e la tecnica di clonaggio LIC. La sequenza nucleotidica codificante per il fattore eIF4E è stata amplificata a partire dal plasmide pHA-eIF4E (*Addgene*), mediante PCR utilizzando i *primer* illustrati nel paragrafo 2.5. Il prodotto di amplificazione è stato caricato su gel di agarosio per verificarne la dimensione. Come mostrato nella figura 11, la reazione di amplificazione è risultata efficiente e la sequenza amplificata presenta le dimensioni attese (651nt).

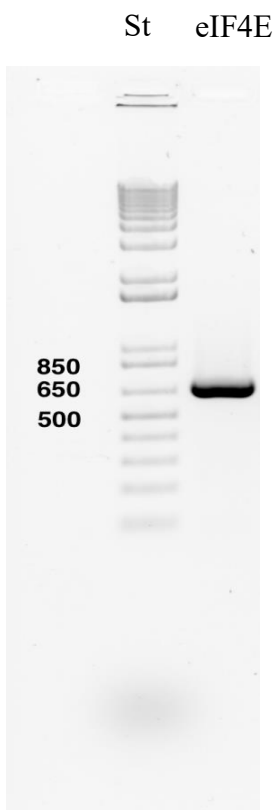


Figura 11. Gel 1% agarosio per test dei *primer*. Sono stati caricati 5 μ l di standard (*1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen*)

3.2 Digestione pMCSG7 e amplificazione inserto

La digestione del vettore e l'amplificazione dell'inserto sono stati effettuati come descritto nel paragrafo 2.6.1, per permettere il corretto inserimento della sequenza nucleotidica codificante per eIF4E all'interno del vettore pMCSG7. I risultati sono stati analizzati su gel di agarosio e mostrati nella figura 12.

St P7 P7 A1 A2 A3

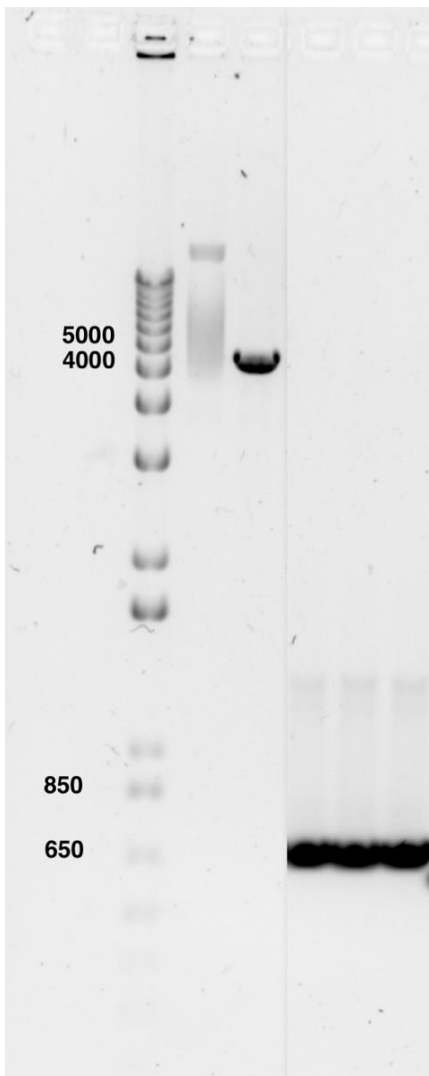


Figura 12. Digestione del vettore e amplificazione inserto.

Sono stati caricati su gel di agarosio 1% 5 μ l di standard, 20 μ l dell'amplificato + 5 μ l di Loading Buffer Juice Blue 5X per ogni campione, 1 μ l del vettore tale e quale e 1 μ l del vettore linearizzato aggiungendo al campione 4 μ l di H₂O e 5 μ l di LB 2X. **St** = standard di peso molecolare; **P7** = pMCSG7; **ND** = non digerito; **D** = digerito; **A1,A2,A3** = amplificati.

Per verificare la linearizzazione del plasmide pMCSG7, è stato caricato sul gel anche il vettore senza trattamento con l'enzima di restrizione SspI. Quindi, una volta ottenuti i risultati mostrati, vettore e inserto sono stati trattati per la successiva fase di *annealing* (paragrafo 2.5.2).

