



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

I TRONCAMENTI DELLA GELONINA PORTANO AD UNA DIMINUZIONE DELLA SUA CITOTOSSICITÀ

GELONIN TRUNCATIONS LEAD TO A DECREASE IN ITS CYTOTOXICITY

Tesi di Laurea di:
di:

D'ELIA ANDREA

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

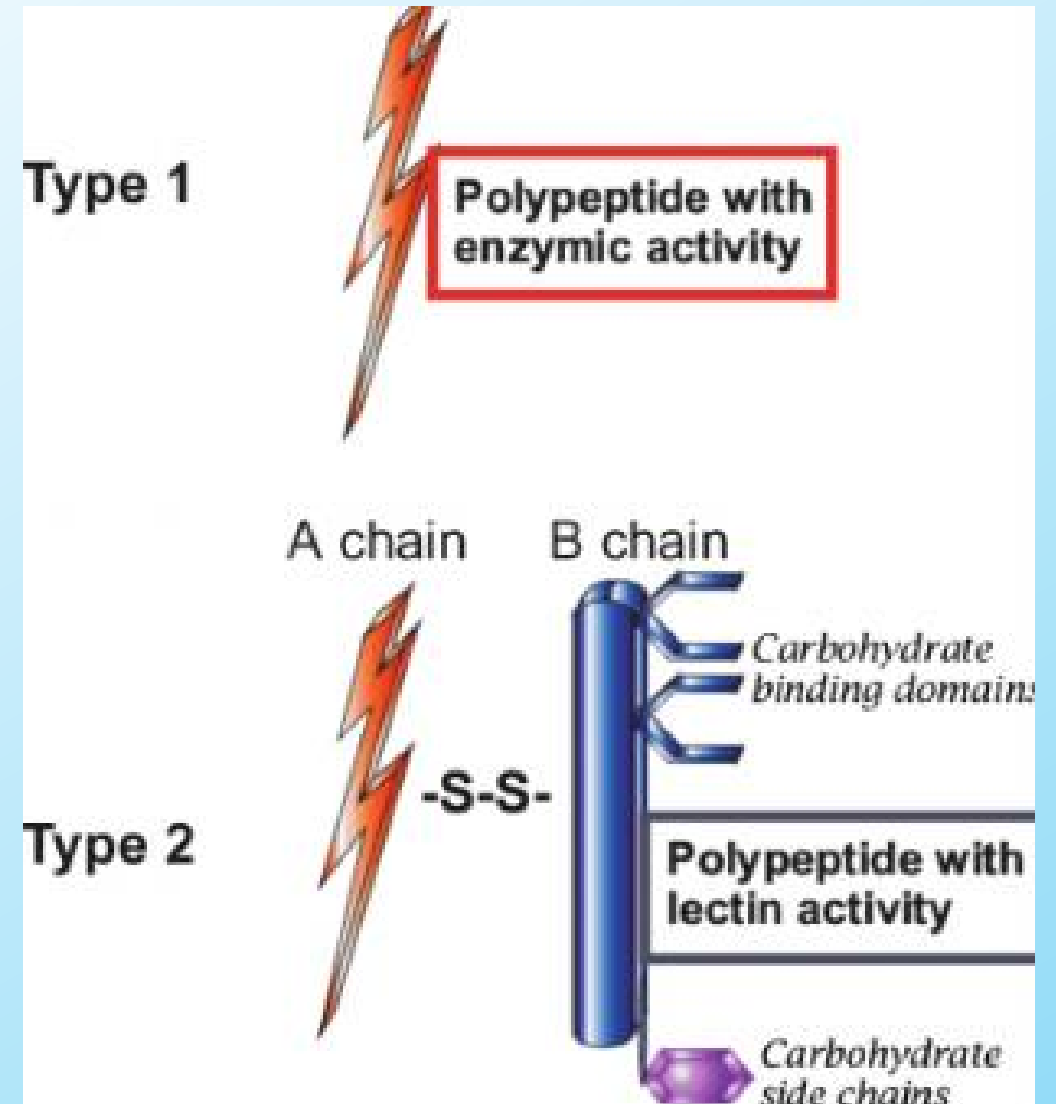
SCIRE' ANDREA ANTONINO

Sessione AUTUNNALE

