

INDICE

Introduzione.....	2
Scopo del lavoro.....	14
Materiali e metodi.....	15
Produzione di proteine ricombinanti in <i>E.coli</i>	15
Vettori di espressione	16
Amplificazione delle sequenze mediante utilizzo del dNTP Kit Accura.....	23
Valutazione dei risultati mediante elettroforesi su gel di agarosio	25
Purificazione dei frammenti amplificati in PCR.....	26
PCR <i>Colony</i>	31
Purificazione del plasmide tramite utilizzo del QIAspin Miniprep Kit print ..	33
Tipi di cellule competenti utilizzate per la trasformazione	34
Trasformazione cellule competenti mediante induzione con IPTG	36
Purificazione della proteina CXCL12 γ	39
Dialisi della proteina CXCL12 γ	51
Valutazione dei risultati mediante elettroforesi SDS-PAGE	52
Risultati.....	55
Amplificazione.....	58
Clonaggio LIC	61
PCR <i>Colony</i>	63
Purificazione in piccola scala.....	66
Purificazione in media scala di CXCL12 γ	68
Purificazione con cromatografia ad affinità	71
Taglio con Enterochinasi.....	98
Bibliografia.....	102

INTRODUZIONE

CXCL12 sono un insieme di chemochine che ricoprono ruoli chiave in numerosi processi fisiologici e patologici a diversi livelli, come embriogenesi, angiogenesi, ematopoiesi ed infiammazioni a livello di vari organi. Svolgono tali attività inducendo o attivando la migrazione di cellule progenitrici ematopoietiche e di cellule staminali. A seguito di eventi di splicing alternativo del gene CXCL12 (localizzazione 10q11.1), originano 7 diverse isoforme che condividono i primi tre esoni e presentano una distribuzione tessuto-specifica con una funzionalità strettamente legata alla loro componente variabile, ossia al dominio C-terminale [1].

CXCL12 variant: 1
 α : MNAKVVVVLVLTALCLSDG--KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV- 39
 β : MNAKVVVVLVLTALCLSDG--KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV- 39
 γ : MNAKVVVVLVLTALCLSDG--KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV- 39
 ϵ : MNAKVVVVLVLTALCLSDG--KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV- 39
 θ : MNAKVVVVLVLTALCLSDG--KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV- 39
 δ : MNAKVVVVLVLTALCLSDG--KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV- 39

 α -ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNk* 68
 β -ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNkrfk^m* 72
 γ -ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNkgrreekvgkkekigkkkrqkkrkaaqkrkn* 99
 ϵ -ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNnc* 69
 θ -ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNkiwlygnaetlr* 79
 δ -ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNnisaapagkrviagaralhpsppracptaralceirlwppewswpspgdv* 119

FIGURA 1. Sequenze amminoacidiche delle diverse isoforme originate dallo splicing alternativo del gene CXCL12. Le lettere maiuscole indicano i residui conservati, le minuscole quelli diversi all'estremità carboss-terminale. Le sequenze sottolineate sono i domini di legame BBXB [11].

Le citochine sono una famiglia di piccole molecole peptidiche che vengono prodotte da diversi tipi di cellule a seguito di determinati stimoli. Agiscono mediante un'azione autocrina., quando interagiscono con recettori disposti sulla superficie della cellula che le ha prodotte, paracrina, agendo sulle cellule nelle immediate vicinanze di quella che le ha prodotte, o endocrina, quando inducono una risposta in cellule localizzate a notevole distanza. Generalmente, sono molecole che non vengono accumulate nelle cellule che le producono, ma vengono prodotte ex-novo a seguito dell'espressione dei loro geni per essere poi esocitate.

La più importante famiglia di citochine è rappresentata dalle chemochine, che svolgono una importante attività chemotattica, ossia inducono la migrazione direzionale di diversi tipi di cellule in base al gradiente di concentrazione. La maggior parte di queste molecole è caratterizzata dalla presenza di residui cisteinici all'estremità N-terminale, le cui posizioni determinano la loro distribuzione in quattro sottofamiglie: quella a cui appartengono le diverse isoforme di CXCL12 (chemochine CXC), presentano due cisteine all'N-terminale separate da un singolo amminoacido non conservato e sono codificate da un gruppo multigenico localizzato sul cromosoma 4 in posizione 4q21[7]. La principale funzione delle

chemochine è quella di svolgere induzione direzionale della migrazione cellulare, quindi attrazione di leucociti, cellule NK e cellule fagocitarie in generale. Inoltre, agiscono mediando la produzione di superossido, attivazione dei fagociti e stimolazione delle cellule T; in sostanza, agiscono a diversi livelli nella risposta infiammatoria, nonché in processi di angiogenesi, proliferazione di precursori ematopoietici ed alcune insorgenze tumorali [8]. Le chemochine possono avere una funzione omeostatica (ossia vengono costitutivamente prodotte da alcuni tessuti) o infiammatoria (vengono prodotte in fase patologica), come le CXCL12.

Svolgono la loro funzione interagendo con specifici recettori disposti sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio:

- CXCR4: il primo recettore scoperto capace di legare CXCL12 (Figura 2). È una proteina costituita da 352 amminoacidi molto conservata, presentante un'omologia pari all'89% tra il modello umano e quello murino; il gene codificante tale recettore è localizzato in posizione 2q21. È un tipico recettore associato a proteine G, con l'estremità N-terminale extracellulare, sette domini transmembrana e l'estremità N-terminale intracellulare [4]. L'interazione ligando-recettore comporta una trasduzione del segnale che attiva il pathway delle MAP chinasi e della PI3 chinasi, nonché l'attivazione

delle proteine $G\alpha\beta\gamma$ (le proteine G associate al recettore), comportando un aumento della concentrazione intracellulare di ioni calcio e GTP, proliferazione cellulare, apoptosi. Contemporaneamente, vengono attivate anche le chinasi GRK, che fosforilano Ser e Thr e richiamano β -arrestina, promuovendo l'endocitosi. Tuttavia quest'ultimo fenomeno non risulta essere caratteristico in CXCR4 come in altri recettori (Figura 2). Questo recettore permette anche l'infezione dei linfociti T CD4 da HIV.

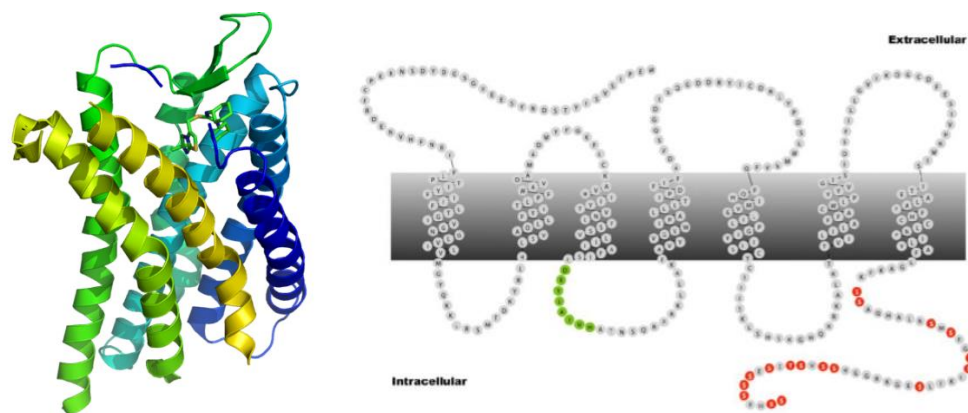


FIGURA 2. Struttura del recettore CXCR4. A sinistra, struttura 3D della proteina; a destra, localizzazione del recettore a livello di membrana, dove è possibile vedere in rosso i siti di fosforilazione (Ser, Thr) [5].

- CXCR7: recettore capace di legare CXCL12 ed altre chemochine, il quale presenta le medesime caratteristiche strutturali del precedente; è stata individuata una co-espressione di questi due recettori in cellule tumorali

pancreatiche, dove svolgono la stessa funzione di interazione con CXCL12 e trasduzione del segnale [2].

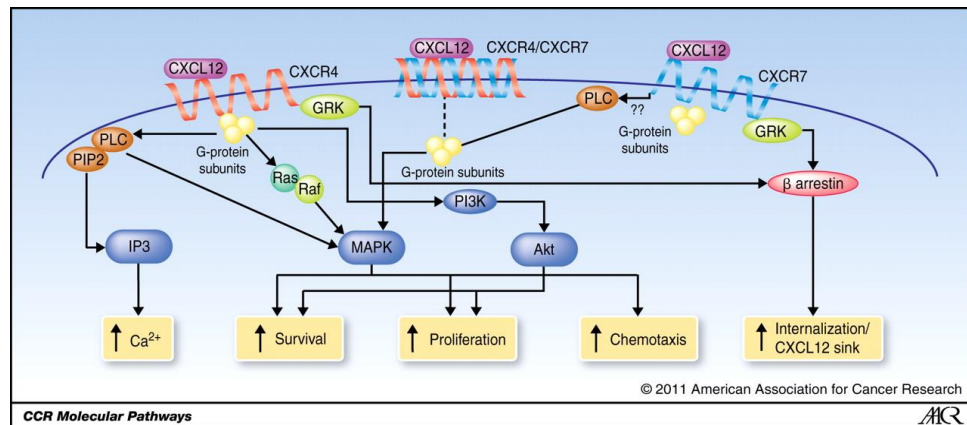
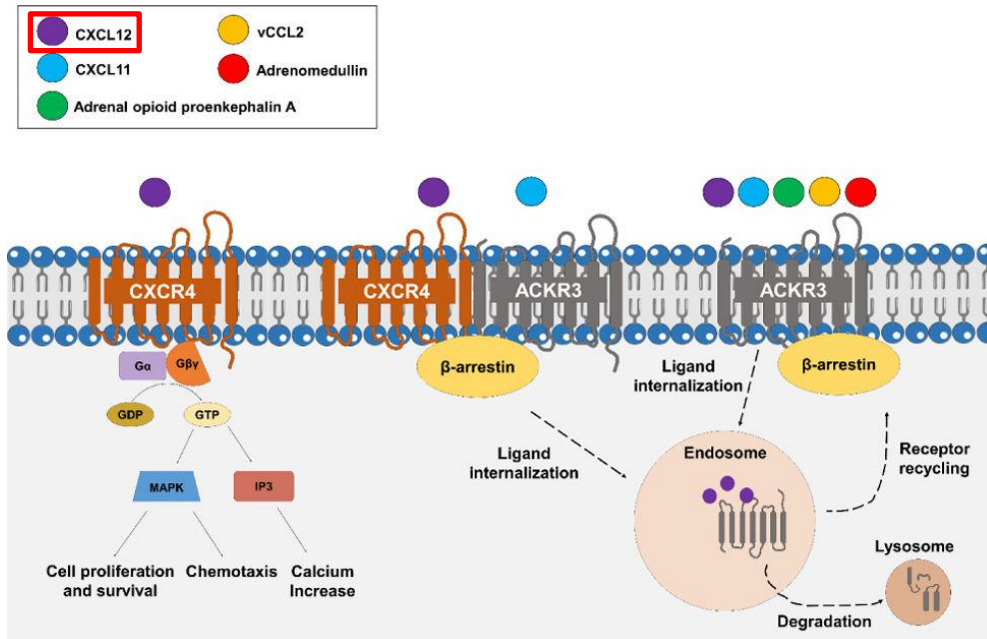


FIGURA 3. Meccanismo d'azione di CXCL12 a seguito dell'interazione con i recettori CXCR4 e CXCR7. Come è possibile notare, entrambi i recettori comportino le medesime risposte a livello intracellulare [6].

- ACKR3: recettore per chemochine atipico, individuato recentemente a livello di numerose tipologie cellulari (ad esempio embrionali, cardiache, renali, astrociti). Capace di legare anche altri generi di macromolecole, tale recettore agisce in maniera completamente differente rispetto ai precedenti, in quanto non agisce svolgendo trasduzione del segnale a seguito dell'interazione con CXCL12, ma ne comporta unicamente l'internalizzazione attraverso un processo di endocitosi mediata da recettore

(Figura 3), questo perché non è associato a proteine G. Attraverso essi, CXCL12 può giocare un ruolo chiave attenuando diversi processi



infiammatori, in maniera dipendente dalla β -arrestina. Alterazioni nell'espressione di questo recettore hanno comportato un aumento della concentrazione di CXCL12 plasmatico, a seguito del suo mancato reclutamento della proteina a livello intracellulare; ciò è risultato evidente anche in pazienti affetti da infarto al miocardio [3]. È stato inoltre visto come un knock-out del gene codificante ACKR3 comporti sviluppi embrionali anomali delle valvole cardiache nei topi, con la loro conseguente morte, fattore che indica l'importanza delle proteine CXCL12 durante la gestazione.

CXCL12 γ è una delle isoforme ottenute a seguito di eventi di splicing alternativo del gene CXCL12. È una proteina monomerica costituita da 98 amminoacidi, ha un peso molecolare di 11.61 KDa ed è caratterizzata dal possedere i primi 88 amminoacidi, partendo dall'estremità ammino-terminale, in comune con le altre isoforme. La sequenza nucleotidica del mRNA γ è costituita da 270 bp, di cui 75 alanine, 75 citosine, 66 guanine e 54 timine; la sequenza completa in formato TEXT è [14]:

FIGURA 4. Confronto dei meccanismi d'azione dei recettori CXCR4 e ACKR3. Come è possibile vedere, quest'ultimo agisce unicamente mediante l'interazione con la β -arrestina, permettendo la formazione di vescicole endocitotiche [3].

```

atgaacgcca  aggtcgtggt  cgtgctggcc  ctcgtgctga
ccacgctctg  ctcagcgac      60
          gggaaagcccg  tcagcctgag  ctacagatgc  ccatgccgat
tcttcgaaag  ccatgttgcc     120
          agagccaacg  tcaagcatct  caaaattctc  aacactccga
actgtgccct  tcagattgta     180
          gctcggctga  agaacaacaa  cagacaagtg  tgcattgacc
cgaagctaaa  gtggattcag     240
          gagtacctgg  agaaagcttt  aaacaagtaa
270

```

La sua presenza nel modello murino è stata individuata nei tessuti fetali e nel cuore, mentre nell'uomo è presente nel sistema nervoso centrale, cuore e nelle cellule endoteliali sinoviali dei pazienti affetti da

artrite reumatoide (tuttavia in quest'ultimo caso è di origine esogena, in quanto è presente la proteina ma non il corrispondente mRNA), ma è completamente assente nei tessuti fetali [12].

La sua importanza a livello fisiologico è associata alla presenza di numerosi residui lisinici (quindi è una proteina cationica a pH fisiologico) e di quattro domini di legame BBXB all'estremità C-terminale, con i quali interagisce con i propri recettori, in particolare CXCR4. Dato che quest'ultimo è il recettore chiave con il quale il virus HIV-1 riesce ad entrare nelle cellule linfocitarie CD4, è stato dimostrato che CXCL12 γ ha un'attività antivirale circa 5 volte superiore rispetto alle altre isoforme dello stesso gene [11].

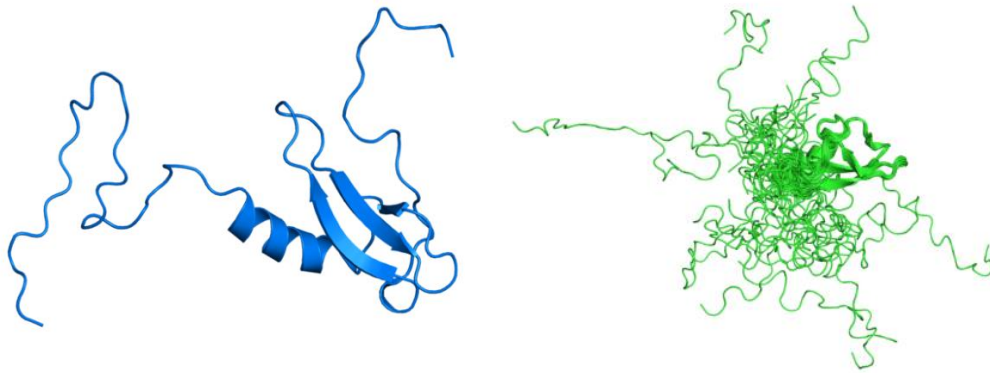


FIGURA 5. Immagini della proteina CXCL12 γ del dominio SCY (1) e della proteina completa (2), entrambe frontali [9].

Dallo stesso studio è stata inoltre riscontrata una più bassa attività chemotattica dell'isoforma γ rispetto alle altre, nonostante abbia una forte propensione ad interagire con glicosamminoglicani (GAGs), ossia molecole solubili che sono spesso oggetto di interazione per molecole che svolgono chemotassi. Molto recentemente uno studio ha messo in luce come questo fenomeno abbia importanza a livello fisiologico: è stato visto che CXCL12 γ gioca un ruolo chiave nella formazione di metastasi in sedi molto distanti da quella di insorgenza tumorale. La proteina infatti viene escreta dalle cellule cancerose per poi entrare nella microcircolazione della massa tumorale, raggiungendo così lo stroma peritumorale ricco di collagene e acido ialuronico (GAG); qui agisce aumentando la permeabilità dei vasi sanguigni ed attivando l'angiogenesi tramite chemotassi [13].

Da ciò si deduce quindi che tale isoforma è in grado di indurre la migrazione direzionale delle cellule secondo gradiente.

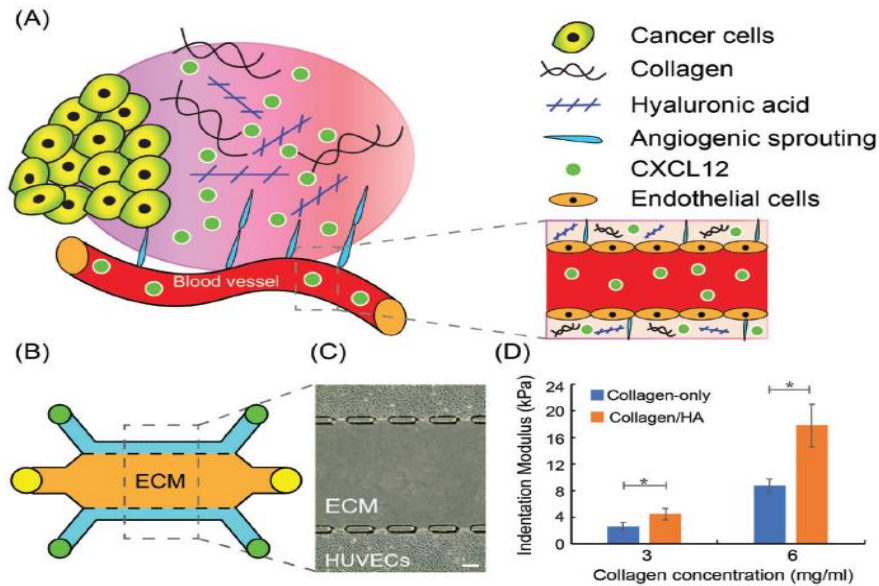


FIGURA 6. Immagine schematizzata dell'attività di CXCL12 γ nell'angiogenesi e nell'aumento della permeabilità capillare durante un processo neoplastico [13].