3.3 Colony PCR

Una volta effettuato il trattamento LIC il prodotto della reazione è stato usato per trasformare le cellule competenti GC-5. Sono stati ottenuti numerosi trasformanti e per verificare, come spiegato nel paragrafo 2.8, la presenza dell'inserto nel costrutto plasmidico pMCSG7, è stata eseguita una *colony PCR* su tre colonie utilizzando gli stessi *primer* usati per l'amplificazione di eIF4E. I risultati sono stati analizzati su gel di agarosio e mostrati nella figura 13

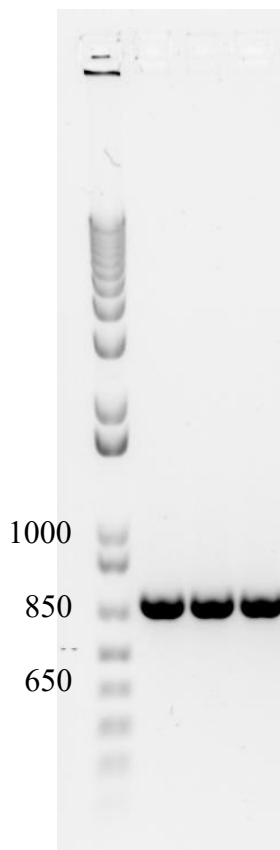


Figura 13. Colony PCR.

Gel di agarosio 1%: 5 μ l standard, 2 μ l campione + 23 μ l mix di reazione.

Visti i risultati della *Colony PCR*, dalla piastra di mantenimento è stato scelto un clone da cui è stato estratto il DNA ricombinante (pMCSG7+eIF4E) ed inviato alla BMR-Genomics per il sequenziamento, per valutare che la sequenza di eIF4E si fosse inserita in maniera corretta all'interno del vettore.

3.4 Prove di induzione in piccola scala

I plasmidi ricombinanti estratti dalle cellule GC-5 sono stati utilizzati per trasformare i ceppi *BL21 (DE3) pLysS* e *Rosetta (DE3) pLysS* di *E. coli* e alcuni dei cloni trasformanti sono stati saggiati per la produzione della proteina

Allo scopo di individuare le condizioni ottimali per la produzione della proteina, le cellule sono state indotte con due diverse concentrazioni di IPTG, 0,5 mM e 1 mM, e a due diverse temperature, 20°C e 37°C, come descritto nei paragrafi 2.9 e 2.10.