Anno Accademico 2023-2024

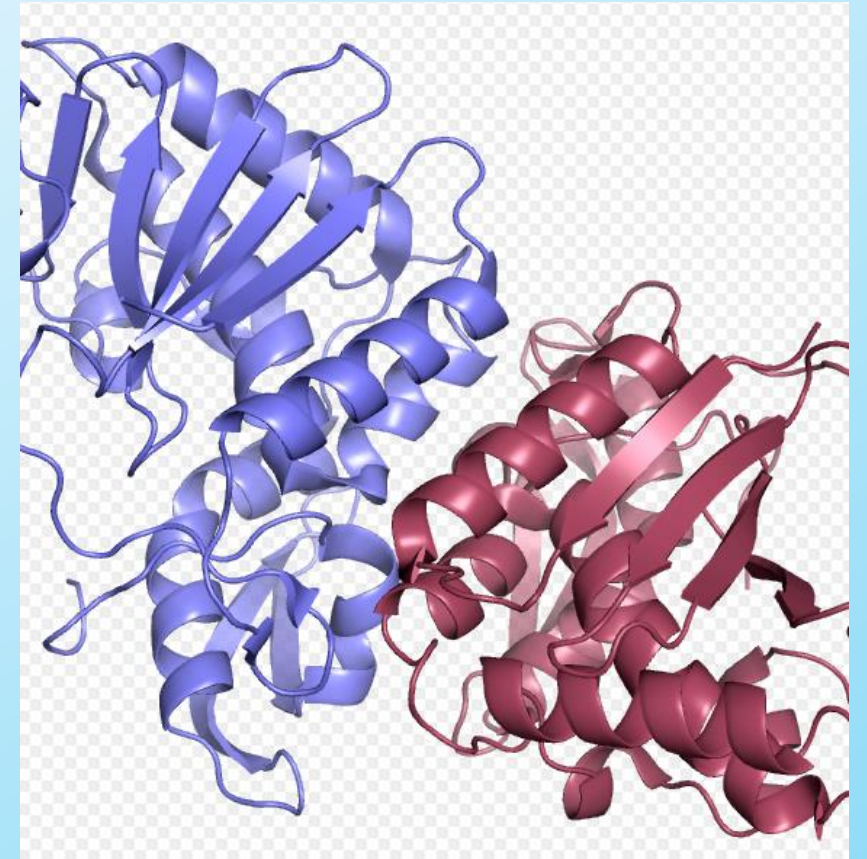
RIP: PROTEINE INATTIVANTI I RIBOSOMI

- Inibiscono la sintesi proteica tramite la scissione del legame N-glicosidico nell'RNA ribosomiale 28 S dalle subunità 60 S dei ribosomi.
- Le RIP sono state divise in due:
 - - le RIP di tipo I (ad esempio Gelonina)
 - - le RIP di tipo II (ad esempio Ricina)