Altra caratteristica importante di CXCL12 γ è una maggiore resistenza all'attività proteasica rispetto alle altre isoforme. Infatti, CD26 è un enzima cellulare di superficie coinvolto nella trasduzione del segnale, apoptosi e regolazione immunologica; inoltre gioca un ruolo molto importante a livello fisiologico perché taglia citochine e chemochine che presentano prolina o alanina in penultima posizione nella catena amminoacidica all'estremità ammino-terminale, inattivandole. È stato visto come l'isoforma γ sia molto più resistente all'attività di questo enzima rispetto ad altre molecole,

fenomeno confermato dal fatto che *in vivo* la proteina viene scarsamente degradata perché il suo legame con HS dei tessuti connettivi protegge la porzione della proteina contenente il sito di taglio enzimatico, fenomeno che *in vitro* non è invece evidenziabile [1]. Per questo motivo c'è un divario fra l'attività di CXCL12 γ *in vivo* ed *in vitro*.

Un fattore che caratterizza CXCL12 γ è il ruolo che questa proteina ricopre durante processi neuroinfiammatori. È stato visto come questa proteina può non solo essere secreta nell'ambiente extracellulare, ma può svolgere anche un'azione di tipo autocrino ed essere trasportata nel nucleo delle cellule che la producono, come cellule endoteliali e cardiache.

Questo fenomeno è stato riscontrato anche negli astrociti e nelle cellule endoteliali capillari durante la neuroinfiammazione. Come modello animale per la sclerosi multipla è stata utilizzata l'encefalomielite autoimmune nei topi, dove le cellule della microglia, specializzate nella prima e principale difesa immunitaria del sistema nervoso centrale, tendono a disregolarsi e ad attivarsi in misura maggiore.

La stimolazione di queste cellule comporta il rilascio di citochine pro-infiammatorie e dell'enzima ossido nitrico-sintasi (iNOS), generando numerose specie reattive dell'ossigeno e una neuroinfiammazione dannosa

per lo stato di salute delle cellule neuronali. Comparando i livelli di espressione di CXCL12 γ e CXCL12 totale in topi immunizzati con AG (forte inibitore della iONS) e sani con quelli malati, sia nelle cellule endoteliali che negli astrociti, è stato visto come nei primi due i livelli di γ siano nettamente più alti e che i valori di tale espressione siano inversamente proporzionali ai livelli di attività di iONS, suggerendo che questo enzima minimizza l'attività della citochina in analisi e viceversa.

Questo studio inoltre mette in evidenza come il metodo di regolazione dell'attività antinfiammatoria a livello neuronale di CXCL12 risieda nella regolazione dell'espressione di CXCL12 γ , non nella regolazione dell'espressione del recettore, fattore che sembra essere molto importante per gli effetti protettivi della chemochina in tale patologia; inoltre essa viene espressa già nelle prime fasi della neuroinfiammazione[11].

SCOPO DEL LAVORO

Le caratteristiche individuate tramite ricerca in letteratura hanno permesso di individuare in CXCL12 γ una molecola con un altissimo potenziale in ambito biomedico, per il trattamento di differenti patologie e per lo studio di diversi processi fisiologici.

Lo scopo del seguente lavoro è stato quello di produrre la proteina in high-throughput ,con un alto grado di purezza e in quantità considerevoli, fattore che è risultato limitante fino ad ora per la produzione di questa chemochina.

A seguito della produzione, la proteina viene utilizzata per test in vivo dove si cerca di delucidare il ruolo che essa ha nei processi fisiologici e tumorali.

È stato visto come tutte le isoforme del gene CXCL12 siano importanti molecole messaggere tra cellule cancerose e cellule stromali, ma i ruoli che ricoprono in tali processi sono spesso contrastanti, in quanto in alcuni casi hanno un'attività anti-tumorale, in altri pro-tumorale. Per delucidarne quindi la funzione, le proteine vengono testate sia in cellule sane che tumorali.

MATERIALI E METODI

Produzione di proteine ricombinanti in E.coli

La produzione di proteine eterologhe ricombinanti è permessa mediante l'utilizzo di tecniche che permettono il clonaggio di un frammento di DNA codificante la proteina di interesse all'interno di un vettore di espressione. Successivamente il vettore verrà inserito in cellule adibite all'espressione e alla produzione della proteina.

Le cellule utilizzate per l'espressione possono essere sia eucariotiche che procariotiche, le quali vengono scelte in base alle caratteristiche della proteina che vogliamo produrre. I modelli eucariotici vengono adoperati per la produzione di proteine soggette a modifiche post-traduzionali, alle quali i sistemi di espressione procariotici non riescono a far fronte. Quindi, la produzione di proteine all'interno di cellule procariotiche risulta essere più vantaggiosa per svariati motivi: in prima istanza, essendo i sistemi procariotici relativamente più semplici, si riesce ad avere un buon controllo e monitoraggio dell'espressione genetica; inoltre, mediante l'ingegneria genetica è possibile ottenere dei prodotti di fusione che permettono alla proteina di essere strutturalmente più stabile, di essere secreta dalle cellule

nel mezzo di coltura e di avere delle caratteristiche utili per i successivi step di purificazione; infine con i batteri è possibile produrre alti livelli di proteina. In questo lavoro di tesi è stato scelto come ospite E.coli e sono stati usati diversi ceppi per ottenere una migliore espressione della proteina ricombinante.

Vettore d'espressione.

I vettori di espressione sono dei costrutti genetici (plasmidi) che permettono l'introduzione di geni codificanti proteine all'interno delle cellule adibite alla loro produzione; essi presentano al loro interno gli elementi necessari per la trascrizione e la traduzione della proteina di interesse, la quale subirà in seguito un processo di estrazione e purificazione per test funzionali.

Gli elementi essenziali di un vettore di espressione procariotico sono:

- ❖ origine di replicazione, per la sua replicazione autonoma all'interno della cellula come elemento extracromosomico
- ❖ marcatore di selezione, ossia geni che forniscono particolari caratteristiche fenotipiche alle colonie in possesso del vettore
- ❖ sito di clonaggio multiplo, o polylinker, regione del vettore contenente siti di restrizione per diversi enzimi

Specifici per vettori di espressione sono:

- ❖ promotore, sequenza posta a monte di quella codificante la proteina dove l'enzima RNA polimerasi II ha la capacità di interagire con il DNA ed avviare la trascrizione
- ❖ sequenza di Shine-Dalagarno, regione dove avviene l'interazione con la subunità 30S del ribosoma batterico
- ❖ Tag, elementi che permettono di individuare o purificare la proteina all'interno dell'ospite o del suo lisato; generalmente si utilizza l'His tag, ossia una sequenza codificante per sei istidine che possono essere inserite o all'estremità carbossi-terminale o a quella ammino-terminale della proteina
- ❖ Sito di taglio per una proteasi, necessario per ottenere la proteina senza il tag alla fine del processo produttivo
- ❖ terminatore di trascrizione, sequenza posta a valle di quella codificante la proteina, che permette l'arresto della trascrizione
- ❖ codone di inizio e di termine della traduzione
- ❖ sequenze genetiche specifiche per l'esperimento che si sta conducendo, come sequenze segnale per la secrezione della proteina nell'ambiente extracellulare o periplasmatico o sequenze che codificano per partner di fusione.

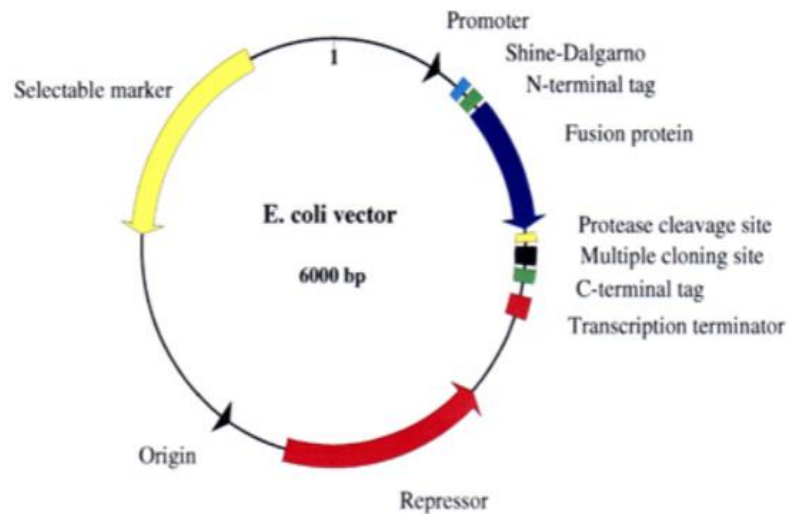


FIGURA 1. Vettore di espressione procariotico base contenente gli elementi indispensabili per la produzione di proteine eterologhe[15].

Per l'espressione di CXCL12 sono stati utilizzati vettori appartenenti alla linea pMCSG prodotti dal Midwest Center for Structural Genomics, nel dettaglio pMCSG7 nelle prime fasi della sperimentazione e successivamente pMCSG9. Questi vettori, derivati da un sistema pET, sono caratterizzati dalla presenza di sequenze che permettono il clonaggio indipendente dalla ligazione (LIC).

Devono essere usati con ceppi di E.coli che possiedono la cassetta DE3 (promotore Lac che controlla l'espressione della RNA polimerasi di T7) integrata nel genoma.

Vettore di espressione pMCSG7 e modifiche apportate

Il vettore di espressione pMCSG7 presenta i seguenti elementi:

- ❖ promotore forte del batteriofago T7 che controlla l'espressione di CXCL12
- ❖ RBS
- ❖ Codone di inizio della traduzione
- ❖ His tag, sequenza codificante sei istidine necessarie per la cromatografia di affinità basata sul Ni²⁺, modificato in precedenza con l'aggiunta di 4 His (totale 10 His)
- ❖ Sito TEV (Tobacco Etch Virus protease cleavage site)
- ❖ Sito di restrizione per l'enzima SspI necessario per il clonaggio LIC
- ❖ Codone di termine della traduzione
- ❖ Terminatore del batteriofago T7

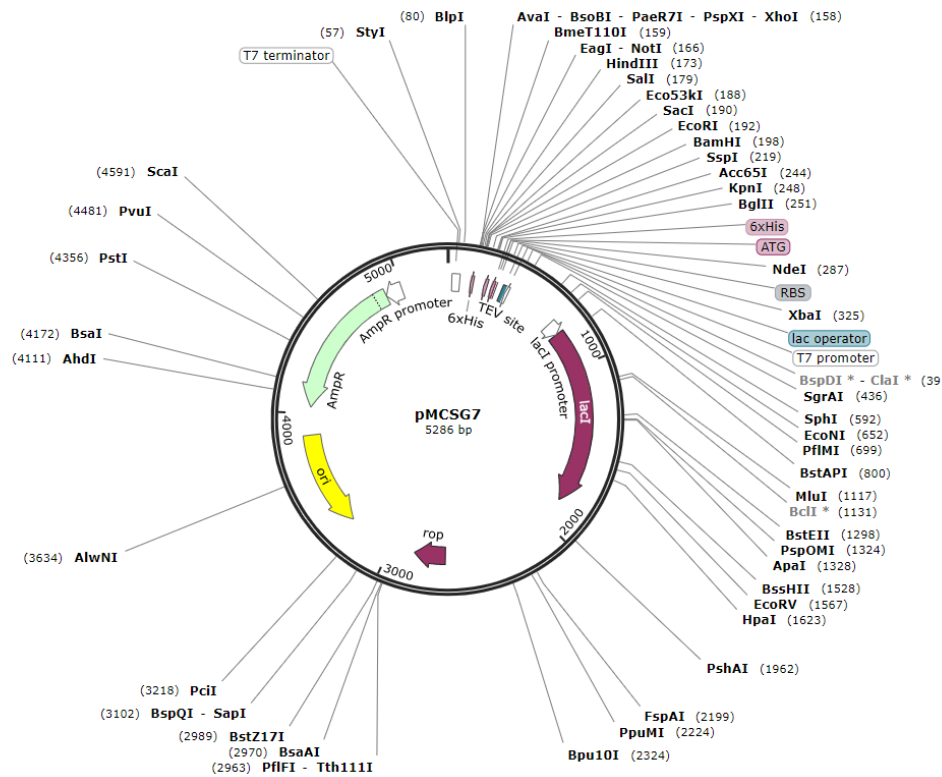


FIGURA 2. Mappa del vettore di espressione pMCSG7 [16].

Poiché la parte che contraddistingue e caratterizza le diverse isoforme di CXCL12 ~~risiede~~ risiede all'estremità C-terminale, si è scelto di usare un vettore con il tag all'estremità N-terminale. Nel vettore pMCSG7 il tag può essere rimosso mediante l'uso della proteasi del virus del Tabacco di Etch

(TEV) che a valle del taglio lascerà 3 residui amminoacidici aggiuntivi all'estremità ammino-terminale della CXCL12. L'N-terminale di queste citochine è responsabile del legame con i recettori, quindi deve essere identico alla proteina naturale, per questo sono state apportate delle modifiche strutturali al vettore con il fine di salvaguardare il più possibile l'integrità di questa porzione proteica. Le modifiche apportate, che hanno originato il vettore p7-EK sono le seguenti:

- ❖ Sostituzione del sito di taglio TEV con sito di taglio per l'enterochinasi bovina (EK), per permettere la formazione di estremità N-terminali nelle CXCL12 identiche a quelle originali.
- ❖ Sostituzione del sito di taglio per Ssp I con quello per Bse RI, necessario per la linearizzazione del vettore modificato.

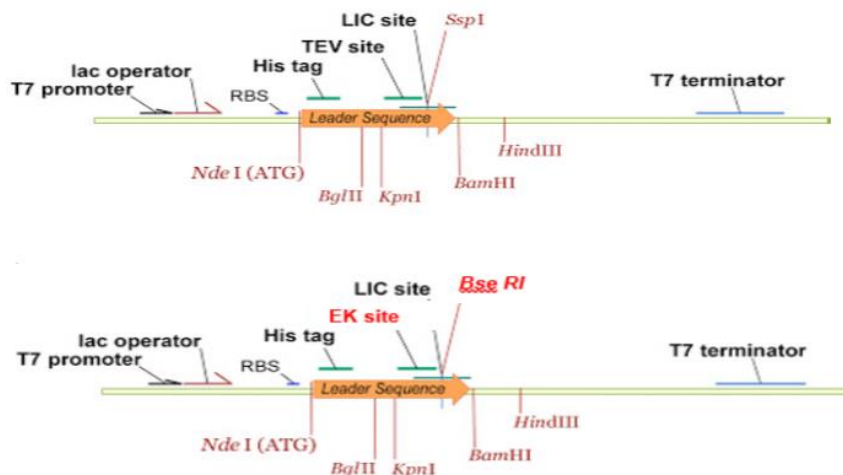


FIGURA 3. Modifiche condotte sul vettore di espressione pMCSG7 per ottenere pMCSG7-EK

Vettore di espressione pMCSG9-EK

Il vettore di espressione principalmente utilizzato per la produzione di CXCL12 γ è basato su pMCSG9, vettore appartenente alla stessa categoria del precedente, ma che presenta una particolarità, ossia una sequenza codificante Maltose Binding Protein (MBP), necessaria per aumentare la solubilità della proteina, evitando la formazione di aggregati durante la purificazione.

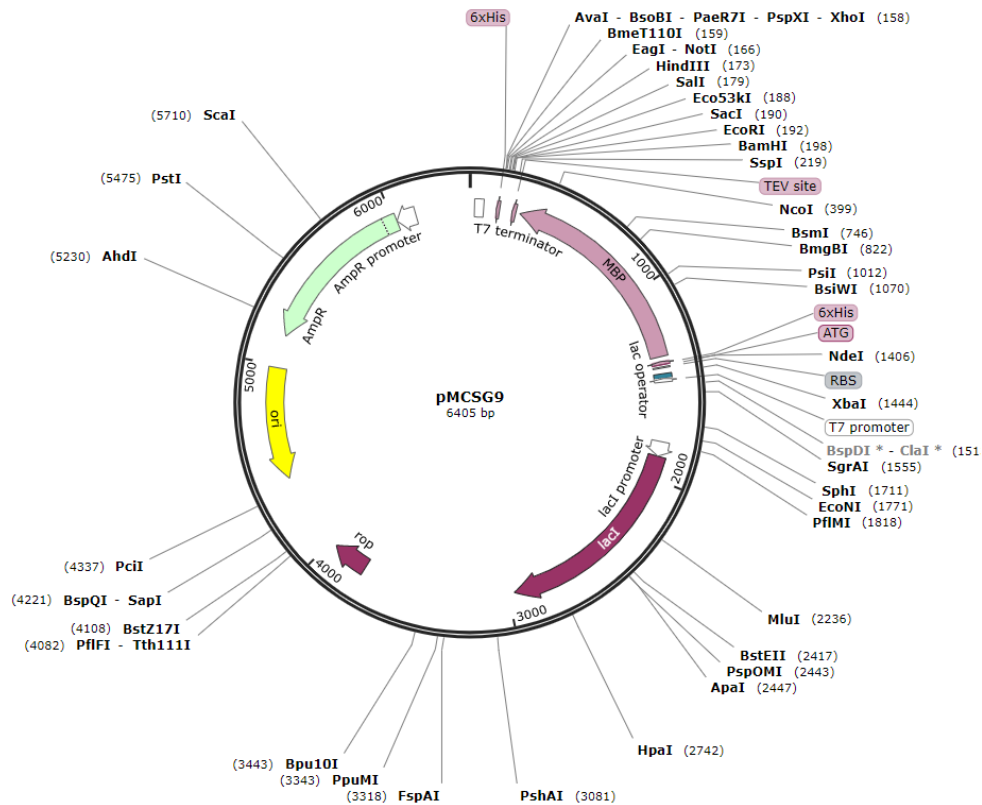


FIGURA 4. Struttura del vettore di espressione pMCSG9 [16].

Tale vettore è stato modificato nella medesima maniera di pMCSG7, in modo da ottenere p9-EK.

Amplificazione delle sequenze mediante l'utilizzo del dNTP kit ACCURA.

Attraverso il processo di amplificazione è possibile ottenere numerose copie del gene codificante la proteina di interesse sfruttando la tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction). Questa procedura rivoluzionaria in biologia molecolare, permette di aumentare in maniera esponenziale il numero di copie di una particolare sequenza di interesse attraverso l'utilizzo di una DNA Polimerasi termostabile, capace di condurre l'operazione per 30-35 volte (cicli di PCR). Per prima cosa il DNA viene denaturato ad alta temperatura, staccando i due filamenti della doppia elica l'uno dall'altro. Successivamente vengono fatti interagire con ogni filamento singolo una coppia di primer, che presentano una sequenza omologa a quella delle estremità dei frammenti e che presentano direzioni opposte reciprocamente (primer forward e reverse). Questa fase, definita annealing, avviene ad una temperatura compresa tra i 55°C e i 65°C. Quest'ultima passa poi a 72°C e durante questa fase la DNA Polimerasi riconosce e si attacca ai primer e, mediante l'utilizzo dNTP presenti nella miscela di reazione, sintetizza il

filamento complementare a quello di origine, che funge da stampo. Al termine di questa fase l'enzima si stacca per poi riprendere un secondo ciclo di amplificazione, che ripercorre le stesse tappe appena descritte.

In questo caso, per l'amplificazione è stato utilizzato l'enzima ACCURA™ High Fidelity Polymerase.