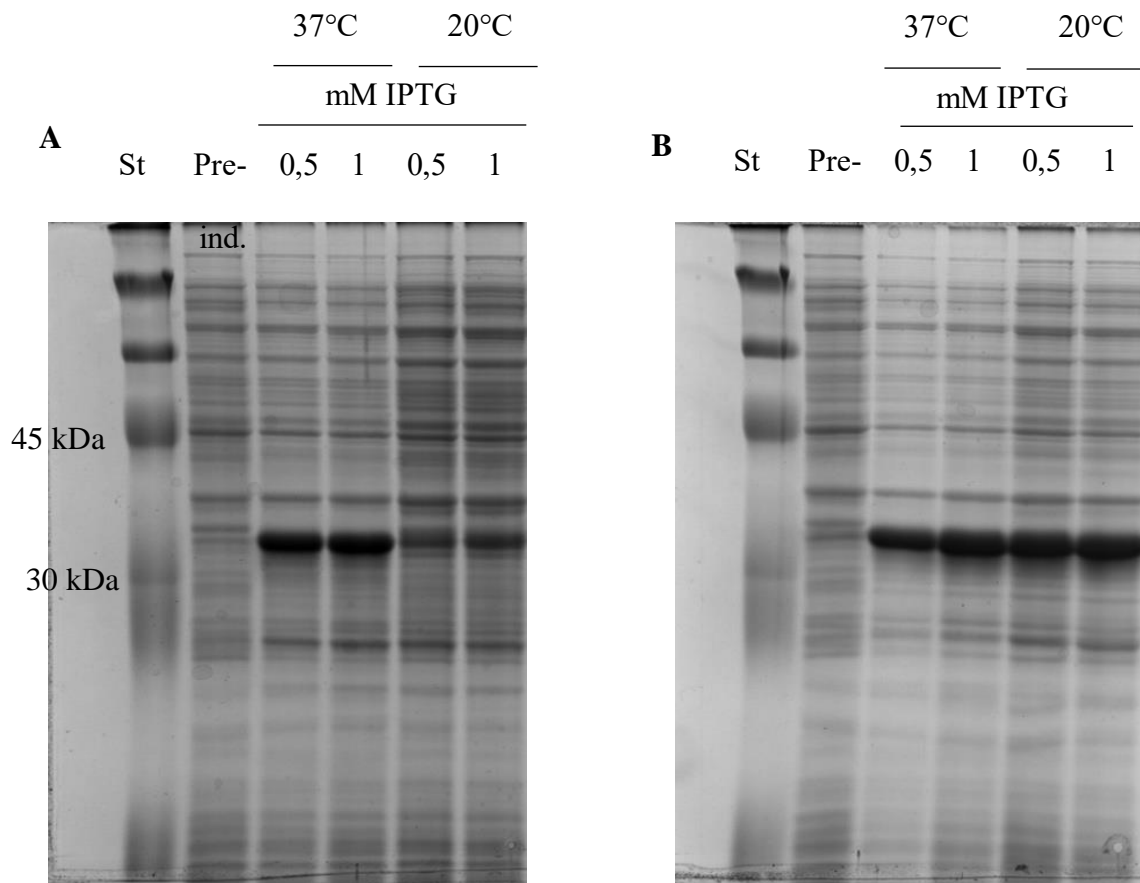


Figura 14. (A) Induzione della produzione di eIF4E nel ceppo Rosetta. Pellet risospeso in 200 μ l SB2X e caricati 5 μ l su gel 12% SDS-PAGE. **(B) Induzione della produzione di eIF4E nel ceppo BL21 (DE3).** Pellet risospeso in 200 μ l SB2X e caricati 5 μ l su gel 12% SDS-PAGE. **St** = standard, marcatore proteico; **Pre-ind.** = pellet pre-induzione.

Come si può notare dalle immagini, la produzione della proteina è risultata più efficiente nelle cellule *BL21 (DE3) pLysS* indotte con una concentrazione di IPTG di 1 mM alla temperatura di 20°C. Di conseguenza, per la produzione su larga scala e le successive prove, si è proseguito con questo ceppo a queste condizioni di induzione.

3.5 Test di solubilità

Sulla base della letteratura è stato visto che, in organismi ospite come *E. coli*, una volta prodotto, eIF4E risultava depositato in corpi di inclusione. Questi sono aggregati proteici presenti negli spazi citoplasmatici e periplasmatici di *E. coli*, composti principalmente dalla proteina eterologa espressa e contengono quantità molto basse di proteina ospite, componenti ribosomiali e frammenti di DNA / RNA. Per poter estrarre e purificare il prodotto è quindi necessario seguire protocolli specifici. Per questi motivi, una volta verificata la produzione della proteina è stato eseguito un test di solubilità (paragrafo 2.11). Quindi, dopo la lisi cellulare, surnatante e pellet sono stati separati e analizzati su SDS-PAGE per verificare in quale dei due fosse presente la proteina alle diverse condizioni di induzione.