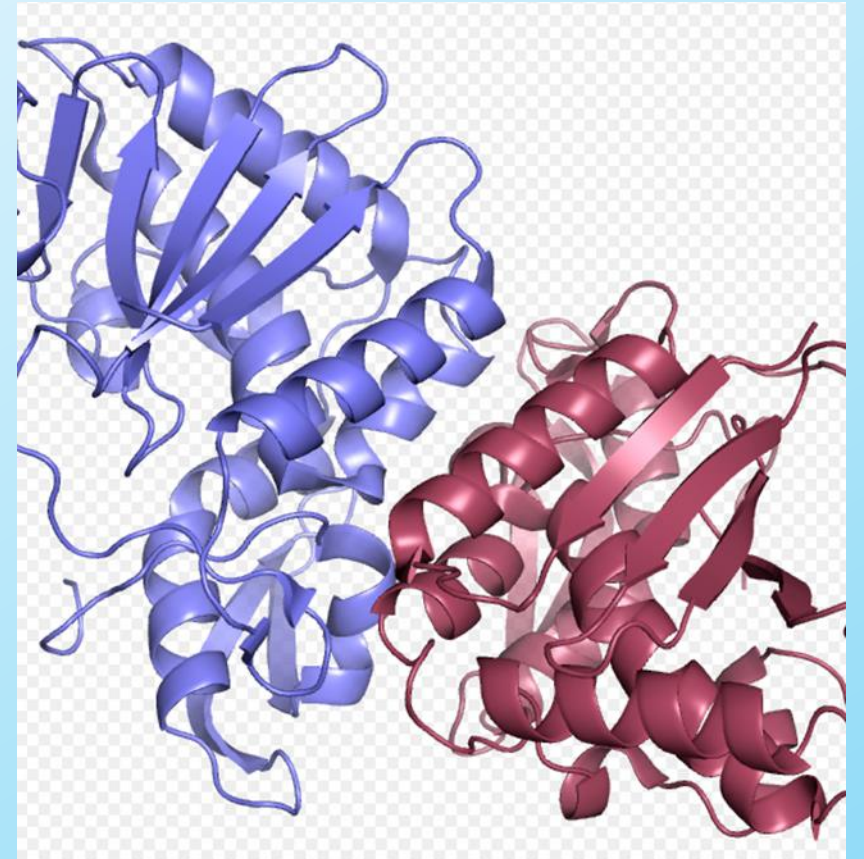
LA GELONINA

- La gelonina inibisce la sintesi proteica nelle cellule bersaglio attraverso il danneggiamento dell'RNA ribosomiale (rRNA).
- La gelonina è composta da due domini funzionali:
 1. **Dominio N-terminale:** Contiene l'attività catalitica della proteina, responsabile della degradazione dell'rRNA.
 2. **Dominio C-terminale:** Coinvolto principalmente nell'interazione con le membrane cellulari e nel processo di internalizzazione all'interno delle cellule.



OBIETTIVI STUDIO

- In questo studio, sono stati analizzati gli effetti delle troncature N-terminali e C-terminali della gelonina sulla sua struttura e attività biologica. L'obiettivo è stato identificare i frammenti ideali della gelonina da coniugare con il recettore dell'acetilcolina per possibili applicazioni terapeutiche.
- Sono state utilizzate:
 - - tre gelonine troncate: G-N3, G-C5, G-N3C5
 - - una gelonina intatta: G-0



MATERIALI E METODI

- **Ceppi batterici e plasmidi**

- sono stati utilizzati:
 - Ceppo ospite E.Coli BL21(DE3);
 - Plasmidi pET-GEL e pUC118;
 - Enzimi di restrizione: HindIII ed EcoRI



BL21

- **Clonazione di gelonine troncate**

Il gene che produce la versione completa della proteina gelonina è stato inserito nel plasmide pET28a.

Il plasmide ricombinante è stato chiamato G-0.

Digestione con HindIII ed EcoRI e clonazione nel plasmide pET28a-> costruzione di gelonine troncate

- G-N3-> rimozione di 3 residui all'N-terminale;
- G-C5-> rimozione di 5 residui al C-terminale;
- G-N3C5-> combinando entrambe le delezioni.

MATERIALI E METODI

Espressione e purificazione di gelonine intatte e troncate

- **Ceppo utilizzato:** *E. coli* BL21
- **Inoculazione della coltura principale:** La coltura iniziale è stata utilizzata per inoculare 1 litro di terreno LB contenente kanamicina.
- **Crescita della coltura:** Incubazione a 37 °C con agitazione a 220 rpm fino a raggiungere un OD600 di 0,6.
- **Induzione dell'espressione proteica:** Aggiunta di IPTG.
- **Raccolta:** Centrifugazione della coltura a 6400×g per 30 minuti a 4 °C.
- **Sonicazione:** La sospensione è stata sonicata 15 volte per 8/s ciascuna in un bagno di acqua ghiacciata.
- **Rimozione del materiale insolubile:** Centrifugazione a 30.000 × g per 30 minuti a 4 °C.