La miscela di reazione è la seguente:

2x HF Reaction Buffer	25 µl
dNTPs 2.5 mM each	4 µl
F/R primer 5 µM each	10 µl
DNA diluito 1/1000	2 µl
H ₂ O Ambion	8.5 µl
	50 µl totali

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- 94°C per un minuto (denaturazione iniziale)

Seguita da

- 94°C per 15 secondi

- 60°C per 15 secondi (annealing)

- 72°C per 1 minuto

Il processo è stato ripetuto per 30 cicli.

Seguiti da

- 72°C per 10 minuti (estensione finale)

Valutazione dei risultati mediante elettroforesi su gel d'agarosio

I campioni ottenuti vengono posti in elettroforesi su gel d'agarosio, dove è possibile valutare l'amplificazione prima dell'utilizzo del campione per il clonaggio. L'elettroforesi in gel di agarosio è una tecnica che si utilizza per separare frammenti di DNA in base alla loro grandezza e peso molecolare, grazie all'utilizzo di un campo elettrico. Per la procedura si utilizza una camera per elettroforesi riempita di soluzione tampone capace di condurre l'energia elettrica, dove si inserisce il gel così costituito da 0.8 a 1.8% di agarosio e TBE 1x e cybr safe, agente intercalante fluorescente che permette la visualizzazione dei frammenti esposti a raggi UV.

Il gel presenta dei pozzetti nei quali viene inserito il campione e una miscela di frammenti di DNA standard che permette di determinare il peso molecolare dei frammenti amplificati. Prima del caricamento i campioni vengono preparati aggiungendo il colorante NEB Loading Dye Purple 6x.

Azionando il campo elettrico, i frammenti carichi negativamente si muoveranno dal polo negativo verso il polo positivo. Ogni banda è costituita da frammenti di DNA caratterizzati da un determinato peso molecolare. A seguito dell'elettroforesi i campioni di DNA sono visualizzati attraverso l'emissione in fluorescenza indotta dai raggi UV, con le immagini acquisite attraverso il ChemiDoc (BioRad).

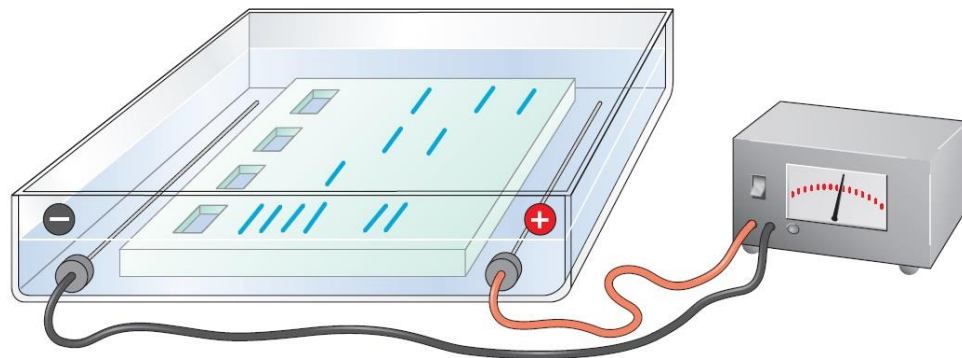


FIGURA 5. Schema rappresentativo dell'elettroforesi su gel di agarosio.

Purificazione dei frammenti amplificati in PCR

I frammenti amplificati corrispondenti alle sequenze da clonare sono stati purificati: 1) direttamente dalla miscela di PCR o 2) dalle bande estratte dal

gel dopo l'elettroforesi, utilizzando il kit NucleoSpin® Gel and PCR clean-up.

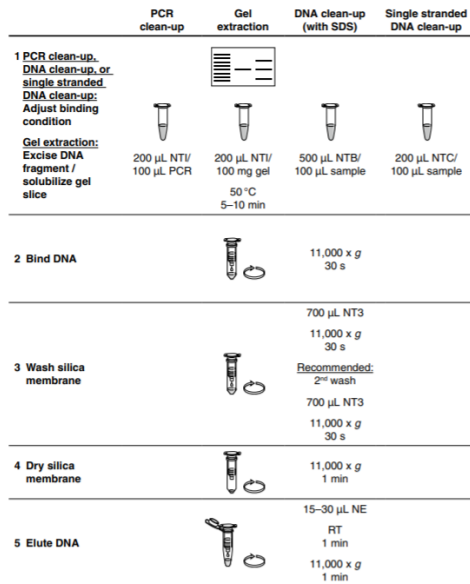


FIGURA 6. Schema riassuntivo della procedura di utilizzo del NucleoSpin® Gel and PCR clean-up.

Inserimento del gene CXCL12 nel vettore di espressione p9-EK tramite clonaggio LIC.

Il clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning) è una tecnica di ingegneria genetica che permette di svolgere la clonazione senza l'ausilio dell'enzima ligasi. Questo clonaggio è possibile grazie alla presenza nel vettore di

particolari sequenze (LIC) modificabili con l'ausilio dell'attività 3' esonucleasica della T4 polimerasi.

Per prima cosa è necessario linearizzare il vettore attraverso l'utilizzo di un enzima di restrizione che produce estremità nette o sfalsate (sticky ends) ~~piuttosto corte~~. Per ottenere delle sporgenze più lunghe viene utilizzata la T4 DNA Polimerasi in presenza di un unico dNTP: in tali condizioni l'enzima agisce con una attività 3' esonucleasica, staccando i nucleotidi su uno dei filamenti della doppia elica fino al raggiungimento del nucleotide che svolge la funzione di stop, ~~match con~~ lo stesso presente nella soluzione di reazione. Successivamente si modifica l'insero in maniera tale che possa inserirsi all'interno del vettore amplificandolo in PCR con specifici primer, che permettono al frammento di acquisire delle estremità con sequenze ~~analoghe~~ complementari a quelle precedentemente create nel vettore. Al termine dell'amplificazione si ottiene un frammento con estremità nette, che verranno modificate sempre con l'attività della T4 DNA Polimerasi in presenza del dNTP ~~omologo~~ complementare a quello usato per la modificazione del vettore, ottenendo in questo modo delle estremità idonee ad interagire tra di loro, creando una regione di ibridazione abbastanza lunga e stabile da non necessitare dell'intervento di ligasi.

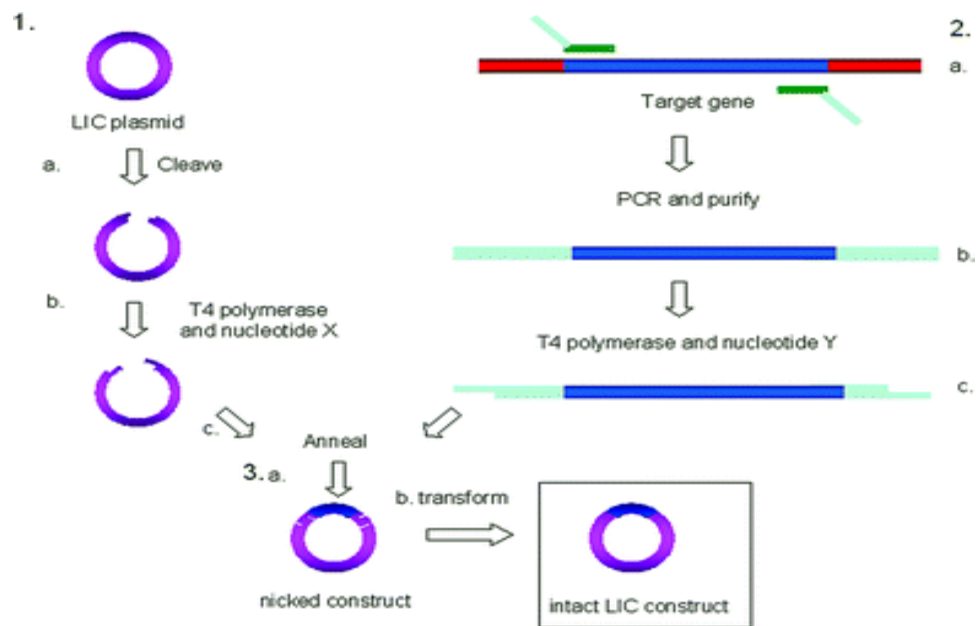


FIGURA 7. Schema rappresentativo del clonaggio LIC [17]

Per il clonaggio di CXCL12 γ la sequenza nucleotidica è stata privata di quella codificante il peptide leader (in blu) che permette l'esportazione della proteina nell'ambiente extracellulare negli eucarioti, ma non viene ~~letta~~ usata dai sistemi procariotici.

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACC
 GCGCTCTGCCTCAGCGACGGGAGCCCGTCAGCCTGAGCTACA
 GATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCA

ACGTCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTT
 CAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGC
 ATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAGGAGTACCTGGAGAAA
 GCTTTAAACAAAGGGGCGCAGAGAAGAAAAAGTGGGGAAAAA
 AGAAAAGATAGGAAAAAAGAAGCGACAGAAGAAGAGAAAGG
 CTGCCCAGAAAAGGAAAAACTAG

Il protocollo seguito è :

	VEETTORE (20 ng/ μ l)	INSERTO (50 ng/ μ l)
DNA	5 μ l	2 μ l
NEB buffer 5x	2 μ l	2 μ l
dGTP	1 μ l	//
dCTP	//	1 μ l
T4 DNA pol (dil. 1/8)	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	1 μ l	4 μ l

- incubazione in PCR , 22°C per 40 minuti
- inattivazione in PCR, 75°C per 20 minuti
- aggiunta 2 μ l del vettore trattato LIC +2 μ l di inserto trattato LIC
- annealing, 22°C per 30 minuti
- aggiungere 2 μ l EDTA 25 mM, temperatura ambiente per 5 minuti

- portare a volume (10 μ l) con H₂O ambion

PCR Colony

La PCR colony è un metodo rapido che può essere svolto in high throughput per determinare la presenza di un frammento di DNA in un plasmide direttamente dalle colonie cellulari trasformate. A seguito della lisi delle cellule formanti le colonie e la conseguente fuoriuscita da esse di DNA cellulare, è possibile condurre un'amplificazione dell'inserto codificante la proteina di interesse presente nel vettore. Per fare questo vengono utilizzati coppie di primer capaci di legarsi alle sequenze vettoriali a monte e a valle dell'inserto, così da ottenere informazioni circa la lunghezza e l'orientamento dell'inserto stesso. Una colonia batterica viene quindi prelevata e aggiunta ad una miscela di reazione PCR. Nella fase di riscaldamento in PCR, avviene la lisi cellulare e la conseguente fuoriuscita di DNA vettoriale, sul quale può avvenire l'amplificazione.

- sono state aggiunte 4 colonie in piastra microtiter contenente 50 μ l di acqua in ogni pozzetto

- la piastra è stata posta in PCR per 10 minuti a bollore. Durante questa fase avviene la lisi cellulare

- l'amplificazione condotta sul DNA fuoriuscito dalle cellule viene amplificata con l'utilizzo di: primer F/R 5 μ M, Mix Red Taq 5 U/ μ l, dNTP 2mM each, acqua fino a volume di 25 μ l.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- 95°C per 2 minuti (denaturazione)
- 95°C per 30 secondi
- 68°C per 30 secondi (annealing)
- 72°C per 30 secondi
- 72°C per 4 minuti (estensione)

Il processo è stato ripetuto per 35 cicli.

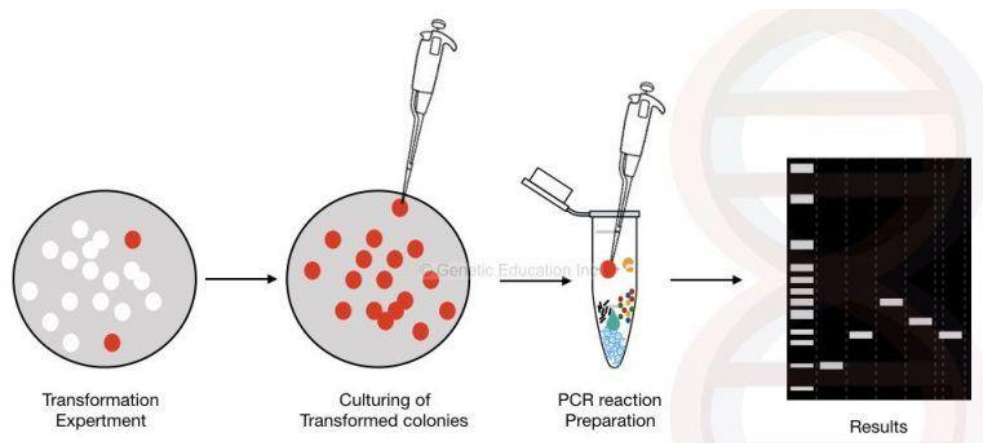


FIGURA 14. Schema riassuntivo della PCR colony [18].

Purificazione del plasmide tramite l'utilizzo QIAprep Spin Miniprep Kit Print

Il processo di estrazione del plasmide dalle cellule avviene tramite l'utilizzo del QIAprep Spin Miniprep Kit Print, che per mezzo di una lisi alcalina con tampone contenente idrossido di sodio.

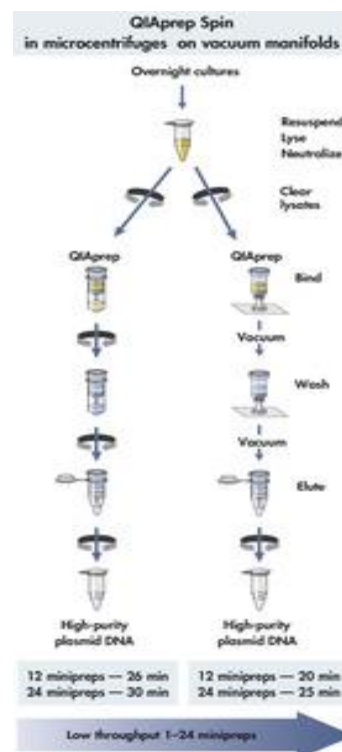


FIGURA 8. Schema riassuntivo della procedura di utilizzo del kit QIAprep Spin Miniprep Kit Print.

Terreni utilizzati durante la sperimentazione

- LB (Luria-Bertani) pH 7.5, con Triptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%
- SOC (Super Optimal Broth with Catabolyt repression), con Triptone 2%, yeast extract 0.5%, glucosio 20 mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 10 mM.

Tipi di cellule competenti utilizzate per la trasformazione.

Il tipo di cellule competenti di E. coli scelte per la trasformazione presentano le caratteristiche migliori per produrre la proteina di interesse.

Le prime cellule testate sono le BL21(DE3) pLysS₂. Tali cellule di E. coli sono state ingegnerizzate, ponendo nel loro genoma una cassetta di espressione contenente il promotore Lac, seguito dall'unità codificante la RNA polimerasi T7; infine è presente il gene Lac I che garantisce la presenza del repressore Lac, il quale permette il controllo dell'apparato d'espressione a livello cellulare prima dell'induzione con IPTG (induce l'espressione dei geni sotto il controllo per promotore Lac). Le cellule, inoltre, presentano il vettore pLysS, che produce, sotto il controllo di un promotore costitutivo, il lisozima di T7, necessario per catturare la RNA polimerasi T7 in rapporto

1:1, bloccandone l'attività quando l'enzima viene prodotto durante le fasi precedenti l'induzione.

Il genere di costrutto utilizzato per l'espressione della proteina di interesse è un vettore appartenente alla serie pET, contenente una cassetta di espressione con il promotore del gene 10 di T7 (gene tardivo molto espresso), seguito dal gene Lac o (utile per il controllo dell'espressione prima dell'induzione) e dal gene target.

A seguito dell'aggiunta di IPTG, i livelli di espressione della T7 RNA polimerasi aumentano in maniera considerevole, per cui l'attività del lisozima T7 non sarà in grado di ostacolare l'induzione sul promotore di T7 presente nel vettore pET, e di conseguenza non intaccherà l'espressione della proteina di interesse.

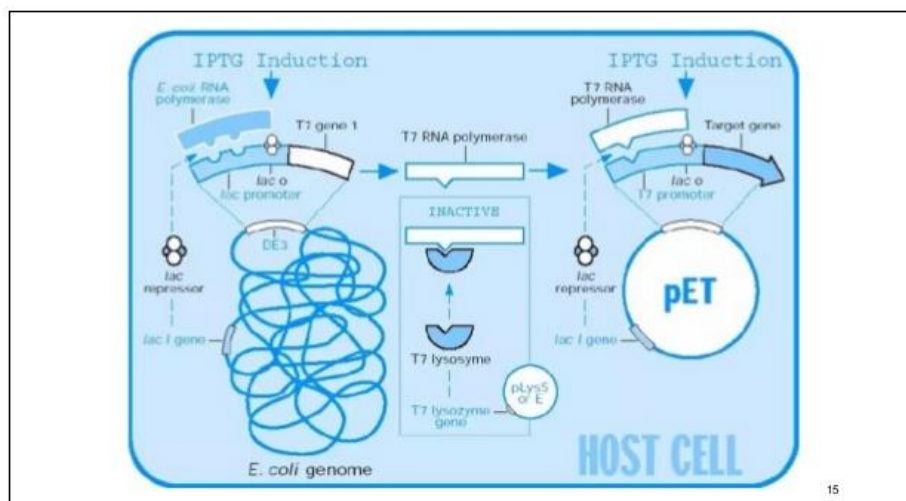


FIGURA 9. Schema rappresentativo del processo di induzione con IPTG in cellule BL21 (DE3) pLysS.

Successivamente sono state testate le cellule C41 pLys, derivate dalle cellule BL21 descritte precedentemente. La loro peculiarità risiede nella presenza di una mutazione che salvaguarda la vitalità cellulare a seguito della produzione di quantità ingenti di proteina ricombinante, che potrebbe risultare tossica per le cellule stesse.

Per la produzione di CXCL12 γ sono state utilizzate principalmente quest'ultime cellule.

Infine, sono state testate anche cellule Rosetta, derivate dalle BL21. Sono ceppi progettati per migliorare l'espressione delle proteine eucariotiche che contengono codoni raramente utilizzati nell'*E. coli*. Questi ceppi forniscono una "rosetta" tRNA per i codoni AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA su un plasmide. Così i ceppi di Rosetta permettono una traduzione "universale", altrimenti inefficiente a causa del "codone usage" limitato in *E. coli*. In Rosetta(DE3) pLys, i geni rari dei tRNA sono presenti sugli stessi plasmidi che portano il gene lisozima T7.

Trasformazione delle cellule competenti mediante l'induzione con IPTG.

La trasformazione è il processo attraverso il quale viene inserito il vettore ricombinante contenente il gene codificante CXCL12 γ nelle cellule competenti, dove avverrà la produzione proteica. La procedura viene

condotta mediante l'utilizzo di strumentazione fredda per salvaguardare l'integrità delle cellule.

- Vengono prelevati 50 μ l di cellule dallo stock posto a -80°C ai quali vengono aggiunti 2 μ l di vettore a concentrazione 20 ng/ μ l
- l'incubazione avviene per 30 minuti in ghiaccio.
- viene condotto l'heat shock a 42°C per 45 secondi
- ulteriore incubazione in ghiaccio per 2 minuti
- al campione vengono aggiunti 950 μ l di SOC

Il plasmide ricombinante ottenuto a seguito della ligazione viene amplificato tramite trasformazione di cellule competenti di E. coli C41 congelate, ossia cellule capaci di acquisire materiale genetico extracromosomico contenente il gene codificante la proteina di interesse. Per tale procedura fondamentale è l'utilizzo di strumentazione fredda, posta a -20°C prima dell'utilizzo per preservare l'integrità e la funzionalità delle cellule.