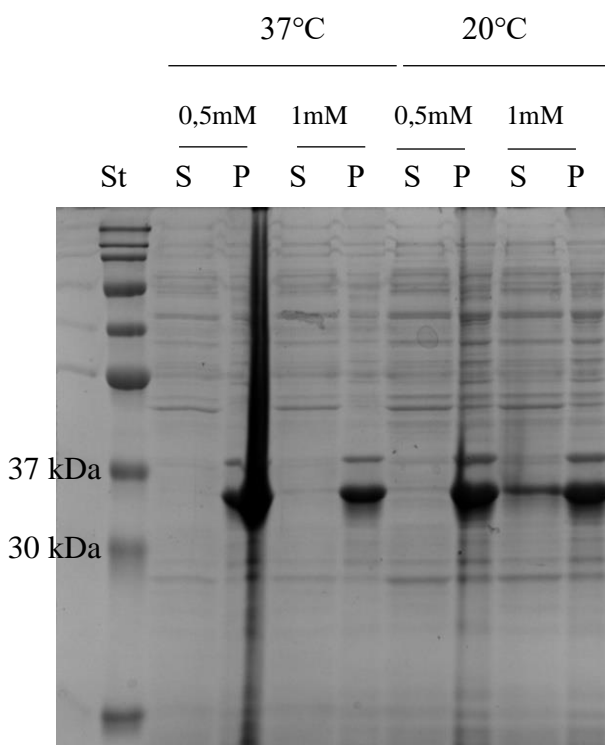


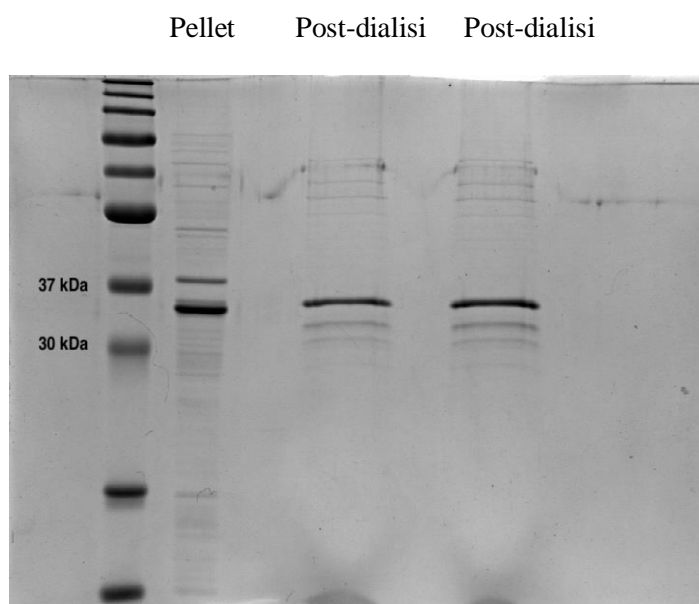
Figura 15. Test di solubilità in BL21 (DE3). Gel 12% SDS-PAGE: i pellet sono stati risospesi in 200 μ l di SB2X di cui sono stati caricati 5 μ l, del surnatante sono stati prelevati 15 μ l a cui sono stati aggiunti 15 μ l di SB2X e caricati su gel. **St** = standard marcatore proteico, *BlueEasy Prestained Protein Marker* (Nippon Genetics); **S** = surnatante; **P** = pellet; **0,5-1 mM** = concentrazioni di IPTG.

Dal risultato del gel si nota una banda nel surnatante ottenuto in seguito ad induzione a 20°C con IPTG 1 mM. Di conseguenza, in seguito alla produzione della proteina su larga scala, descritta nel paragrafo, è stata effettuata una prova di purificazione utilizzando la cromatografia per affinità con la resina Ni-NTA (paragrafo 2.13). I risultati non vengono riportati, in quanto erano presenti molti aspecifici mentre la presenza di eIF4E non è stata riscontrata. Questo dato suggerisce quindi che la proteina viene prodotta principalmente nei corpi di inclusione e che quindi per questo motivo, si è poi deciso di proseguire con l'estrazione della proteina direttamente dai corpi di inclusione, seguendo il protocollo descritto (paragrafo 2.14).

3.7 Estrazione da corpi di inclusione e purificazione mediante cromatografia di esclusione molecolare

Nell'espressione di proteine ricombinanti in *E. coli*, il mancato corretto ripiegamento e la formazione di aggregati insolubili noti come corpi d'inclusione è un fenomeno piuttosto frequente. Infatti, come mostrato precedentemente, la produzione di eIF4E è risultata in questi aggregati proteici all'interno delle cellule. La metodologia utilizzata ha previsto un passaggio di isolamento, rimozione di contaminanti, seguito da solubilizzazione della

proteina per mezzo di soluzioni concentrate di agenti chimici denaturanti. In particolare, è stato utilizzato il cloruro di guanidinio, un agente caotropico che ad alte concentrazioni (6M) è in grado di rompere i legami idrofobici e i legami idrogeno di proteine, portando alla loro denaturazione. Il passaggio di centrifugazione poi ha permesso di separare da eventuali contaminanti la proteina solubilizzata, la quale è stata successivamente rinaturata tramite dialisi. La proteina è stata diluita, per ottenere una concentrazione adeguata per il corretto *refolding*, in una soluzione cui è stato aggiunto DTT (ditiotreitolo), un agente riducente in grado di rompere i legami disolfuro tra residui di cisteina vicini e quindi di impedire la formazione di aggregati o aspecifici. Il campione poi è stato inserito in un tubo a membrana da dialisi avente *cut off* dei pesi molecolari minore rispetto alla proteina, e si è posto il tutto in una soluzione in agitazione avente un volume molto maggiore rispetto al dializzato, una concentrazione di denaturante minore in confronto alla soluzione di proteina e una quantità di sale tale da mantenere la proteina solubile durante tutto il processo. Variando la concentrazione di denaturante (attraverso cambi di tampone) nel tempo è stato possibile eseguire una rinaturazione lenta e controllata. Per valutare la resa del *refolding*, sono state prelevate due aliquote del campione dopo la dialisi e analizzate mediante SDS-PAGE.



**Figura 16. Gel 12% SDS-PAGE
eIF4E post-dialisi.**

Confrontando le bande del campione post-dialisi con il pellet di eIF4E, caricato come controllo, è possibile notare che la proteina è presente ed è stata quindi “estratta” correttamente. Tuttavia, si osservano ulteriori bande relative a contaminanti o aspecifici e per questo, per purificare ulteriormente eIF4E e aumentare il grado di purezza, è stata eseguita la cromatografia di esclusione molecolare o gel filtrazione (paragrafo 2.16).