Preparazione del surnatante: Il surnatante ottenuto dopo la centrifugazione è stato caricato su una colonna di agarosio.

Rimozione delle impurità: Lavaggio della colonna con tampone di lavaggio a PH 7,5.

Eluizione della proteina: Eluizione della gelonina o delle varianti troncate.

Metodo di quantificazione: La quantificazione della proteina target è stata eseguita utilizzando il sistema di documentazione del gel (GDS).



MATERIALI E METODI

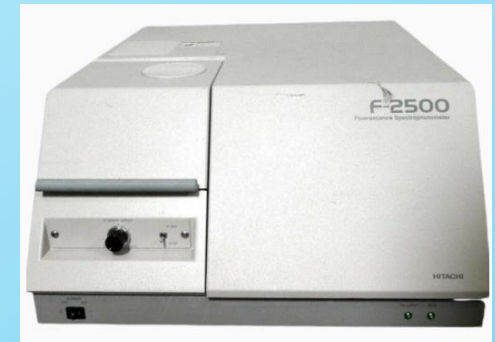
• Dicroismo circolare

- Utilizzato uno spettropolarimetro di registrazione (Jasco, J-810) a 25°C con una cella di lunghezza del percorso di 1 mm.
- Temperatura-> misurazioni effettuate a 25°C.
- Regione UV analizzata-> da 190 a 250 nm.
- Scopo: Misurare gli spettri CD per valutare la struttura secondaria della proteina e analizzare le differenze conformazionali tra le varianti della gelonina.



• Fluorescenza

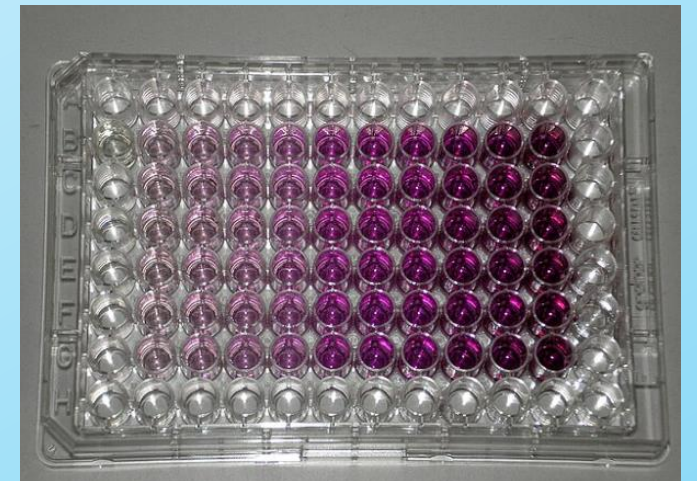
- Utilizzato spettrofluorimetro F-2500 con una cuvetta di 10 mm di diametro.
- Spettro di emissione -> 270/400nm.
- Lunghezza d'onda di eccitazione-> 280nm.
- Scopo: Valutare la quantità di struttura secondaria della gelonina e le sue variazioni conformazionali.



MATERIALI E METODI

Saggio MTT

- **Scopo dell'Esperimento** -> Valutazione della citotossicità della gelonina su cellule umane di leucemia mieloide cronica (K562).
- **Protocollo trattamento:**
 - 1) cellule piastrate in diverse piastre con diversa quantità di gelonina (0,5 μ g, 1 μ g, 2 μ g) in 40 μ l di terreno di coltura.
 - 2) tempo di incubazione-> 12, 24, 36 ore.
- **Saggio MTT**
 - 1) quantità di MTT-> 5 μ g per pozzetto.
 - 2) tempo di incubazione-> 4 ore.
 - 3) post incubazione-> Agitazione per 5 minuti su uno shaker per piastre.
- **Lettura e Analisi**
 - Densità ottica-> Misurata a 490 nm con un lettore di piastre modello 550 Micro.
 - Ogni esperimento è stato eseguito almeno tre volte con campioni triplicati.