Sono stati utilizzati 50 μ l di cellule competenti prelevate dallo stock posto a -80°C , con 2 μ l di plasmide ricombinante.

Il processo avviene con i seguenti step:

- incubazione delle cellule in ghiaccio per 20 minuti, così che il loro scongelamento avvenga in maniera graduale

- heat shock a 42°C per 45 secondi
- incubazione per 2 minuti in ghiaccio
- aggiunta 950 µl di terreno SOC RECOVERY (Super Optimal broth with Catabolyte repression), terreno molto ricco di proteine in cui il glucosio rappresenta la fonte principale di carbonio immediatamente disponibile per le cellule che riprendono la loro attività fisiologica a seguito dello scongelamento
- incubazione in agitazione, 37°C per 1 ora

Per la preparazione del pre-inoculo:

- 220 µl di cellule trasformate vengono addizionate a 5 ml di LB+Amp (100 µg/ µl)
- incubazione a 37°C o.n. in agitazione a 400 rpm

A seguito dell'incubazione si procede con la crescita in media scala, dove il pre-inoculo viene inserito in beute contenenti 500 ml dello stesso terreno dove, seguito di una incubazione di 1 ora a 37°C in agitazione, le cellule si moltiplicheranno. Raggiunto un valore di lettura allo spettrofotometro a $\lambda = 600\text{nm}$ di 0.6 OD circa, viene prelevata una aliquota di campione (che verrà utilizzata come controllo per il test di induzione condotto in

elettroforesi SDS-PAGE) ed è possibile procedere con l'induzione mediante l'aggiunta di 100 µl di IPTG, ottenendo una concentrazione finale di quest'ultimo pari 0.2 mM. Si lascia il sistema in incubazione a 37°C in agitazione a 250 rpm per tre ore.

A seguito del tempo di incubazione, la coltura cellulare viene centrifugata a 4000 xg per 20 minuti a 4°C, e in tal modo si può recuperare il pellet che verrà congelato a -80°C per poi essere utilizzato per la purificazione.

Purificazione della proteina CXCL12γ

Lisi cellulare: sonicazione

Il primo step da condurre per estrarre la proteina dalle cellule che l'hanno prodotta è la lisi cellulare, che in questo caso è stata condotta per mezzo della sonicazione. Quest'ultimo processo è preceduto da una fase di trattamento del campione con un buffer di lisi (in rapporto 1g di pellet e 10 ml di buffer) e l'aggiunta di lisozima (0.2 mg/ml), enzima capace di idrolizzare i legami β-1,4 del peptidoglicano e produrre in tal modo un danno alla parete cellulare batterica. A seguito di una fase di incubazione per 30 minuti a 4°C in rotazione, il campione viene inserito nel sonicatore, uno strumento capace di produrre ultrasuoni ad altissima frequenza che

provocano microlesioni nelle membrane plasmatiche di cellule in sospensione, le quali portano alla lisi delle cellule e alla conseguente fuoriuscita di materiale intracellulare.

Il sonicatore utilizzato in questo lavoro è composto da tre componenti principali: il sonicatore vero e proprio, un treassi che costituisce il piano di lavoro e un sistema di refrigerazione, il tutto collegato ad un sistema software che permette di automatizzare il macchinario. La refrigerazione a 4°C deve essere attivata 15 minuti prima della sonicazione, in maniera tale da avere una temperatura idonea già durante le prime fasi della rottura cellulare. lo strumento è in grado di sonicare campioni in diversi volumi grazie all'ausilio di elettrodi di dimensioni differenti, così che è possibile lavorare sia in plate che in falcon: nel primo caso si utilizza una AMP= 30%, nel secondo una AMP= 60%, in quanto essa è correlata alla quantità di materiale da sonicare. Durante la produzione delle varie isoforme di CXCL12 si è lavorato generalmente in media scala, per cui il campione è stato posto in falcon. Il programma utilizzato prevede 40 cicli di sonicazione intervallati da un lavaggio automatico dell'elettrodo con acqua di secondo livello, e il processo può avvenire esclusivamente in immersione: a tale proposito, quindi, è necessario che il campione sia opportunamente diluito con lysis buffer e

correttamente risospeso, senza lasciare agglomerati di pellet prima della sonicazione.

Il campione sonicato viene pesato e centrifugato a 15000 xg per 30 minuti a 4°C, così che il corpuscolato cellulare e le molecole di grandi dimensioni possano precipitare e formare il pellet, separandolo dal surnatante contenente la proteina di interesse. È su questa frazione infatti che si conduce la purificazione. Anche in questo caso preleviamo una aliquota di campione, utile per individuare la localizzazione della proteina e condurre un test di solubilità (lisato chiarificato).

Composizione LYSIS BUFFER:

50 mM HEPES pH 7.8 (da soluzione 1M)
300 mM NaCl (da soluzione 5M)
0.1 X cocktail di inibitori di proteasi
0.5 mM TCEP (da soluzione 0.5 M)
Benzonasi

Cromatografia ad affinità

La cromatografia ad affinità è una tecnica che permette di sfruttare la capacità di due molecole, nel dettaglio il ligando e la proteina, di interagire con un legame molto forte ma reversibile che permette di separare la macromolecola di mio interesse dalla restante parte del campione.

Il processo viene condotto in colonna, all'interno della quale viene posta la matrice, composto stabile, rigido, con un basso potere assorbente ed una grande superficie di legame. Il processo di purificazione prevede una fase di binding tra matrice e proteina, una fase di lavaggio con conseguente eliminazione di ciò che non si è legato ed infine l'eluizione, cioè la fase in cui la proteina viene staccata dal supporto.

La cromatografia eseguita per la purificazione di CXCL12 γ è definita Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), sviluppata da Porath nel 1975 che si basa sull'interazione di residui proteici (quali istidine, cisteine e in alcuni casi triptofani) con cationi di metalli di transizione. In questo progetto si è sfruttata la capacità di interazione tra ioni Ni²⁺ ed il Tag 10 istidine presente all'estremità N-terminale di ogni singola isoforma, utilizzando la resina G-SepTM Ni IDA Agarose Fast Flow della G-Biosciences e la HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel della SIGMA.

La G-Sep™ Ni IDA Agarose Fast Flow della G-Biosciences è specificatamente progettata per la purificazione delle proteine ricombinanti fuse con His-tag e prodotte sia in cellule batteriche che di mammifero o insetto. La resina presenta ioni Nickel immobilizzati su microsfele di agarosio al 6% altamente reticolate con l'agente chelante acido iminodiacetico (IDA). Le microsfele di agarosio hanno un diametro compreso tra 50µ m e 160µ m, munite di distanziatore epicloidrina e ricoperte di ioni Ni²⁺ con densità pari a 20-40µ mol /ml. La resina ha una capacità di binding pari a 5-10mg di proteina con His-tag/ml di medium, con un limite di esclusione di proteine globulari di diametro di 450nm; è stabile nel processo purificativo in un range di pH compreso tra 3 e 12 con qualsiasi tipo di tampone acquoso comunemente utilizzato per questi scopi. Viene conservata in soluzione al 20% di etanolo a 4°C, per cui è necessaria una riequilibrio della resina prima del suo utilizzo.

La la HIS-Select® Nickel Affinity Gel della SIGMA è anch'essa progettata per la purificazione di proteine ricombinanti dotate di His-tag prodotte in diversi modelli cellulari. È costituita da microsfele di agarosio al 6% altamente reticolate rivestite con Nickel tetradentato che permette un'elevata selettività legata all'interazione con uno spacer neutro capace di minimizzare le interazioni ioniche non desiderate con la resina. Presenta una capacità di

binding di circa 15 mg di proteina con His-tag/ ml di medium. Grazie alla presenza di un legame idrofilico, non carico, del gruppo chelato NTA con l'agarosio, permette di ottenere un'elevata ed esclusiva selettività per proteine con His-tag, nonché una eluizione del campione mediante imidazolo. Viene conservata in sospensione con una soluzione al 20% di etanolo in rapporto 1:1, per cui anche in questo caso è necessario riequilibrare la resina prima di intraprendere il processo purificativo. Non lega proteine da più di 40 kDa, è compatibile con tutti i tamponi generalmente utilizzati in cromatografia e viene conservata a 4°C.

Prima dell'utilizzo, la resina necessita di essere equilibrata per eliminare l'etanolo nel quale è venduta e per renderla idonea ai passaggi successivi di purificazione proteica.

Si procede prelevando lo slurry al quale viene aggiunta acqua; a seguito di questo passaggio viene aggiunto REEQUILIBRATION BUFFER, costituito da 50 mM HEPES, 300 mM NaCl e acqua (il volume dell'EB è circa 3 volte quello della resina).

Prima di procedere con il binding, viene prelevata una aliquota di lisato totale che viene diluita con acqua; al campione diluito si aggiunge SDS-SB2x e si procede con una centrifugazione a 1000 xg, al termine della quale si

ottiene LTs ed LTp, che verranno successivamente utilizzati per la valutazione della procedura di purificazione.

Il binding viene condotto ponendo nella resina equilibrata il lisato chiarificato LC e lasciando il sistema in incubazione over night a 4°C in rotazione.

Terminato questo step, si pone il campione all'interno di una colonna da cromatografia e si lascia sgocciolare il Flow-through, ossia la componente del lisato chiarificato che non si è legata alla resina: su di essa infatti si è legata la proteina CXCL12 γ e presumibilmente poche altre proteine batteriche contaminanti. Il FT viene raccolto in falcon e prima del congelamento a -80°C ne viene prelevata una aliquota, utile per valutare la riuscita del processo di binding.

Si procede con diversi lavaggi della resina, i quali permettono di eliminare le proteine contaminanti lasciando ancorata alla resina unicamente la proteina di interesse. La formulazione dei vari buffer di lavaggio può subire una variazione durante le varie fasi sperimentali in base alle varie necessità. Generalmente i lavaggi vengono condotti con l'utilizzo di tre WASH BUFFER e l'operazione viene condotta a 4°C.

Per valutare l'andamento del processo purificativo, durante i vari step di lavaggio vengono prelevate delle aliquote di flow through che vengono lette

spettrofotometricamente a $\lambda = 280$ nm, lunghezza d'onda ideale per leggere il quantitativo proteico presente nel campione; inoltre le alcune di queste aliquote vengono utilizzate per la valutazione del processo purificativo, generalmente quelle che presentano valori di assorbanza più rilevanti e significativi.

Il primo lavaggio è quello che permette di eliminare i contaminanti legati in maniera piuttosto blanda alla resina e lo si conduce fino ad ottenere un valore di assorbanza dell'ultima aliquota più prossima allo 0 possibile.

Il volume di wash preparato varia in base alla quantità di resina utilizzata e in base alle necessità di lavaggio.

Composizione WASH 1:

25 mM HEPES pH 7.8 (da soluzione 1M)
300 mM NaCl (da soluzione 5M)
0.1 mM TCEP (da soluzione 0.5 M)
H ₂ O di 2° livello fino a volume

Raggiunto il valore di assorbanza richiesto , al termine del primo lavaggio si procede con il secondo lavaggio, dove viene utilizzata la soluzione WASH 2.

Composizione WASH 2:

25 mM HEPES pH 7.8 (da soluzione 1M)
500 mM NaCl (da soluzione 5M)
0.1 mM TCEP (da soluzione 0.5 M)
H ₂ O di 2° livello fino a volume

Come è possibile notare, le componenti dei due WASH sono le stesse: è infatti presente la soluzione tampone HEPES, largamente utilizzata in laboratorio, che ha un potere tamponante a pH fisiologico; TCEP è un agente riducente idrofilico e molto resistente all'ossidazione, necessario per dissolvere i ponti disolfuro proteici rendendo il campione idoneo a processi elettroforetici; la presenza di sale è necessaria per condurre il *salting out*. Questa procedura permette di separare le proteine dal solvente in cui sono poste mediante la precipitazione di esse indotta dall'elevata concentrazione salina: infatti, i gruppi idrofobici della proteina a contatto con un solvente acquoso permettono la formazione di una bolla di solvatazione, che impedisce alla proteina di compiere altri generi di interazione. Aumentando la concentrazione salina della soluzione, l'acqua viene allontanata dalla

proteina per legarsi alle molecole di NaCl, permettendo la precipitazione proteica.

La concentrazione di sale presente nei due WASH citati varia dal primo al secondo lavaggio, in maniera tale da eliminare gradualmente i contaminanti.

Anche in questo caso si continua con il lavaggio fino ad ottenere letture spettrofotometriche uguali a 0.

Si procede quindi con l'ultimo lavaggio in cui viene impiegato il WASH 3.

Composizione WASH 3:

25 mM HEPES pH 7.8 (da soluzione 1M)
500 mM NaCl (da soluzione 5M)
0.1 mM TCEP (da soluzione 0.5 M)
20 mM imidazolo (da soluzione 2M)
H ₂ O di 2° livello fino a volume

Nella composizione di questo ultimo WASH è presente una piccola concentrazione di imidazolo, molecola strutturalmente simile all'istidina che permette il legame delle proteine alla resina Ni²⁺. In questo caso, viene utilizzata per allontanare impurezze legate alla possibilità che altre proteine batteriche presenti nel lisato abbiano interagito con la resina.

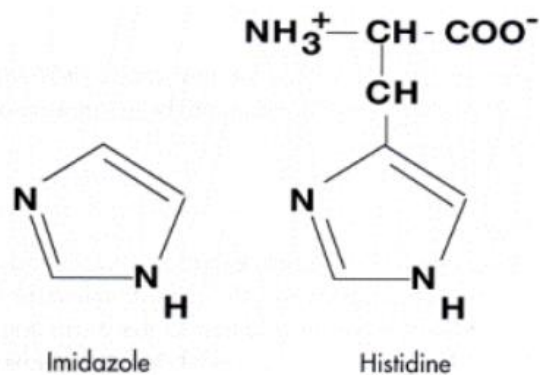


FIGURA 10. Confronto tra la struttura molecolare dell'imidazolo e dell'istidina.

Raggiunto il grado di purezza desiderato, si procede con la fase di eluizione, durante la quale CXCL12 γ , unica proteina ancora legata, viene staccata dalla resina. Si lavora attaccando l'interazione tra le istidine proteiche e gli ioni metallici della resina per mezzo di una alta concentrazione di imidazolo presente nell'ELUTION BUFFER.

Composizione ELUTION BUFFER:

25 mM HEPES pH 7.8 (da soluzione 1M)
500 mM NaCl (da soluzione 5M)
0.1 mM TCEP (da soluzione 0.5 M)

300 mM imidazolo (da soluzione 2M)

H ₂ O di 2° livello fino a volume
--

Al termine di questo step, CXCL12 γ sarà presente nel flow through, che verrà centrifugato e dializzato successivamente.

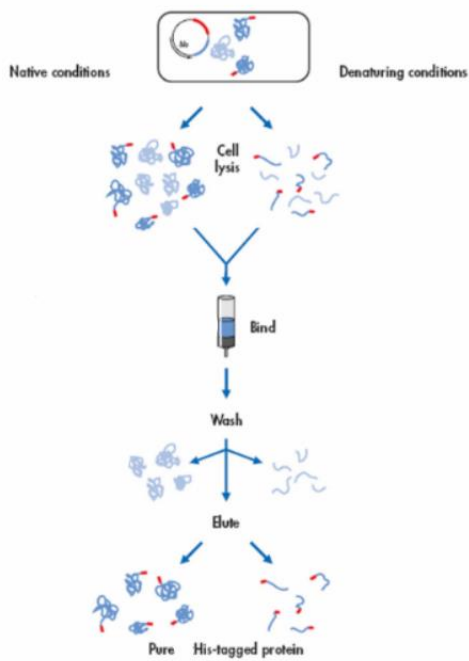


FIGURA 11. Schema riassuntivo di una purificazione con cromatografia ad affinità Ni²⁺.

Concentrazione della proteina CXCL12 γ

Attraverso la concentrazione del campione poniamo la proteina in condizioni più vicine a quelle fisiologiche, e di conseguenza si limita la possibile denaturazione, inattivazione e instabilità di CXCL12 γ .

A tale scopo vengono utilizzati concentratori Amicon, i quali sono muniti di una membrana di cellulosa rigenerata posta verticalmente, con un cut-off di 30 kDa, ideale per la concentrazione della proteina di interesse che, a causa della fusione con MBP, raggiunge un peso molecolare di circa 50 kDa. Contemporaneamente alla concentrazione, è possibile condurre anche uno scambio di tampone eliminando le componenti utilizzate nella purificazione e nell'eluizione, quindi imidazolo e NaCl, molecole che invece hanno possibilità di muoversi attraverso la membrana e, quindi, essere allontanate.

Dialisi della proteina CXCL12 γ

La dialisi è una tecnica che permette di separare fisicamente le componenti di una soluzione grazie all'utilizzo di una membrana semipermeabile, la quale permette il passaggio di molecole di dimensioni più piccole della grandezza dei pori che possiede. Si fruttava il principio dell'osmosi, secondo cui una molecola passa da un versante all'altro della membrana

dalla regione a più alta a quella a più bassa concentrazione, fino a quando da entrambe le parti è presente nella medesima quantità di sostanza.

Le proteine, a seguito della loro concentrazione, sono poste in un tubo da dialisi con una permeabilità di cut-off pari a 10 kDa. Il tubo, chiuso ad entrambe le estremità, viene posto in un becker contenente una soluzione costituita da 25 mM HEPES pH 7.8 e 150 mM di NaCl. Il sistema viene lasciato in incubazione over night a 4°C in agitazione.

Questa tecnica è stata a volte associata al processo di concentrazione precedentemente descritto.

Valutazione dei risultati mediante Elettroforesi SDS-PAGE

L'elettroforesi SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) sfrutta le caratteristiche denaturanti dell'SDS per permettere l'analisi di estratti proteici mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Il sodio dodecil fosfato è in grado di eliminare l'effetto dovuto alla differenza di carica e forma delle proteine, separandole solamente in base al loro peso molecolare.

Il gel è costituito da due parti, differenti nella concentrazione di varie componenti: lo stacking gel presenta una quantità di acrilammide inferiore

ed è la componente che permette la concentrazione dei campioni caricati nei singoli pozzetti in maniera tale che la migrazione di ognuno di essi cominci contemporaneamente.; il running gel (o resolving gel) presenta una quantità di acrilammide maggiore ed è la parte in cui avviene la separazione delle componenti proteiche vera e propria. Il principio di separazione è lo stesso di qualsiasi genere di elettroforesi.

La concentrazione di acrilammide nello stacking e nel running varia in base alla grandezza della proteina di interesse, in quanto influenza la porosità del gel stesso.

Per CXCL12γ i gel hanno la seguente composizione (gel 18 well):

	RUNNING		STAKING
	12%		4%
H ₂ O	3.4 ml	H ₂ O	3 ml
Acrilammide 30%	4 ml	Acrilammide 30%	700 µl
Tris HCl pH 8.8	2.5 ml	Tris HCl pH 8.8	1.25 ml
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

APS 10%	50 μ l	APS 10%	50 μ l
---------	------------	---------	------------

I campioni da caricare sul gel vengono uniti a Sample Buffer 2x (soluzione denaturante) e posti a 100°C per 10 minuti in bagno.