La tecnica di purificazione ha permesso di eliminare contaminanti aventi pesi molecolari differenti dalla nostra proteina e quindi di ottenere eIF4E con un elevato grado di purezza, come mostrato nella figura 16.

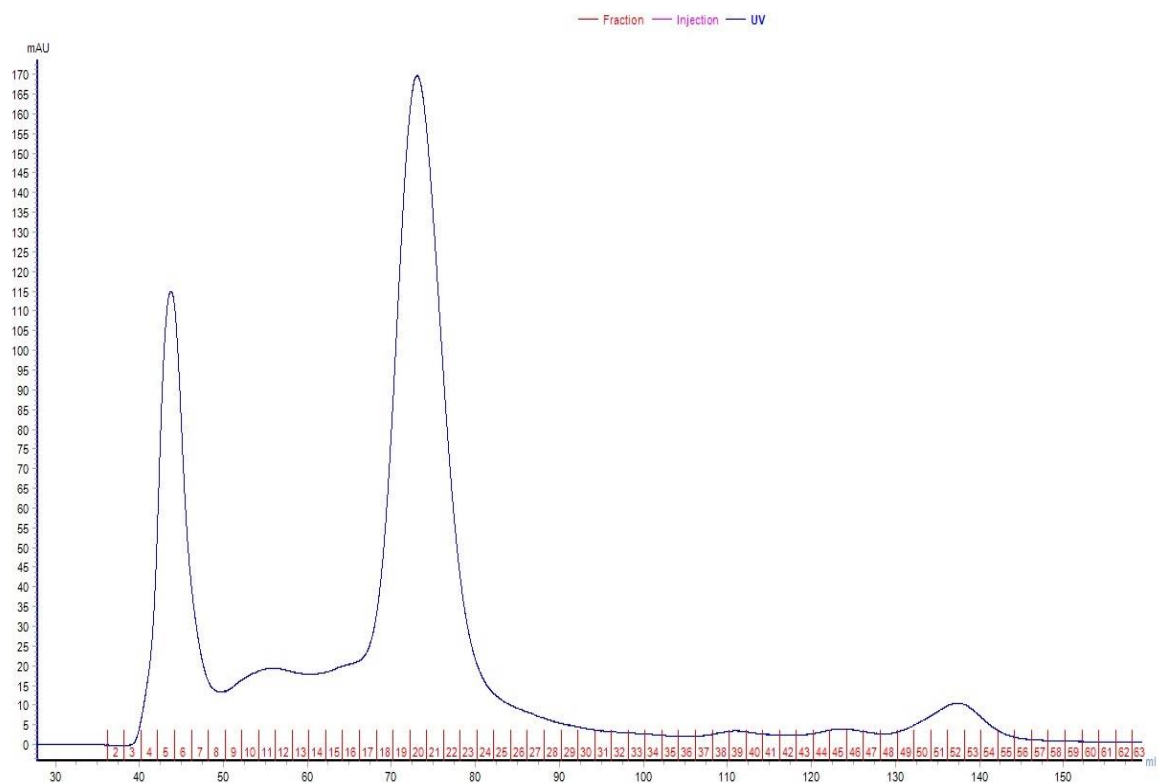


Figura 16. Picco cromatografico eIF4E.

Come si nota dal risultato della cromatografia, il secondo picco del cromatogramma si riferisce alla presenza del fattore di traduzione eIF4E.

Le frazioni corrispondenti al picco (18-23) sono state unite, e il pool poi concentrato fino a 3 ml totali con una concentrazione di proteina pari a 1 mg/ml. Quindi, da un litro di coltura sono stati ottenuti in totale 3 mg di proteina con una purezza del 95%.

3.8 Western blot

Per verificare la presenza di eIF4E, dopo la purificazione, è stato eseguito il *Western blot* (paragrafo 2.18), utilizzando anticorpi anti-eIF4E e anti-His.