RISULTATI

- **Identificazione della gelonina ricombinante e della gelonina troncata**
- Gelonina e funzione: G-0, G-C5, G-N3 e G-N3C5.
- È stata eseguita un'analisi di digestione a doppia restrizione per verificare l'integrità di tutti e tre i costrutti.
- Successivamente eseguita trasformazione in E.Coli e la produzione della proteina è stata stimolata usando un agente chiamato IPTG.
- Una volta prodotta, la proteina è stata analizzata usando una tecnica chiamata SDS-PAGE.

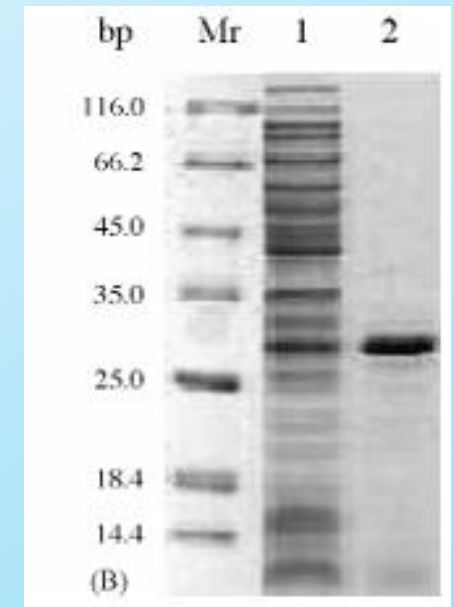
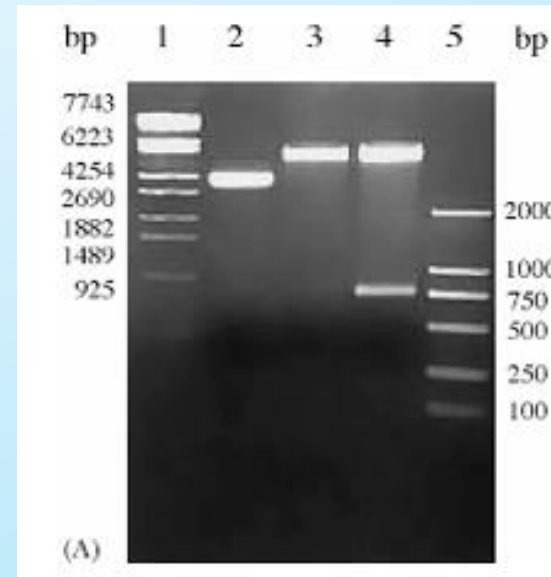


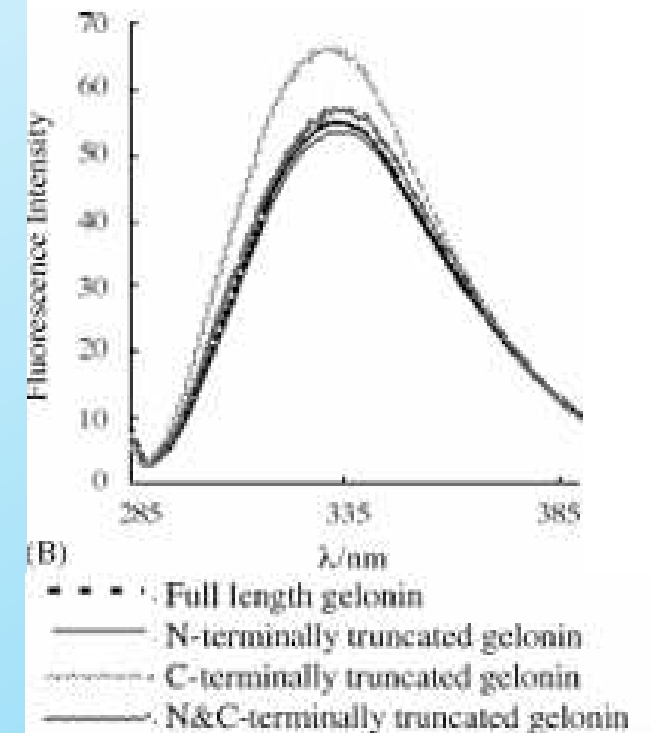
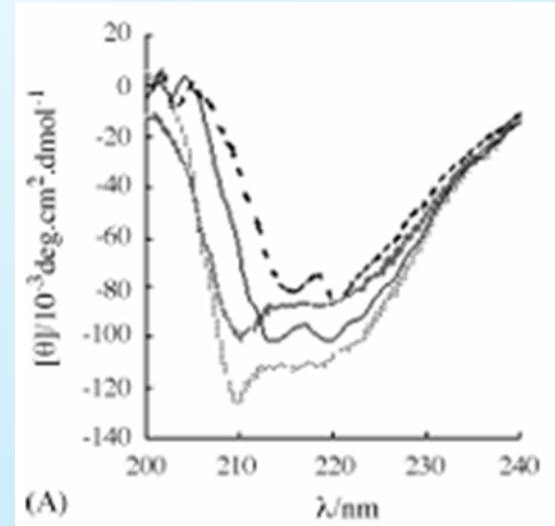
Table 1