A seguito della corsa elettroforetica, il gel viene colorato mediante Coomassie Brilliant Blue, colorante a base di trifenilmetano che colora le proteine grazie ad una interazione di tipo Van der Waals tra la molecola colorante e i gruppi amminici della proteina. La colorazione avviene in circa 30-40 minuti, a seguito si procede con una decolorazione; infine la visualizzazione del gel avviene tramite l'utilizzo del trans-illuminatore Chemidoc, che permette di condurre anche una foto al gel.

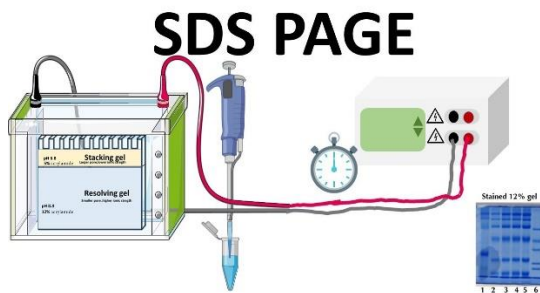


FIGURA 12. Schema rappresentativo dell'elettroforesi SDS-PAGE.

RISULTATI

Questo lavoro di tesi si inserisce in un progetto che prevede la produzione delle 7 isoforme della chemochina CXCL12 umana. Dopo la fase iniziale di clonaggio e caratterizzazione in piccola scala, la produzione prevede lo scale-up a 500ml di coltura che è stato necessario ottimizzare per ciascuna isoforma. In particolare, l'obiettivo di questo lavoro di tesi consiste nella messa a punto di un protocollo per la produzione di CXCL12- γ .

Le diverse isoforme differiscono nella porzione C-terminale (C-term) della proteina e manifestano la loro attività biologica solo se le estremità N-terminali (N-term) sono adeguatamente processate; negli eucarioti vengono prodotte con un peptide segnale che durante la maturazione viene perso, evidenziato in rosso nell'isoforma γ in alto nello schema 1, in basso sono mostrate le isoforme allineate con Clustal O (1.2.4)

Queste citochine con peso molecolare compreso tra 8-14 KDa. non sono glicosilate e non richiedono sistemi eucariotici per la loro produzione; nonostante ciò in letteratura esistono pochi esempi della loro produzione in E. Coli, prevalentemente riguardanti le isoforme α e β di origine murina alle quali di recente si è aggiunta γ

La loro produzione è stata ottenuta attraverso l'estrazione e successiva rinaturazione della proteina ricombinante dai corpi d'inclusione e in molti casi è stata necessaria una modifica chimica della proteina ricombinante per eliminare la metionina iniziale e garantirne l'attività biologica.

Isoforma γ :

MNAKVVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV
ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKGRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQKRKN

Isoforma-7	KPVLSYRCPCRFFESHYCTCLIRVSFHGATPLT-----QGSWVLY	41
Isoforma- θ	KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE	60
Isoforma- γ	KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE	60
Isoforma- β	KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE	60
Isoforma- α	KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE	60
Isoforma- δ	KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE	60
Isoforma- ϵ	KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE ***** . . :: ** : .*:	60
Isoforma-7	SLSCAGGET-----GLREPGPMVSPRVESHQEGRL-----GVPGPVNLG	80
Isoforma- θ	YLEKALNKIWL YGNAETSR-----	79
Isoforma- γ	YLEKALNKGRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQKR-KN-----	98
Isoforma- β	YLEKALNKRFKM-----	72
Isoforma- α	YLEKALNK-----	68
Isoforma- δ	YLEKALNNLISAAPAGKRVIAGARALHPSPPRACPTARALCEIRLWPPPEWSWSPGDV-	119
Isoforma- ϵ	YLEKALNNC-----	69
	*. * .:	

SCHEMA 1

Nell'affrontare la produzione di queste citochine in *E. coli* occorre prendere in considerazione la sequenze codificanti a valle del peptide segnale ed è stato necessario valutare attentamente i vettori da utilizzare.

In generale per la produzione di proteine ricombinanti si usano dei TAG (epitopi) per facilitare la loro purificazione e/o renderle più solubili.

L'aggiunta di questi TAG deve essere reversibile, per questo vengono di solito accompagnati da sequenze amminoacidiche che codificano per dei siti di taglio specifici per delle proteasi. I vettori più in uso in questo momento e disponibili nel nostro laboratorio contengono il sito di taglio per la TEV che produrrà frammenti proteici con 1 o più amminoacidi aggiuntivi derivanti dal sito di taglio o aggiunti per favorire l'esposizione del sito di taglio. Solo due proteasi riescono a fare un taglio senza lasciare residui aggiuntivi (se poste in posizione N-term): il fattore Xa e l'enterochinasi bovina (EK). La seconda è di gran lunga più utilizzata per diverse ragioni pratiche ed economiche. Poiché i vettori a disposizione contengono tutti il sito TEV è necessario sostituire questo sito con il sito di taglio per l'enterochinasi bovina (EK).

Poiché tutte le isoforme possiedono la stessa sequenza all'N-terminale, si poteva usare un solo primer F per tutte le isoforme e specifici primer R per le diverse isoforme. I primi tentativi di amplificazione a partire dal cDNA di colture cellulari pancreatiche non ha prodotto risultati incoraggianti (scarsa amplificazione e spesso bassa specificità, quindi si è deciso di ricorrere a templati sintetici (commissionati alla Genescript) inseriti in generici vettori di clonaggio. Con i plasmidi specifici l'amplificazione dei frammenti corrispondenti ad ogni singola isoforma, contenenti le estremità

adatte al clonaggio LIC, sono state ottenute con il protocollo descritto nei Materiali e Metodi. L'amplificazione è stata ripetuta per ottenere quantità sufficienti di inserto da purificare e sottoporre a trattamento LIC. I prodotti dell'amplificazione mostrano pesi molecolari coerenti con quelli attesi (289 bp per α 301 bp per β , 379 per γ , 442 bp per δ , 331bp per iso-7 , 322 bp per θ , 292 bp per ϵ).

Amplificazione

Per ogni campione la mix è stata ottenuta con il DNA plasmidico contenente i singoli geni sintetici (DNA α , DNA β , DNA γ , DNA δ , DNA iso 7, DNA θ , DNA ϵ) diluito 1000 volte.

L'amplificazione delle isoforme di CXCL12 è stata condotta con l'utilizzo dell'enzima ACCURA™ High-Fidelity Polymerase, modificando leggermente il protocollo fornito dall'azienda produttrice adattandolo al meglio alle correnti necessità.

I campioni corrispondenti alle varie isoforme sono stati preparati nella medesima maniera, partendo da una MIX di PCR identica per tutti.

La MIX di PCR per l'amplificazione è stata prodotta aggiungendo 2X HF reaction buffer, dNTPs (2.5 mM each), Forward+reverse primer (5 μ M), ACCURA 2 U/ μ l, DNA 1/1000, H₂O ambion fino a volume. Uno dei due primer usati per l'amplificazione è identico per tutte le isoforme, il secondo è specifico per ognuna di esse (come descritto nei M.M.)

La PCR è stata condotta per 30 cicli con: Denaturazione iniziale 94°C per 1 minuto, denaturazione 94°C per 15 secondi, annealing 60°C per 15 secondi, estensione 72°C per 1 minuto, estensione finale 72°C per 10 minuti.

L'amplificazione è stata condotta in plate da PCR in duplice copia per ogni isoforma. L'analisi dei risultati viene svolta mediante elettroforesi su gel d'agarosio all' 2% (50 ml TBE 1X+0.75 g agarosio+3 μ l Cybr Safe) utilizzando un pettine da 15 pozzetti.

I campioni sono stati preparati aggiungendo 1 μ l di Loading buffer 6X in 5 μ l di ciascun campione. A destra St DNA GeneRuler 1Kb (Fig.1).

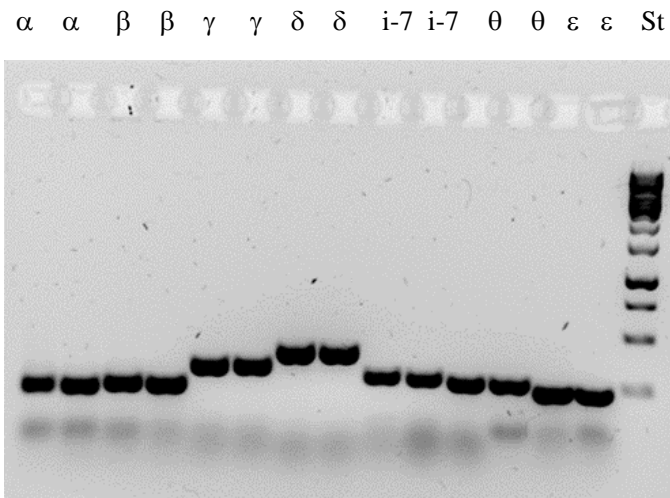


FIGURA 1. Prodotti di amplificazione delle sette isoforme di hCXCL12

Tutti i campioni, compreso CXCL12 γ sono stati amplificati correttamente. Per recuperare totalmente i prodotti di amplificazione, tutto DNA prodotto è stato caricato in un gel d'agarosio ed estratto mediante l'utilizzo del Kip Qiagen PCR Clean-Up. Al termine dell'estrazione dal gel, è stata condotta una quantificazione al NanoDrop, che ha confermato una buona amplificazione (con valori dei campioni nel seguente range $A_{260}/A_{280}=1.85$, $A_{260}/A_{280}= 1,9$).

Clonaggio LIC

Terminata la fase di amplificazione, il gene codificante CXCL12 γ è stato inserito nei vettori di espressione p7-EK e p9-EK mediante clonaggio LIC. Come già detto in precedenza, la produzione vera e propria della proteina di interesse è avvenuta utilizzando il secondo vettore citato, in quanto la presenza della proteina di fusione Maltose Binding Protein ha aumentato la solubilità di CXCL12 γ , facilitando il processo di purificazione.

Per prima cosa è stato preparato l'inserto, in maniera tale che esso presenti le estremità adatte a questo tipo di clonaggio: per fare questo, il gene codificante la proteina di interesse è stato modificato in PCR mediante l'utilizzo della T4 Polimerasi NEB in presenza di dATP per dare inizio all'attività esonucleasica dell'enzima.

L'enzima è stato diluito aggiungendo ad 1 μ l di T4 polimerasi e 7 μ l di NEB buffer 1x. Successivamente è stata preparata la MIX di reazione lavorando in ghiaccio per evitare una eventuale alterazione del DNA.

Per il clonaggio di CXCL12 γ l'inserto è stato preparato con DNA (circa 200 ng) NEB buffer 5x, dATP (25 mM), T4 polimerasi NEB (diluita 1/8) ed acqua Ambion fino a raggiungere un volume di 10 μ l.

Il campione viene incubato a 22°C per 40 minuti, mentre l'inattivazione dell'enzima avviene a 75°C per 20 minuti. Contemporaneamente viene scongelato il vettore (conservato a -20°C).

10 minuti prima della fine dell'inattivazione, viene aggiunto il vettore LIC in PCR, che di conseguenza sarà sottoposto ad una incubazione a 75°C per 10 minuti. Successivamente si è proceduto con un rapido spin down del campione e un veloce trasferimento di 2 µl della soluzione precedente in eppendorf da PCR.

L'annealing è stato condotto temperatura ambiente per 30 minuti, al termine dei quali sono stati aggiunti 2 µl di EDTA 25mM. Il campione viene lasciato per ulteriori 5 minuti a temperatura ambiente, dopo di che si aggiungono 4 µl di acqua Ambion per portare il volume della singola frazione a 10 µl.

Trasformazione per il clonaggio

La trasformazione delle cellule competenti GC-5 avviene in ghiaccio (4°C) e con l'ausilio di strumentazione fredda.

Vengono utilizzati 50 µl di cellule competenti scongelate in ghiaccio, ponendole in eppendorf da 1.5 ml. In esse vengono aggiunti 2 µl di MIX LIC e si incubano le cellule per 30 minuti a 4°C.

Si procede con la fase di Heat-shock a 42°C per 45 secondi, operazione condotta in bagnetto, ossia immergendo la provetta contenente il campione in acqua calda.

Il campione viene ulteriormente incubato in ghiaccio per 2 minuti e, sempre in ghiaccio, in esso vengono aggiunti 250 µl di SOC, per permettere il recupero dopo lo shock termico mediante un'incubazione a 37°C per almeno 1 ora in agitazione a 400 rpm. Le cellule vengono successivamente seminate su piastre contenenti LB+ampicillina (150 µl di cellule trasformate per piastra) ed incubate over-night a 37°C.

PCR colony

Per ogni isoforma sono state ottenute numerose colonie, di cui 3 colonie cellulari per ciascuna isoforma sono state prelevate dalla piastra, strisciate in una nuova piastra a settori per il mantenimento e inoculate in 50 µl di H₂O per la PCR Colony. Il processo viene condotto lisando le cellule per congelamento e scongelamento e il lisato ottenuto viene direttamente utilizzato come template per il processo di amplificazione con l'ausilio del kit della Green-Taq e relativo protocollo (come descritto nei MM). I risultati

sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio, comparandoli con uno standard di peso molecolare.

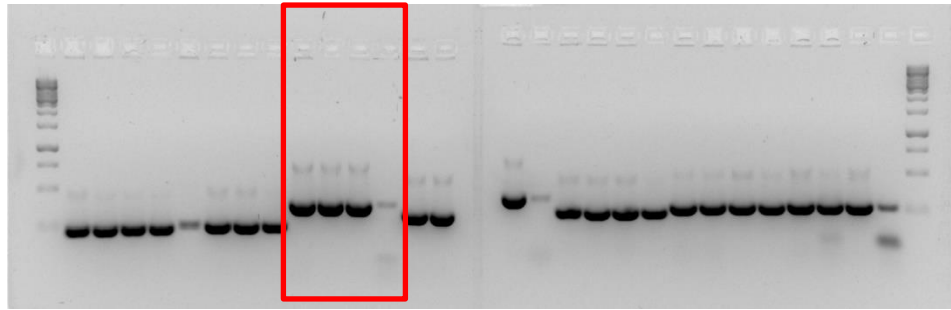


FIGURA 2. Prodotti della PCR colony.

Nella foto del gel d'agarosio al 2% sono evidenziate le bande corrispondenti agli inserti delle diverse isoforme di CXCL12. In rosso sono evidenziati i tre cloni corrispondenti a CXCL12 γ , nel dettaglio da sinistra: CXCL12 γ -1, CXCL12 γ -2, CXCL12 γ -3 e CXCL12 γ controllo. DNA

Dalla piastra di mantenimento dei cloni, sono state prelevate le cellule corrispondenti ai cloni positivi CXCL12 γ -1, CXCL12 γ -2, CXCL12 γ -3 per inoculare 5 ml di LB+ amp per l'espansione dei cloni. Dopo l'incubazione a 37°C per tutta la notte, le colture sono state centrifugate per recuperare le cellule e da queste è stato estratto il plasmide ricombinante con l'utilizzo del QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Al termine della procedura, i campioni sono stati quantizzati al nanodrop, ottenendo i seguenti risultati:

CAMPIONE	C(ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
CXCL12γ -1	31	2.05	1.85
CXCL12γ -2	32	2.14	1.89
CXCL12γ -3	29.5	1.91	1.83

Circa 600 ng di DNA purificato dei cloni 2 e 3 sono stati essiccati ed inviati alla BMR Genomics per il sequenziamento, utilizzando i primer generici per gli elementi di T7 presenti nel vettore.

Entrambi i cloni hanno mostrato contenere la sequenza d'interesse, per ragioni pratiche abbiamo scelto di utilizzare per la produzione della proteina CXC12 γ il clone 3.

La sequenza ottenuta dal clonaggio LIC di CXCL12γ è conforme alla sequenza dell'NCBI: NM_001178134.1 GI:296011022

AGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGA
AAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAATTCTC
AACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGA
ACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGA
TTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGGGGGCGCAGA
GAAGAAAAAGTGGGGAAAAAAGAAAAGATAGGAAAAAAGAA

GCGACAGAAGAAGAGAAAAGGCTGCCAGAAAAGGAAAAACT

AG

Purificazione in piccola scala

Per la produzione della proteina ricombinante 2 μ l del plasmide p9-EK-CXCL12 γ -3 (circa 6 ng) sono stati usati per trasformare ceppi di E.coli adatti all'espressione: BL21-pLys, C41 e Rosetta-pLys, tutti contenenti la cassetta (DE3) che permette l'induzione della RNA polimerasi di T7 sotto il controllo di p-Lac e dunque inducibile con IPTG.

L'esperimento di induzione in piccola scala è stato ripetuto con i cloni prescelti. Dopo aver scongelato la piastra contenente i pellet delle cellule dopo l'induzione, vengono aggiunti 0,5 ml di soluzione di lisi, Buffer A, e il pellet viene risospeso in agitazione a 4 °C per 15 minuti e sonicato per 3 volte. I lisati vengono trasferiti in una piastra filtrate, sigillata con il tappetino di silicone e vengono aggiunti 50 μ l di resina Ni-IDA risospesa nella soluzione di equilibratura, in ogni pozzetto utilizzato. Dopo una notte di incubazione a 4°C in agitazione a 600 rpm, il tappetino viene rimosso e la piastra filtrante viene posta

su una piastra di raccolta ed entrambe centrifugate a 500 x g per 2 minuti. Il materiale che attraversa il filtro rappresenta quello che non si è legato alla resina. Si procede con un lavaggio con 1 mL di tampone di equilibratura, 3 lavaggi con 1 ml di una soluzione di equilibratura addizionati con 75 mM Imidazolo. Infine, viene fatta l'eluizione con 35 μ l della soluzione di eluizione contenente 300 mM Imidazolo. Gli eluati (15 μ l) sono stati analizzati mediante elettroforesi in SDS-PAGE al 12%. L'immagine del gel ottenuto è mostrata nella Fig. 3

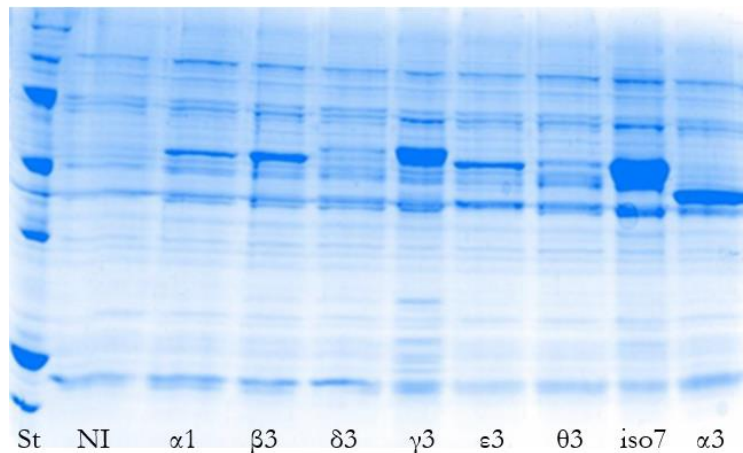


FIGURA 3. SDS-PAGE test di purificazione in piccola scala:

gel SDS-PAGE al 12% Nei pozzetti sono caricati 15 μ L di eluato della cromatografia di affinità su Ni-IDA. Standard di peso molecolare utilizzato: BIO RAD Precision Plus Protein™.