St

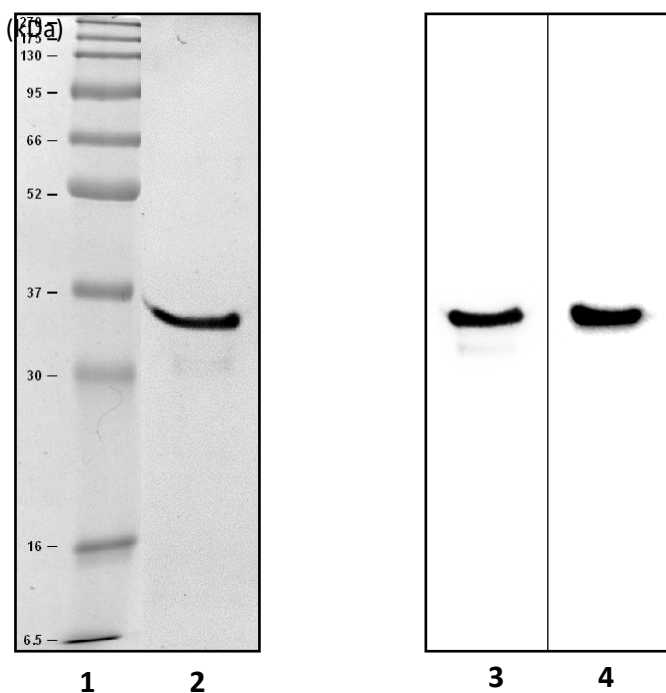


Figura 17. Produzione di eIF4E. 1, standard di peso proteico (St); 2, proteina purificata visualizzata su gel SDS-PAGE 12% colorato con Comassie; 3, immunoblot di N-His-eIF4E purificato con anticorpo anti-eIF4E; 4, immunoblot di N-His-eIF4E purificato con anticorpo anti-istidina.

3.9 m^7GTP pull down assay

È stato eseguito, infine, un saggio che utilizza un analogo del 5' cap dell'mRNA e rappresenta uno strumento utile per identificare i fattori coinvolti nella regolazione dell'inizio della traduzione. La tecnica viene eseguita in condizioni non denaturanti che mantengono le interazioni proteina-proteina e modificazioni post-traduzionali^[12]. In particolare, il saggio è stato effettuato per valutare se la proteinaricombinante eIF4E si fosse rifoldata correttamente e quindi risulta attiva, e in grado di svolgere la sua funzione, ovvero quella di legare 5' cap dell'mRNA. La resina è stata lavata ed equilibrata, come descritto nel paragrafo 2.19, e lasciata in incubazione con eIF4E per permettere il legame. I risultati poi sono stati analizzati mediante SDS-PAGE.

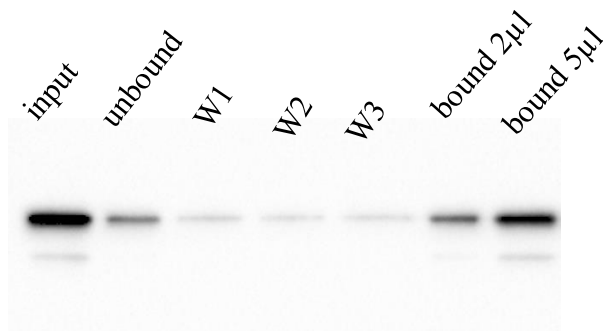


Figura 18. eIF4E purificato e visualizzato su gel SDS-PAGE 12% colorato con Comassie. Input (usato come standard): sono stati prelevati 5 μ l di eIF4E dai 50 μ l di partenza e aggiunti 5 μ l di SB2X; unbound: surnatante recuperato in seguito ad incubazione con resina m^7GTP sefarosio; W1, W2, W3: frazioni recuperate in seguito all'aggiunta del *Wash Buffer*; bound: surnatante recuperato in seguito ad eluizione, sono stati caricati 2 μ l di bound + 3 μ l di H₂O + 5 μ l di SB2X e 5 μ l di bound + 5 μ l di SB2X.

Come si nota dal risultato del gel SDS-PAGE il fattore di traduzione eIF4E è presente nell'eluato e quindi risulta attivo e mostra un'elevata affinità per la resina m⁷GTP, confermando la sua forte associazione con il 5' cap dell'mRNA. Il saggio è utile per studiare anche l'interazione tra eIF4E/ eIF4G/4E-BP e sarà quindi impiegata in esperimenti futuri allo scopo di valutare l'attività del peptide Cy_9B.