Purificazione in media scala di CXCL12 γ

In generale, per la produzione della proteina ricombinante in media scala, 2 μ l del plasmide p9-EK-CXCL12 γ -3 (circa 6 ng) sono stati usati per trasformare 20 μ l di cellule competenti dei diversi ceppi. Dopo la trasformazione ed il recupero della vitalità, 220 μ l di cellule (in SOC) vengono addizionate a 5 ml di terreno liquido LB+amp+clo, per la preparazione del pre-inoculo a 37°C per tutta la notte.

Il pre-inoculo così prodotto, il giorno dopo viene utilizzato per la crescita in media scala: raggiunta una lettura OD di circa 0.6 (λ =600nm), si procede con l'induzione mediante l'aggiunta di 100 μ l di IPTG, che raggiunge una concentrazione finale di 0.2mM. Si procede con un'incubazione a 37°C in agitazione a 250 rpm per 3 ore.

La coltura cellulare viene infine centrifugata a 4000 xg per 20 minuti a 4°C, ottenendo un pellet che viene congelato a -80°C.

Il primo esperimento è stato condotto trasformando 2 aliquote di cellule BL21-pLys per la preparazione di due pre-inoculi che il giorno successivo sono stati inoculati in 500 ml di LB+amp +clo. Prima e dopo l'induzione dalle colture cellulari vengono fatti dei prelievi da 1 ml per controllare se

l'induzione ha prodotto l'espressione della proteina desiderata. Sulla base degli O.D. 600nm della coltura, le cellule raccolte dai due prelievi vengono lisate direttamente in un appropriato volume di SDS-Sample buffer, in modo da ottenere dei campioni paragonabili. Nella figura 4(a) viene mostrato un gel di SDS-PAGE al 12% dove sono stati caricati 10 µl di campione lisato, ottenuto dalle aliquote pre e post induzione della coltura #1 e di quella #2. Nella fig.4(b) è mostrata una tabella riassuntiva dei parametri di O.D. 600 per le due colture. L'induzione è stata condotta con 0,3 mM IPTG all'O.D. indicata nella tabella (pre-induzione).

Dopo 3 ore a 37°C in agitazione le colture indotte sono state centrifugate per allontanare il terreno e il pellet cellulare pesato prima del congelamento a -80°C.

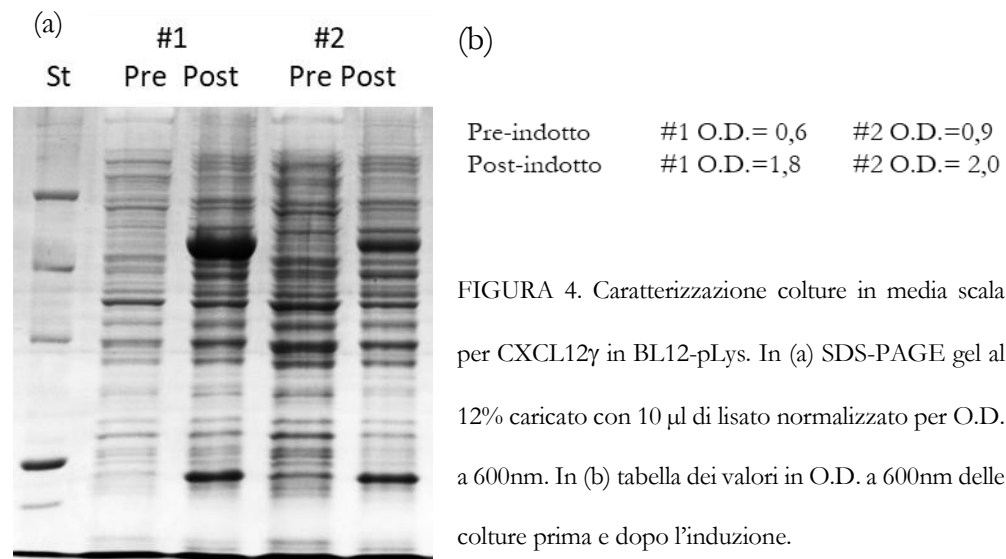


FIGURA 4. Caratterizzazione colture in media scala per CXCL12γ in BL12-pLys. In (a) SDS-PAGE gel al 12% caricato con 10 µl di lisato normalizzato per O.D. a 600nm. In (b) tabella dei valori in O.D. a 600nm delle colture prima e dopo l'induzione.

Il pellet che contiene più proteina ricombinante è quello ottenuto con la preparazione #1 da 1.46g. Poiché in piccola scala il processo di purificazione di questa isoforma era stato molto efficiente, è stato utilizzato il protocollo di purificazione per la media scala in uso al NY-MaSBiC. Il campione è stato scongelato in ghiaccio aggiungendo 7.5 ml di risospensione/lisi (RB) contenente: 50 mM HEPES pH 7.8 (st, 300 mM NaCl, mix di inibitori di proteasi Sigma (1x) TCEP 0,5 mM.

Il processo è stato condotto vortexando il campione ed aggiungendo RB poco alla volta.

A seguito di questo primo step di lisi cellulare, è stata condotta la sonicazione del campione (AMP 60%). Il lisato totale LT ottenuto ha un volume di 10 ml totali ed è risultato essere piuttosto fluido, quindi idoneo ai passaggi successivi. Sono state prelevate due aliquote di LT da 50 µl che, centrifugate a 6800 x g hanno originato Ls (surnatante) ed Lp (pellet), a loro volta utilizzate per verificare la solubilità della proteina ricombinante.

Il campione sonicato è stato centrifugato a 15000 xg per 30 minuti a 4°C, perché si tratta di una proteina citosolica. Sono state prelevate quindi due aliquote da 50 µl di surnatante, denominato lisato chiarificato LC, mentre il pellet è stato congelato a -80°C.

Il lisato chiarificato è stato lasciato in incubazione over night a 4°C in rotazione con la resina, facendo avvenire il processo di *binding*. In particolare, al lisato chiarificato sono stati aggiunti 2 ml di resina precedentemente equilibrata con una soluzione di 50 mM HEPES e 300 mM NaCl.

A seguito di tale step, il campione è stato versato in colonna da cromatografia e il materiale non legato (UN) è stato raccolto in un'unica falcon. Una aliquota di questa frazione in elettroforesi è utile per capire se il binding è avvenuto o meno: in caso affermativo, CXCL12 γ è assente nell'UB.

Purificazione con cromatografia ad affinità

I lavaggi per eliminare i contaminanti legati alla resina sono stati condotti a 4°C con l'ausilio di 3 soluzioni WASH presentanti concentrazioni differenti di sale, fattore che aumenta gradualmente il distacco di proteine contaminanti eventualmente ancoratesi alla resina. Il primo lavaggio è stato condotto con il WASH 1 costituito da 25 mM HEPES pH 7.8 , 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP e H₂O di secondo livello fino a volume.

Aggiungendo 10 ml di WASH1 per volta, è stata lavata la resina a cui è legata alla proteina di interesse, prelevando aliquote da 2 ml. Le frazioni sono state lette allo spettrofotometro a $\lambda = 280$ nm con cuvetta in quarzo. La lettura

dell'aliquota 25 è stata di 0.0486, valore molto prossimo allo zero, che sancisce il passaggio al secondo step di lavaggio.

Il WASH 2 è caratterizzato dal possedere una più alta concentrazione salina, pari a 500 mM NaCl.

Durante la lettura delle frazioni recuperate nella seconda fase di lavaggio, sono stati individuati dei picchi di assorbanza che si riferiscono alle proteine contaminanti staccatesi dalla resina. Inoltre, se la raccolta delle frazioni viene bloccata chiudendo la colonnina da cromatografia, si ottengono delle letture con valori molto alti, dovuti ad un deposito del materiale in fase di eluizione sulla resina stessa. Valori di assorbanza rilevanti nelle frazioni di WASH 2 sono stati:

- $W_{26}=0.4808$
- $W_{29}= 0.357$
- $W_{210}=0.228$

Si procede con il terzo step di lavaggio con l'utilizzo del WASH 3, il quale è caratterizzato dal presentare, oltre a 500 mM NaCl, anche 20 mM imidazolo, molecola che permette di staccare dalla resina anche contaminanti che vi si sono legate in maniera debole ma comunque più forte rispetto a quelle che

si sono staccate nei lavaggi precedenti, ottenendo così un grado di purezza della proteina di interesse ancora più elevato.

I valori $W_{32} = 1.12$, $W_{33} = 2.17$ e $W_{34} = 1.09$ indicano che la strategia di aggiungere imidazolo in questo WASH ha permesso di ottenere una purificazione decisamente migliore, con picchi di assorbanza che indicano il distacco di materiale contaminante dalla resina.

Durante la fase di eluizione, le aliquote prelevate sono di 1 ml, volume inferiore rispetto a quelle dei lavaggi in quanto questa è la fase più delicata del processo purificativo, quindi necessita di un maggiore controllo.

L'ELUTION BUFFER EB è stato prodotto con 25 mM HEPES pH 7.8 , 500 mM NaCl, 300 mM imidazolo , 0.1 mM TCEP e H₂O fino a volume.

I valori di assorbanza più rilevanti sono stati $E_3 = 2.056$ ed $E_4 = 1.945$.

Tali valori indicano le frazioni in cui è stata maggiormente eluita CXCL12 γ .

Le aliquote sono state poi unite, formando il pool di eluizione.

Concentrazione e dialisi per ultrafiltrazione del campione CXCL12 γ

La concentrazione e la dializzazione del campione è stata condotta con l'utilizzo del concentratore AMCON da 15 ml attraverso l'utilizzo di un

BUFFER DI SCAMBIO, costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP e H₂O fino a volume.

La soluzione è stata aggiunta al campione presente nel concentratore 15 ml per volta; ad ogni aggiunta di buffer di scambio si conduce una centrifugazione a 3000 xg per 10 minuti. Ad ogni step di concentrazione e diluizione si ottiene una concentrazione di imidazolo gradualmente più bassa.

Raggiunta una concentrazione di imidazolo < di 1 mM, il campione è stato prelevato dal concentratore (V finale = 5ml) e posto in una falcon, in cui è stato aggiunto 25 mM HEPES pH 7.8 e 5% di glicerolo.

A seguito della cromatografia, sono stati selezionati i campioni più rappresentativi del processo di purificazione, i quali sono stati addizionati con un volume uguale SDS-SB 2x. In particolare i campioni L, Lt, Lts, Ltp, UN e W1.2 sono stati diluiti 1/10 con acqua di secondo livello. Dei campioni selezionati della cromatografia sono stati prelevati 5 µl da caricare su gel, mentre del pool finale dopo concentrazione/ultrafiltrazione sono stati prelevati solo 2,5 µl. I campioni sono stati bolliti a 100°C per 10 minuti, prima del caricamento sul gel (figura 5).

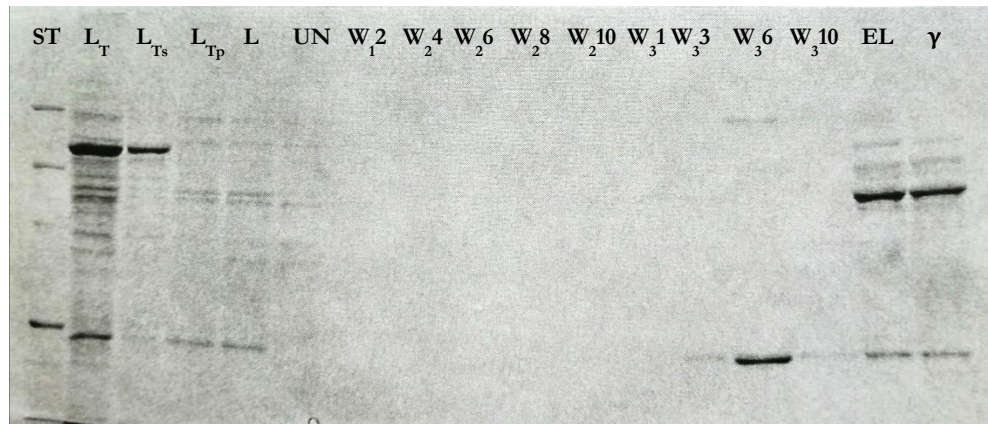


FIGURA 5. Gel da elettroforesi SDS-PAGE per la valutazione del processo purificativo.

Il lisato totale contiene un elevato livello di proteina ricombinante, ma come si osserva nei campioni Ltp e Lts, gran parte della proteina precipita durante la preparazione del lisato chiarificato, confermato anche dal campione prelevato direttamente (L) e non proveniente da un'aliquota. E' ovvio che alla resina di affinità non si sia legato quasi nulla anche se delle tracce di CXCL12 γ sono visibili nel pool ottenuto da questa cromatografia. Dunque, contrariamente a quanto atteso CXCL12 γ precipita utilizzando la centrifugazione a 15000 x g. Considerato il dato ottenuto nell'espressione in piccola scala (dove si usa una centrifugazione a 6800xg per ottenere il lisato chiarificato) e, prima di poter affermare che la proteina produce dei corpi

d'inclusione, è stato verificato se abbassando la velocità di centrifugazione o diluendo il campione si potesse modificarne la solubilità.

Traendo tali conclusioni, si è proceduto con una modifica del protocollo in alcuni punti. In primis, è stato aumentato il volume della soluzione di lisi.

Il pellet utilizzato in questo caso deriva dalle cellule C41 trasformate sempre con il clone 3 dell' isoforma gamma ed indotte con IPTG (0,2 mM). La verifica dell'induzione è mostrata nel gel della Figura 6. Nel gel SDS-PAGE al 12% sono stati caricati 10 µl di lisato normalizzato per O.D. a 600nm delle colture prima (pre) e dopo (post) l' induzione.

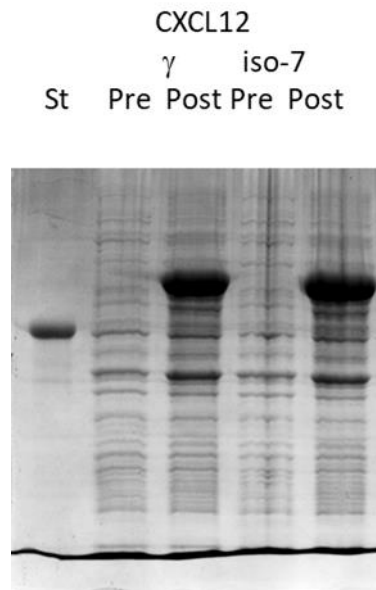


FIGURA 6. Verifica dell'induzione nelle cellule C41

Il pellet da 1,48 gr è stato risospeso in 15 ml di soluzione RB con l'ausilio di un votex; si è proceduto con la sonicazione (AMP 60%). In questo caso, la velocità di centrifugazione del campione sonicato è stata ridotta a 4000 xg, così da scongiurare la precipitazione nel pellet della proteina CXCL12 γ , come era stato osservato nella purificazione precedentemente descritta.

Il surnatante ottenuto dalla centrifugazione sono stati aggiunti 2 ml di resina precedentemente equilibrata in 50 mM HEPES e 300 mM NaCl. La fase di binding con la resina è stata condotta over night a 4°C in rotazione.

Si è proseguito recuperando in una falcon l'UB e ponendo la resina legata al campione in una colonna da cromatografia. In questo caso si è proceduto con solamente due fasi di lavaggio prima dell'eluizione.

La composizione del WASH 1 costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP e H₂O di secondo livello fino a volume.

I valori di lettura delle aliquote finali a $\lambda = 280$ nm sono state $W_1 23 = 0.185$, $W_1 24 = 0.201$ e $W_1 25 = 0.215$.

Poiché i valori riscontrati sono ancora alti, indice che la purificazione non è ancora ad un livello soddisfacente, si è proseguito con l'utilizzo di ulteriori

100 ml di WASH 1, fino a raggiungere all'aliquota W_1 37 un valore di lettura di 0.134.

Come è possibile notare, il campione risulta difficilmente lavabile con un WASH di questo tipo, per cui si è passati all'utilizzo di una seconda soluzione lavante, il WASH 2 contenente imidazolo, in modo da incentivare il distacco delle proteine contaminanti dalla resina. In questo caso, il WASH 2 è costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazolo, 0.1 mM TCEP e H₂O fino a volume.

I valori di lettura delle aliquote prodotte durante questo lavaggio ($\lambda = 280\text{nm}$) non scendono al di sotto di 0.567, indice del fatto che il processo di lavaggio non riesce ad essere condotto in maniera molto efficiente.

Per salvaguardare l'integrità del campione si è proceduto con l'eluizione, condotta con l'utilizzo di 15 ml di ELUTION BUFFER, costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 500 mM NaCl, 300 mM imidazolo, 0.1 mM TCEP, H₂O fino a volume.

Le letture delle frazioni da 1 ml raccolte sono le seguenti ($\lambda = 280\text{nm}$):

- E1= 0.533
- E2= 2.094

- E3= 2.15
- E4= 1.974
- E5= 1.387
- E6= 1.001
- E7= 0.742
- E8= 0.547
- E9= 0.452
- E10= 0.382

A seguito del processo di eluizione si è condotta concentrazione e dialisi con l'utilizzo di concentratori AMICON da 15 ml, utilizzando la procedura precedentemente descritta, fino ad un volume di 5 ml.

La valutazione del processo di estrazione della proteina dalle cellule e del processo purificativo è stata condotta tramite elettroforesi SDS-PAGE al 12%, nel quale sono stati caricati nel primo gel 5 µl dei lisati Lt, Ltp, Lts e L diluiti 1/5, nel secondo gel 5 µl dei campioni W₁ 1, W₁ 2, W₂3 e E3 diluiti 1/10 e 5 µl dei campioni E8, E pool e γ dializzato non diluiti.

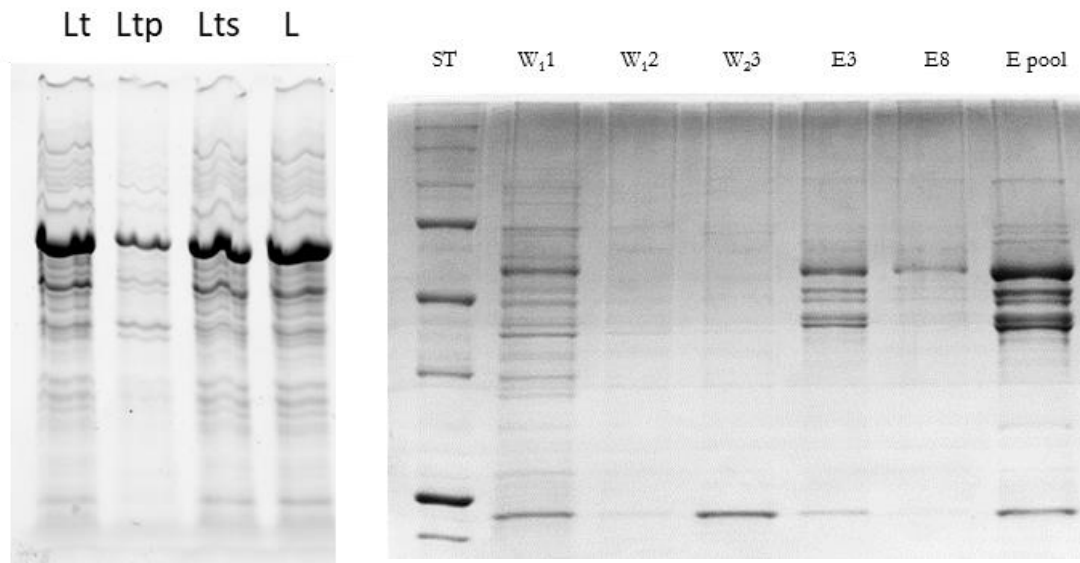


FIGURA 6. Foto dei gel riassuntivi della purificazione. Nel primo è possibile vedere il campione prima della cromatografia, nel secondo il campione durante le fasi di lavaggio ed eluizione.