DISCUSSIONE

Il fattore di inizio della traduzione eIF4E è stato purificato in seguito a clonaggio, espressione e produzione in cellule BL21 (DE3) pLysS. In base agli studi svolti finora, sono stati valutati diversi protocolli per l'ottenimento della proteina. Una volta verificata la produzione di eIF4E, sono state effettuate varie prove di purificazione, che hanno portato a modificare i protocolli iniziali. In particolare, si è visto che operando alla temperatura di 4°C si riusciva ad avere una maggiore stabilità della proteina, così come, aumentando la concentrazione del sale KCl da 100 mM a 300 mM e quindi la solubilità, si riduceva di molto la formazione di precipitato che non permetteva di continuare con le fasi di purificazione. Inoltre, sono state effettuate varie prove utilizzando la resina Ni-NTA per aumentare la purezza, ma non ci sono stati esiti significativi e diversi rispetto a quelli ottenuti con la cromatografia di esclusione molecolare, e di conseguenza questo tipo di purificazione è risultato essere un passaggio non necessario. Dunque, seguendo i protocolli illustrati è stato possibile ottenere il fattore di traduzione con un'elevata purezza, e in futuro questi saranno utili per produrne una quantità maggiore per effettuare ulteriori studi.

CONCLUSIONI

Il fattore eIF4E ha il ruolo di regolatore della fase di inizio della traduzione eucariotica. In effetti, riconosce e lega la struttura del cap m⁷GTP della maggior parte degli mRNA, promuovendo così anche il reclutamento dei ribosomi. Nelle cellule, eIF4E è regolato tramite fosforilazione e da diverse proteine, indicate nel complesso come 4E-binding proteins (4E-BPs). Insieme alle attività fisiologiche di eIF4E, ulteriori prove dimostrano che questo può avere un ruolo oncogenico in molti tipi di cancro, in cui esiste un'espressione elevata della proteina o della sua forma fosforilata. In effetti, nelle cellule tumorali, eIF4E agisce con molte oncoproteine e proteine mutate per promuovere trasformazione cellulare e metastasi. Per questo, può essere utilizzato come *target* promettente per il trattamento del cancro. In effetti, diversi inibitori molecolari di eIF4E e delle sue vie di segnalazione a monte sono stati progettati per ridurre l'attività di questo fattore di traduzione. Conforme a questi, il *knockdown* del gene EIF4E e l'uso di microRNA, ASO (oligonucleotidi antisenso), farmaci come la ribavirina e altre molecole possono rappresentare valide alternative terapeutiche e aprire una nuova strada per la cura del cancro.

La produzione di eIF4E, oggetto della tesi, è solo la prima delle varie fasi di sperimentazione che permetteranno di analizzare ancora più da vicino questo fattore in modo tale da bloccarne la funzione. Studiando l'affinità di legame tra eIF4E e le 4E-BP, è stato possibile individuare i siti di interazione e disegnare molecole, i peptidomimetici, con un'elevata stabilità biologica e in grado di interagire direttamente con il fattore di traduzione e di superare le limitazioni naturali che si avrebbero utilizzando altri tipi di molecole. L'obiettivo di questi peptidi è quello di inibire la formazione del complesso eIF4E-eIF4G impedendo così l'inizio della traduzione degli mRNA deboli che danno origine a fattori di crescita e sopravvivenza cellulare. I peptidomimetici progettati dal Prof. Di Marino si basano sulla sequenza di una 4E-BP, chiamata CYFIP1 (*cytoplasmic Fragile X interacting protein 1*), la quale interagisce con eIF4E tramite una sequenza poco conservata, non condivisa dalle altre 4E-BP, e rappresentano una valida strategia terapeutica per bloccare la funzione del fattore di traduzione, con la speranza che possano portare a risultati importanti sia in vitro che in vivo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Amaldi F., Benedetti P., Pesole G., Plevani P. “Biologia Molecolare”. CEA, 2014
- [2] Piserà, Arianna et al. “Structure and functions of the translation initiation factor eIF4E and its role in cancer development and treatment.” *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* vol. 45,1 (2018)
- [3] Siddiqui, Nadeem, and Nahum Sonenberg. “Signalling to eIF4E in cancer.” *Biochemical Society transactions* vol. 43,5 (2015)
- [4] Peter, Daniel et al. “Molecular architecture of 4E-BP translational inhibitors bound to eIF4E.” *Molecular cell* vol. 57,6 (2015)
- [5] Graff, Jeremy R et al. “Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy.” *Cancer research* vol. 68,3 (2008)
- [6] Avdulov, Svetlana et al. “Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells.” *Cancer cell* vol. 5,6 (2004)

- [7] Jia, Yan et al. “Cap-dependent translation initiation factor eIF4E: an emerging anticancer drug target.” *Medicinal research reviews* vol. 32,4 (2012)
- [8] Avdulov, Svetlana et al. “Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells.” *Cancer cell* vol. 5,6 (2004)
- [9] Gkogkas, Christos G et al. “Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control.” *Nature* vol. 493,7432 (2013)
- [10] Papadopoulos, Evangelos et al. “Structure of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in complex with 4EGI-1 reveals an allosteric mechanism for dissociating eIF4G.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,31 (2014)
- [11] Di Marino, Daniele et al. “A unique binding mode of the eukaryotic translation initiation factor 4E for guiding the design of novel peptide inhibitors.” *Protein science: a publication of the Protein Society* vol. 24,9 (2015)