Come è possibile vedere dall'immagine dei gel, la purificazione non è stata molto efficiente, ma occorre rivalutare nel dettaglio se tutta la proteina presente nel lisato si è legata alla resina. Quindi i campioni corrispondenti al lisato e all'UB sono stati caricati in un gel SDS-PAGE al 12 % insieme a 2 μ l del pool concentrato e ultrafiltrato.

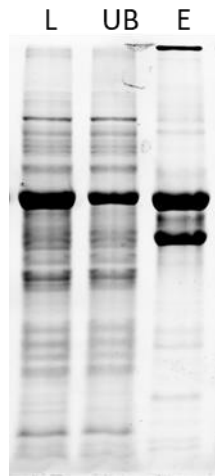


FIGURA 7. Foto del gel SDS-PAGE al 12% di controllo per valutare la percentuale di legame della proteina CXCL12 γ alla resina. Sono presenti Lisato chiarificato (L) il materiale non legato (UB) e 2 μ l del pool dell'affinità dopo concentrazione ed ultrafiltrazione. Ulteriori dettagli nel testo.

Come evidenziato nel gel in figura 7, dove sono stati caricati 1 μ l del litato chiarificato (L) il materiale non legato (UB) e 2 μ l del pool dell'affinità dopo concentrazione ed ultrafiltrazione, apparentemente i principali problemi legati alla purificazione dell'isoforma gamma sono il binding alla resina (solo del 50%) e la presenza di un contaminante compatibile con la forma tronca della His-MBP-EK.

I tentativi di migliorare il binding alla resina sono stati numerosi, tra cui: 1) aumento del volume di resina, 2) diluizione ulteriore del campione, 3)

passaggio dell'UB in una seconda aliquota di resina, 4) utilizzo di detergenti e agenti caotropici non hanno sortito alcun effetto.

Quindi abbiamo utilizzato una matrice Ni-NTA diversa (Sigma) e valutato la solubilità del lisato secondo il seguente schema.

Si è proceduto con un cambio della resina utilizzata, passando alla resina Ni-NTA della SIGMA, presentante un potere di binding inferiore rispetto alla precedente, per cui il volume di resina da utilizzare è stato maggiore, con conseguente allungamento dei tempi di purificazione stessi. Per migliorare il livello di purificazione finale, si è passati inoltre attraverso un lavaggio del pellet prima della sonicazione con la soluzione GTE, costituita da: glucosio 20 mM (necessario per ridurre la possibilità di rotture accidentali della molecola di DNA ed impedisce alle cellule di scoppiare per le variazioni di pressione osmotica), tampone Tris-HCl 25 mM pH 8 ed EDTA 10 mM pH 8 (capace di indebolire la parete cellulare batterica mediante la rimozione di ioni magnesio, indispensabili per preservare la struttura globale dell'involucro cellulare; inoltre inibisce l'attività di enzimi degradativi).

Il pellet con il quale si è lavorato è di 2.54g, il quale è stato risospeso in 15 ml di RESUSPENSION BUFFER incompleto o LYSIS BUFFER

incompleto, costituito da 50 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, TCEP 0.5 mM, 1 mM MgCl₂ ed acqua fino a volume.

Si aggiungono al campione 15 µl di Cocktail di inibitori e si procede con la sonicazione, a seguito della quale si preleva un'aliquota di Lisato Totale LT.

Il lisato totale è stato centrifugato a 4000 xg per 30 minuti a 4°C. Dopo questo passaggio, si procede conducendo delle centrifugazioni seriali, ottenendo ad ogni step pellet e surnatante: questo procedimento viene eseguito per individuare in quale singola frazione è localizzata CXCL12γ. A seguito della centrifugazione del lisato totale LT si ottengono il pellet P1 e il supernatante S; il pellet viene risospeso con 15 ml + 35 µl di PMSF, mentre S1 è stato lasciato in ghiaccio per un'ora. Il PMSF (fenilmetilsolfonil fluoruro), è un inibitore di serine proteasi, cisteine proteasi e acetilcolinesterasi che trova un largo utilizzo nel trattamento di lisati cellulari, dove si lega al sito attivo degli enzimi inattivandoli. In tal modo si prevengono eventuali alterazioni della composizione amminoacidica delle proteine, in particolare di quella di interesse. Sia P1 che S1 sono stati poi centrifugati a 6800 xg per 30 minuti a 4°C, al termine del quale sono stati ottenuti S2 e P2 da S1 ed S3 e P3 da P1.

È possibile riassumere i vari passaggi per la valutazione della solubilità del lisato con il seguente schema:

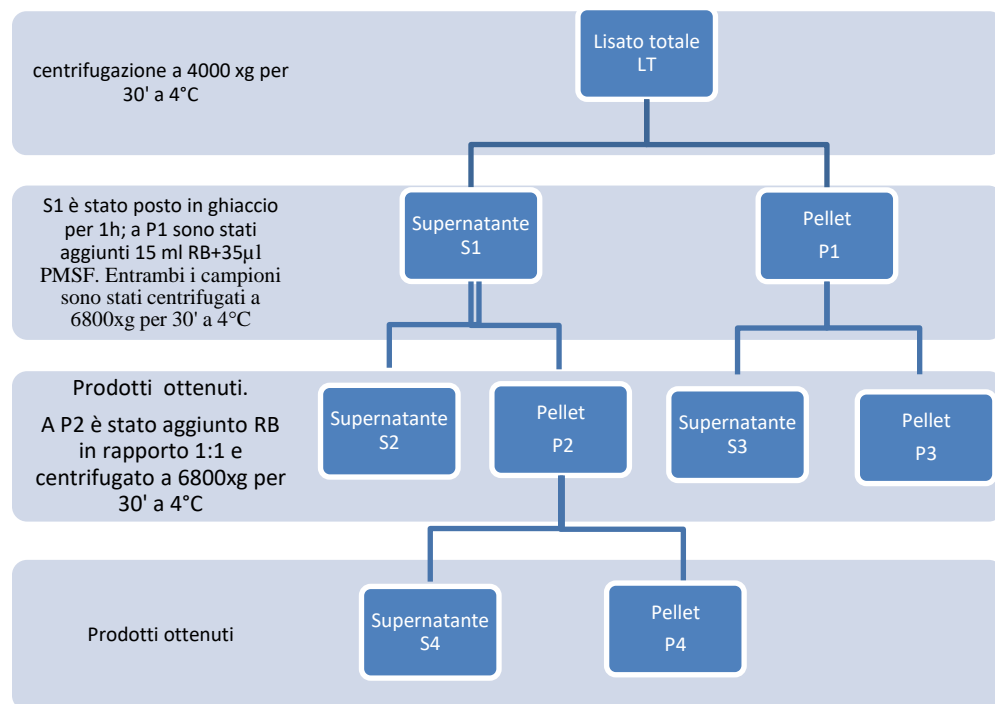


FIGURA 8. Schema riassuntivo per la valutazione della solubilità del lisato del pellet cellulare in cui viene espressa CXCL12γ.

I campioni P1, P2 ed S2 sono stati trattati con 3 µl di benzonasi e 30 µl di lisozima: la benzonasi è un enzima ingegnerizzato estratto da *Serratia marcescens*, con attività nucleasica superiore a qualsiasi altro enzima dello

stesso tipo, capace di ridurre drasticamente la viscosità della soluzione proteica e di rimuovere gli acidi nucleici contaminanti presenti; il lisozima viene invece utilizzato per promuovere una ulteriore lisi delle cellule batteriche grazie alla sua capacità di degradare il peptidoglicano sulla superficie di esse.

A seguire sono stati preparati i campioni per elettroforesi SDS-PAGE, a seguito della quale è possibile individuare in quale frazione prodotta precedentemente è localizzata CXCL12 γ .

Dei campioni P1, LT, S1 ed S2 sono stati caricati 5 μ l del diluito 1/10, di S3 ed S4 sono stati caricati 10 μ l non diluiti, P2 è stato caricato sia in forma diluita 1/10 (5 μ l) che non diluita (5 μ l), infine di P1 sono stati caricati 10 μ l del diluito 1/5.

I campioni sono stati bolliti a 100°C per 10 minuti prima del caricamento.

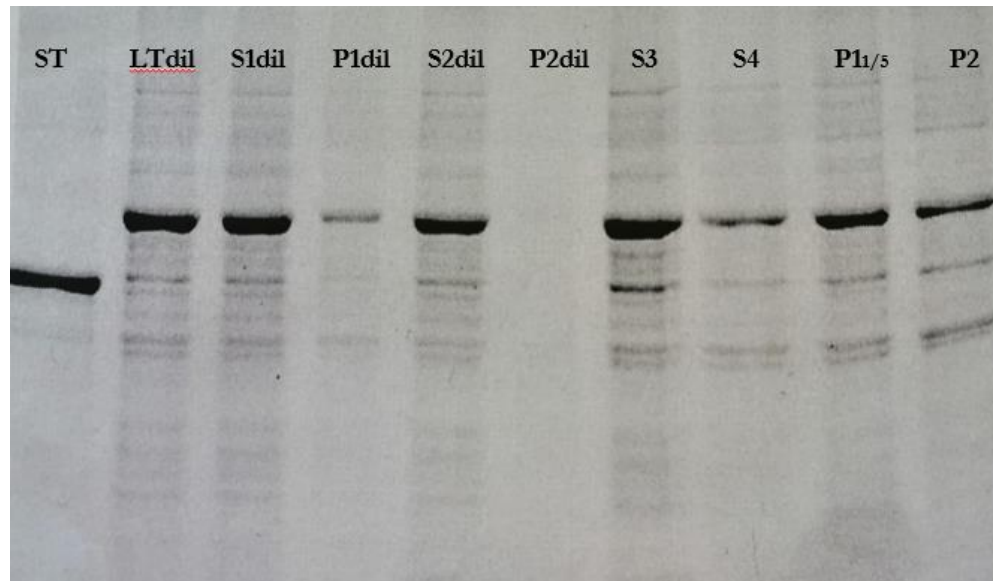


FIGURA 9. Gel di elettroforesi SDS-PAGE per identificare la frazione del campione contenente CXCL12 γ . Come standard in questo caso è stata utilizzata la Maltos Binding Protein MBP.

Analizzando i risultati, si è visto come la proteina CXCL12 γ presenti un'ottima solubilità e sia quasi totalmente presente nelle componenti S. Sono stati uniti S2 ed S3 per il binding in cromatografia d'affinità Ni²⁺.

Sono stati prelevati 10 ml di slurry, corrispondenti a 5 ml di resina SIGMA; la resina è stata riequilibrata utilizzando 20 ml di RIEQUILBRATION BUFFER (50 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl ed H₂O fino a volume). Il binding è stato condotto aggiungendo S2+S3 alla resina, con incubazione over night a 4°C in rotazione.

Il primo lavaggio è stato condotto utilizzando il WASH 1, costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP e 0.1 mM PMSF.

Le letture spettrofotometriche a $\lambda = 280$ nm più rilevanti sono le seguenti:

- $W_{12} = 3.135$
- $W_{14} = 2.683$
- $W_{16} = 2.290$
- $W_{18} = 1.246$
- $W_{110} = 0.926$
- $W_{114} = 0.446$
- $W_{118} = 0.425$
- $W_{122} = 0.431$

Il secondo lavaggio è stato condotto con l'ausilio del WASH 2, costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.05 mM TCEP, 0.1 mM PMSF, 20 mM imidazolo e H₂O fino a volume.

Le letture spettrofotometriche a $\lambda = 280$ nm più rilevanti sono le seguenti:

- $W_{230} = 2.000$
- $W_{234} = 2.345$
- $W_{238} = 1.072$
- $W_{242} = 0.924$
- $W_{246} = 0.873$

- $W_{252} = 0.889$

- $W_{254} = 0.875$

Poiché i valori risultano essere piuttosto simili tra loro, si è passati al lavaggio successivo con WASH 3, per scongiurare il distacco della proteina di interesse dalla resina. Questa soluzione è costituita da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.05 mM TCEP, 0.1 mM PMSF, 40 mM imidazolo ed H₂O fino a volume.

Le letture spettrofotometriche a $\lambda = 280$ nm più rilevanti sono le seguenti:

- $W_{32} = 2.288$

- $W_{36} = 0.436$

- $W_{312} = 0.735$

- $W_{318} = 0.417$

- $W_{324} = 0.280$

In questo esperimento di purificazione è stato condotto un ulteriore lavaggio con l'utilizzo del WASH 4, che varia dal WASH precedente per la presenza di 60 mM imidazolo. Le letture spettrofotometriche a $\lambda = 280$ nm più rilevanti sono le seguenti:

- $W_{430} = 0.529$

- $W_{434} = 0.416$
- $W_{438} = 0.309$
- $W_{444} = 0.215$
- $W_{456} = 0.135$

In questo caso, il lavaggio ha portato a risultati soddisfacenti, per cui si è proceduto con l'eluizione del campione per mezzo di ELUTION BUFFER, costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 500 mM NaCl, 300 mM imidazolo, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM TCEP e H₂O fino a volume.

Dall'analisi delle letture spettrofotometriche a $\lambda = 280$ nm più rilevanti è possibile notare come l'eluizione sia avvenuta con un distacco della maggior parte delle proteine nei primi step di eluizione.

- $E_3 = 1.918$
- $E_4 = 1.918$
- $E_5 = 1.287$
- $E_6 = 0.926$
- $E_7 = 0.656$
- $E_8 = 0.487$
- $E_9 = 0.449$
- $E_{10} = 0.212$

È stato creato il pool di eluizione unendo le aliquote da E2 a E10, il quale presenta un volume di circa 20 ml ed ha una lettura OD= 0.889.

Concentrazione e dialisi sono state effettuate come da prassi.

Le valutazioni finali sono state condotte tramite cromatografia SDS-PAGE al 12% colorato con Comassie, dove sono stati caricati 10 µl dei campioni S2+S3, FT, W₁2, W₂30, W₂34, W₃2 ed Elution pool diluiti 1/10, mentre sono stati caricati 10 µl dei campioni W₁20 e W₃15 non diluiti.

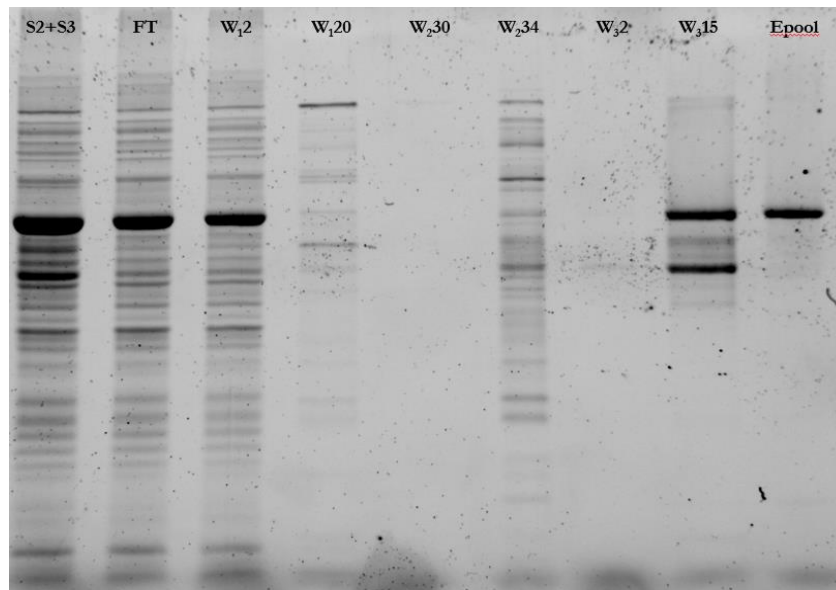


FIGURA 10. Gel SDS-PAGE al 12% riassuntivo della purificazione.

Dal gel è possibile vedere come la purificazione abbia portato ad una buona purificazione ma ad una percentuale di recupero di CXCL12γ ancora da

migliorare, dato che una parte del quantitativo totale della proteina viene persa durante il processo purificativo stesso (infatti il campione S2+S3 presenta la banda corrispondente alla proteina di interesse più spessa rispetto a quella presente nel pool di eluizione).

Sulla base di queste valutazioni, si è cercato di capire durante quale fase venisse persa la proteina, e per fare ciò sono state caricate su un gel SDS-PAGE al 12% le frazioni di alcuni lavaggi W3 e W4 per individuare lo step in cui viene persa CXCL12 γ . Nel dettaglio sono state caricate le frazioni W3.2, W3.5, W3.10, W3.20, W4.30 e W4.40 al massimo del volume.

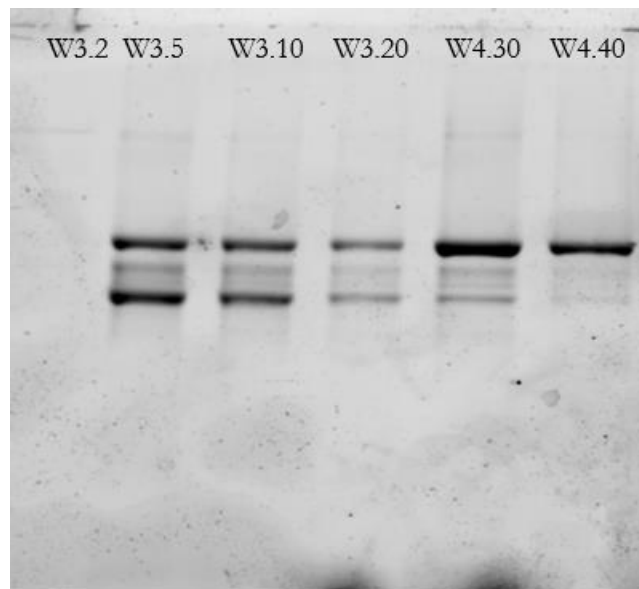


FIGURA 11. Gel SDS-PAGE al 12% con aliquote del lavaggio di CXCL12 γ . Come è possibile vedere, la maggiore perdita di proteina avviene durante il quarto lavaggio con 60 mM imidazolo, già sufficiente a staccare la proteina di interesse.

Si è proceduto svolgendo un'ulteriore purificazione partendo da un pellet costituito da cellule trasformate C41, di 2.17g.

Il pellet è stato risospeso mediante l'utilizzo di RESUSPENSION BUFFER, costituito da 50 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.1x Inibitore di proteasi, 0.5 mM TCEP, 1mM MgCl₂, Benzoni diluita 1/10 ed H₂O fino a volume.

Il campione è stato risospeso in 15 ml di buffer con l'ausilio di un vortex, dopo questo passaggio sono stati aggiunti 4 µl di lisozima, ottenendo una concentrazione finale di 0.2 mg/ml; l'incubazione è stata svolta in ghiaccio per 40 minuti in agitazione.

Terminato questo tempo, il campione è stato sonicato con quattro cicli (invece dei due cicli condotti nelle precedenti purificazioni) ad AMP 60%. Il pellet così trattato, è stato centrifugato a 6800 xg per 30 minuti a 4°C. Il supernatante ottenuto LC ha un volume di 17.5 ml ed è stato diluito 1:1 con WASH 1, composto da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP, 0.1 mM PMSF ed H₂O fino a volume.

E' stato utilizzato il doppio del volume della resina SIGMA rispetto ai grammi di pellet: di conseguenza sono stati utilizzati 10 ml di slurry

corrispondenti a 5 ml di resina. Questa riequilibrata utilizzando 20 ml di RIEQUILIBRATION BUFFER (50 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, H₂O fino a volume) previo lavaggio con tre volumi di acqua di secondo livello.

Il processo di binding è stato condotto in rotazione a 4°C per quattro ore. Terminata questa fase, il campione viene trasferito in colonna da cromatografia d'affinità ed il flow through raccolto in falcon. E' stato allestito una elettroforesi SDS-PAGE per valutare la lisi cellulare e l'andamento del processo purificativo: sono stati caricati 10 µl di LT, LTp normalizzato, LTs, LC e FT diluiti 1/10.

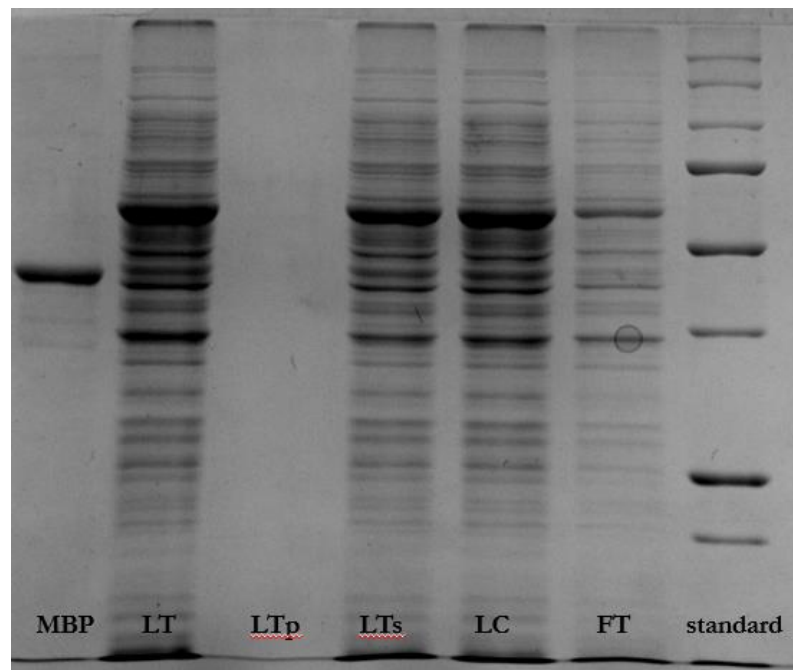


FIGURA 12. Foto gel SDS-PAGE riassuntivo dei primi step di purificazione, utile per valutare la solubilità di CXCL12γ .

La lisi cellulare è avvenuta in maniera idonea, è possibile distinguere la presenza di una grande quantità di proteina nel supernatante LTs, ma una piccola percentuale di CXCL12 è localizzata anche nel FT, indice del fatto che una percentuale di proteina non si è legata alla resina; è ipotizzabile che questo avvenga a causa di una saturazione della resina.

Si procede con il primo lavaggio del campione mediante l'utilizzo di WASH1 costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP e H₂O fino a volume, WASH 2 costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.05 mM TCEP, 0.1 mM PMSF, 20 mM imidazolo e H₂O fino a volume, WASH 3 costituito da 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.05 mM TCEP, 0.1 mM PMSF, 40 mM imidazolo e H₂O fino a volume, ottenendo i seguenti valori di lettura delle aliquote a $\lambda = 280$ nm (riportati nella pagina seguente).

W1 1	2,767
W1 2	2,571
W1 3	1,591
W1 4	0,867
W1 5	0,497
W1 6	0,317
W1 7	0,225
W1 8	0,174
W1 9	0,141
W1 10	0,116
W1 11	0,103
W1 12	0,091

W2 1	0,553
W2 2	2,408
W2 3	2,451
W2 4	2,498
W2 5	2,408
W2 6	2,251
W2 7	2,142
W2 8	1,922
W2 9	1,673
W2 10	1,495
W2 11	1,307
W2 12	1,147
W2 13	1,01
W2 14	0,886
W2 15	0,78
W2 16	0,029

W3 1	0,252
W3 2	0,19
W3 3	0,288
W3 4	0,283
W3 5	0,242
W3 6	0,212
W3 7	0,189
W3 8	0,173
W3 9	0,165
W3 10	0,154
W3 11	0,148
W3 12	0,148
W3 13	0,135
W3 14	0,133
W3 15	0,126
W3 16	0,123
W3 17	0,118
W3 18	0,111
W3 19	0,106
W3 20	0,103
W3 21	0,096

Al termine di questa fase di lavaggio si procede con l'eluizione del campione condotta con l'utilizzo di ELUTION BUFFER, presentante 25 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 300 mM imidazolo, 0.1 mM TCEP, 0.1 mM PMSF e H₂O fino a volume.

Le aliquote prelevate presentano i seguenti valori di lettura a $\lambda = 280$ nm:

E1	-0,331
E2	-0,275
E3	1,468
E4	2,016
E5	1,749
E6	1,096
E7	0,697
E8	0,462
E9	0,245
E10	0,184
E11	0,155
E12	0,12

I primi valori sono negativi in quanto si tratta di aliquote prive di proteina e costituite solamente da tampone, che presenta appunto tali valori di lettura alla lunghezza d'onda impostata. Le aliquote da E3 ad E10 sono unite a formare il pool di eluizione che raggiunge un volume di circa 15 ml.

Concentrazione e dialisi del campione sono state condotte con la stessa procedura delle precedenti purificazioni. La valutazione totale del processo purificativo è stata condotta per mezzo di elettroforesi SDS-PAGE al 12%. Nel primo gel sono stati caricati 10 µl dei campioni LC, FT, W₂2, W₂4 e W₂9 diluiti 1/10 e tutto il volume presente (circa 20 µl) dei campioni W₃2, W₃4, W₃8 e W₃21 non diluiti.

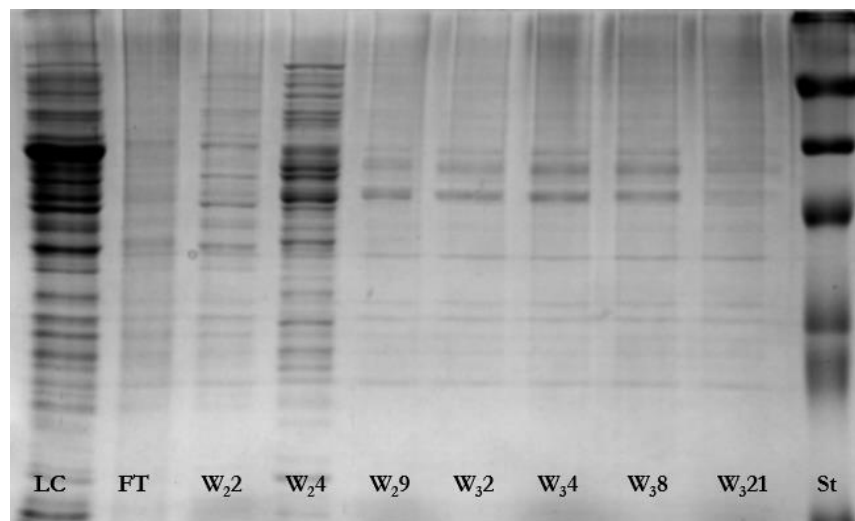


FIGURA 13. Foto del gel 1 della purificazione di CXCL12 γ .

Nel secondo gel sono stati caricati 10 µl circa dei campioni E2 e pool non concentrato non diluiti, 10 µl dei campioni E3, E4, E6, E8 ed E10 diluiti 1/5 e 10 µl dei campioni E5 e LC diluiti 1/10.

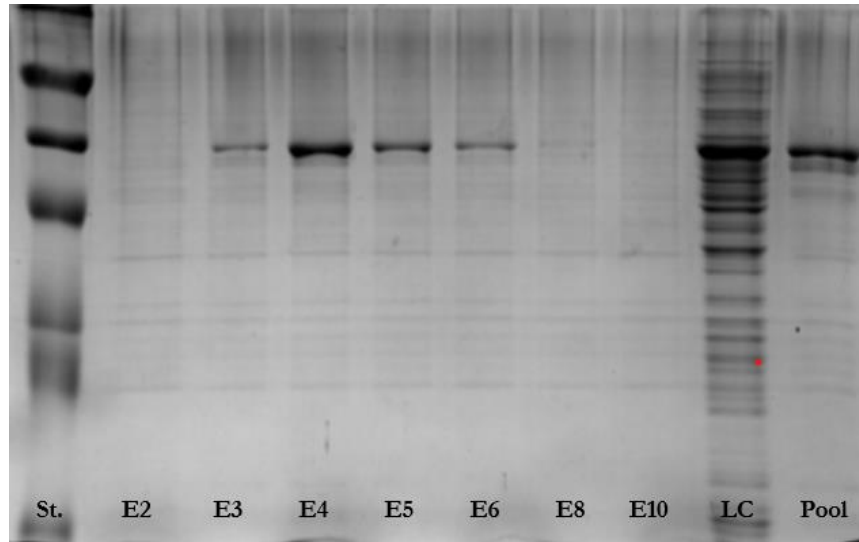


FIGURA 14. Foto del gel 1 SDS-PAGE di eluizione di CXCL12 γ

La proteina CXCL12 γ è stata purificata in maniera soddisfacente, nonostante ci sia una percentuale di perdita notevole durante i vari step.

Gli esperimenti condotti in Rosetta hanno prodotto risultati molto simili a quelli ottenuti in C41.

Taglio con enterochinasi

Attraverso l'utilizzo dell'enzima proteolitico Enterochinasi si è svolto un taglio della proteina di fusione prodotta: infatti, tutte le isoforme sono state

prodotte con 10 His-tag e Maltos Binding Protein a monte del sito si taglio per EK, il quale separa le componenti appena citate da CXCL12. A seguito di questo processo, si ottiene la proteina di interesse priva di elementi di fusione e con l'estremità ammino-terminale libera, con la quale interagisce con i propri recettori. Una immagine riassuntiva della situazione delle singole isoforme prima del taglio con EK è la 15, dove è possibile vedere come in ogni pozzetto sia stato caricato 1µl di ciascuna isoforma post-purificazione, di standard sono stati caricati 10µl e di MBP 1µl. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato colorato con Comassie Brillant Blue R250.

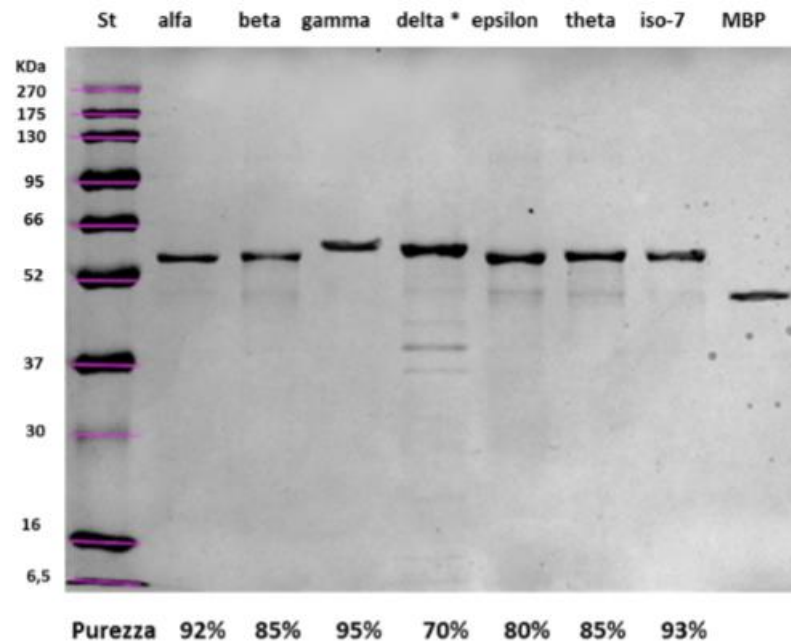


FIGURA 15. Foto del gel di elettroforesi SDS-PAGE 12% contenente tutte e 7 le isoforme di MBP-CXCL12. In basso sono indicati i valori densitometrici corrispondenti al grado di purezza ottenuto per ogni isoforma.

Il primo tentativo di taglio è stato condotto mediante l'utilizzo dell'enzima enterochinasi EK nativo (EK-Roche), che risulta essere facilmente allontanabile dalla miscela di digestione assieme al frammento tagliato His-MBP mediante ultrafiltrazione con dispositivi selettivi per molecole maggiori di 30 kDa. Tuttavia, questo enzima è stato successivamente sostituito, in quanto le sue grandi dimensioni risultavano essere un ostacolo per l'accesso al sito di taglio di molte proteine di fusione.

L'enzima utilizzato è una enterochinasi ingegnerizzata rec-EK (small fragment) della Novagen. Seguendo le indicazioni dell'azienda produttrice sono stati ottenuti dei buoni risultati, le eccezioni possono essere sormontate con l'utilizzo di una quantità maggiore di enzima. La valutazione del processo di taglio è condotta attraverso un test in piccola scala, mentre una valutazione della solubilità non è conducibile con queste quantità di proteina. Lo scale-up è stato condotto in soluzione contenente 150 mM NaCl, concentrazione maggiore rispetto a quella indicata alla Novagen ma comunque necessaria per evitare la parziale precipitazione delle proteine.

La figura 15 rappresenta un gel SDS-PAGE al 15%, dove sono stati caricati 10 µl di ogni miscela di digestione e di MBP, mentre dello standard sono stati caricati 10 µl, dopo 24h di incubazione con l'enzima. I frammenti derivati dalla digestione dei prodotti di fusione sono stati considerati per

valutare l'efficienza del taglio, dato che le citochine prodotte sono appena visibili in corrispondenza dello standard di 10 kDa, comportamento piuttosto anomalo. Il giorno seguente sono state prelevate aliquote da 5 µl dalla miscela di digestione e sono state centrifugate a 12000 xg per 15 minuti a 4°C, ottenendo supernatante e pellet, utile per capire se a seguito della digestione le proteine perdono di solubilità e precipitano. Il pellet è stato poi risospeso con lo stesso volume iniziale della soluzione di digestione e incubato 3 ore a 4°C in agitazione. È stato quindi allestito un gel SDS-PAGE con 10 µl di digerito totale (T), surnatante (S) e pellet (P).

Come è possibile osservare dal gel, dopo 40 ore di incubazione CXCL12γ non è completamente digerita, auspicando un utile aumento di enzima necessario per il suo taglio. In ogni caso, è possibile vedere che tale isoforma permane in soluzione e sono evidenti due bande a basso peso molecolare, che potrebbero rappresentare un dimero o un monomero (o entrambi) della proteina. La difficoltà in questo genere di valutazione deriva dal fatto che proteine molto basiche come CXCL12γ in SDS-PAGE migrano in maniera anomala. È necessario quindi migliorare la fase di recupero, basati su sistemi di ultrafiltrazione da 30 kDa, che trattengono per motivi sconosciuti anche la proteina, valutando tra le resine prese in considerazione quale è la più efficiente.

BIBLIOGRAFIA

1. *The unique structural and functional features of CXCL12.* **Rik Janssens, Sofie Struyf and Paul Proost.** Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute for Medical Research, Laboratory of Molecular Immunology, KU Leuven, University of Leuven, : Cellular & Molecular Immunology, 2018. doi:10.1038/cmi.2017.107.
2. *Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells.* **Eileen L Heinrich, Wendy Lee, Jianming Lu, Andrew M Lowy, and Joseph Kim.** Department of Surgery, City of Hope Comprehensive Cancer Center, 1500 East Duarte Road, Duarte, CA 91010, USA : Journal of translational medicine , 2012. doi: 10.1186/1479-5876-10-68.
3. *Emerging roles of Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3) in normal development and physiology.* **K.E. Quinna, D.I. Mackiea, and K.M. Carona.** Department of Cell Biology and Physiology, 111 MasonFarm Rd., 6312B MBRB CB# 7545, The University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7545, USA : Author manuscript, 2018. doi:10.1016/j.cyto.2018.02.024.
4. *Signaling properties of the human chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 by cellular electric impedance measurements.* **Jordi Doijen, Tom Van Loy, Wouter De Haes, Bart Landuyt, Walter Luyten.** Laboratory of Functional genomics &

proteomics, Zoological Institute, KU Leuven, Belgium, Laboratory of Virology and Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Belgium : Plos one, 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185354>.

5. *An Essential Role of the Cytoplasmic Tail of CXCR4 in G-Protein Signaling and Organogenesis.* **Darran G. Cronshaw, Yuchun Nie, Janelle Waite, Yong-Rui Zou.** Center for Autoimmune and Musculoskeletal Diseases, Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, New York, United States of America : Derya Unutmaz, New York University, United States of America, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0015397 .
6. *CXCL12 (SDF1a)-CXCR4/CXCR7 Pathway Inhibition: An Emerging Sensitizer for Anticancer Therapies?* **Dan G. Duda, Sergey V. Kozin, Nathaniel D. Kirkpatrick, Lei Xu.** Steele Laboratory, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts : American Association for Cancer Research, 2011. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2636.
7. **E. Gulletta, D.P. Foti, E. Galliera, M.M. Corsi.** *Citochine e Chemochine.* Catanzaro : Medical system Sp, rivista Caleidoscopio, 2008.
8. **Locati, M., and Murphy, P. M.** *Annu Rev Med* 50, 425-440. 1999.
9. *Distinguishing Specific CXCL12 Isoforms on Their Angiogenesis and Vascular Permeability Promoting Properties.* **Chia-Wen Chang, Alex J. Seibel, Alex Avendano, Marcos G. Cortes-Medina, Jonathan W. Song.** Department

of Chemical and Biomolecular Engineering, The Ohio State University
Columbus, OH 43210, USA : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,
Weinheim., 2020. DOI: 10.1002/adhm.201901399.

10. ENA European Nucleotide Archive. *EMBL-EBI*. [Online] 2014.
<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AFE66407>. DOI:
10.1186/1745-6150-9-20.
11.
https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/choice_vector/ecoli/vectorfeatures/. *EMBL*. [Online]
12. PSI. [Online]
<http://bioinformatics.anl.gov/mcsg/technologies/images/im/vectors/pMCSG9.png>.
13. *Ligation independent cloning (LIC) as a rapid route to families of recombinant biocatalysts from sequenced prokaryotic genomes*. Daniel Bonsor, Stephanie F. Butz, Julianna Solomons, Stephanie Grant, Ian J. S. Fairlamb, Mark J. Fogg and Gideon Grogan. York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, University of York, Heslington, York, UK : Organic & Biomolecular Chemistry, 2006. <https://doi.org/10.1039/B517338H>.