[12] Timpano, Sara et al. "Analysis of Cap-binding Proteins in Human Cells Exposed to Physiological Oxygen Conditions." *Journal of visualized experiments: JoVE* ,118 55112. 28 Dec. 2016

[13] Zuberek, Joanna et al. "Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs." *RNA (New York, N.Y.)* vol. 13,5 (2007)

[14] Modrak-Wojcik, Anna et al. "Eukaryotic translation initiation is controlled by cooperativity effects within ternary complexes of 4E-BP1, eIF4E, and the mRNA 5' cap." *FEBS letters* vol. 587,24 (2013)

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto il Prof. Daniele Di Marino per la possibilità che mi ha dato di far parte di questo progetto e di uno dei gruppi di ricerca migliori.

Ringrazio la Prof.ssa Anna La Teana, la quale mi ha accompagnato durante tutto il mio percorso di studi e con la quale sono felice di raggiungere anche questo traguardo. Senza di lei, probabilmente, non avrei avuto le idee così chiare nel proseguire gli studi ad Ancona. Ricordo il giorno in cui discussi la tesi al termine della triennale: mi chiese se ci saremmo viste di nuovo e se avrei seguito il corso di laurea magistrale lì. Ad oggi, credo sia stata la scelta migliore.

Ringrazio la dott.ssa Alice Romagnoli, per la pazienza avuta nell'insegnarmi e nel seguirmi non solo in laboratorio, ma anche e soprattutto sul lato umano e psicologico, perché ha fatto sì che il laboratorio diventasse il mio posto felice e mi ha spinto a credere di più in me stessa: “vai, Veroni!”.

Ringrazio il Prof. Paolo Mariani per avermi dato l'opportunità di svolgere un tirocinio presso la Columbia University di New York, che ha cambiato la mia vita, e per la sua umanità.

Ringrazio Mattia, Chiara, Sara per aver condiviso con me i momenti no e quelli in cui pensavo di dovermi dedicare all'ippica e cambiare mestiere. Grazie perché mi avete sempre sostenuto.

Ringrazio Alessandra, che ormai è parte di me. Dovrei scrivere una lista di motivi per cui ringraziarti ma non avrebbe fine. Soltanto: sei la mia persona.

Ringrazio le mie coinquiline non più coinquiline. Grazie per essermi state sempre accanto. Valeria, Alessandra e Alessandra: siete e sarete sempre la mia seconda famiglia, non importa dove saremo.

Ringrazio tutti i miei amici in giro per l'Italia e per il mondo e i miei compagni di corso, solo voi capite bene cos'è l'ansia, e grazie per averla condivisa con me.

Ringrazio Nicolò, che non sa di darmi così tanta forza. Grazie dell'amore e della pazienza. Niente è facile e lo sappiamo bene, ma grazie perché sei al mio fianco, perché insieme riusciamo ad annullare tutte le distanze.

Per ultima ma non meno importante, ringrazio la mia famiglia. Mamma, papà, prima o poi tutte le ansie e le preoccupazioni che vi ho gentilmente donato dovevano essere ripagate! Soldi non ne ho quindi spero che la mia tesi possa bastarvi! Scherzi a parte, grazie. Avete sempre creduto in me e ci siete sempre

stati. Le parole non potranno mai bastare né esprimere quello che provo per voi. Sono fiera della persona che sono ed è solo grazie a voi. Ci siete stati quando ero indecisa sul mio futuro, ci siete stati quando stavo per crollare. E ci siete anche ora. Non so che strada sceglierò ma ci saremo sempre. E, sì, mamma continuerò a studiare per te e supereremo ogni cosa.

Ringrazio mia sorella, che è sempre stata la mia seconda mamma e la mia migliore amica e mi ha donato una delle gioie più belle, Serena, che vuole essere come me. È un buon inizio, ma le auguro di essere migliore.

Ringrazio mio fratello, che ha questa capacità di capire quello che penso anche se non parlo e viviamo a più di mille chilometri di distanza. Sei la mia vita. Ho tanto da dirti ma penso che questo racchiuda bene i miei sentimenti per te.

Grazie a tutti. Sono stati due anni incredibili, i più belli di sempre, nonostante ora ci sia una pandemia. E voglio che rimanga scritto, perché questi momenti non li dimenticheremo mai.