A purification summary of different kinds of truncated Gelonins (from 1 l culture medium)

Steps	Total proteins (mg)			
	G-0	G-N3	G-C5	G-N3C5
Extract of cells after sonication and spin down	105.1	113.3	109.4	112.3
Elution part from affinity column	20.4	25.0	19.2	20.8
Concentrated samples from Sephacryl S-200 column	16.3	18.0	15.0	15.8

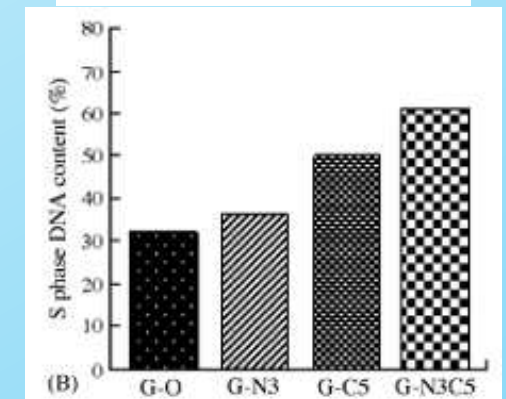
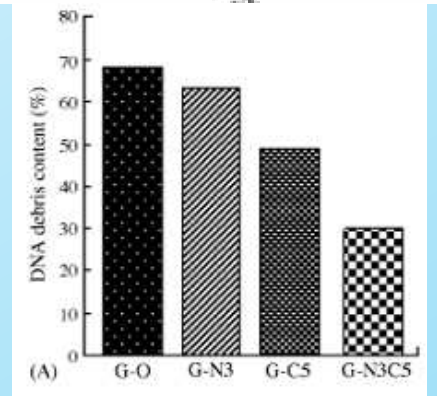
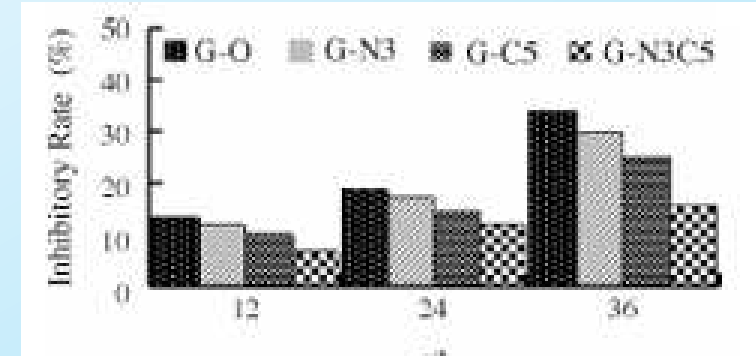
RISULTATI

- **Analisi del dicroismo circolare e degli spettri fluorescenti**
- I risultati mostrano che le versioni G-O e G-N3 hanno curve simili, indicando una struttura stabile con circa il 29% di alfa-elica.
- Invece, le versioni G-C5 e G-N3C5 hanno strutture diverse, con un minor contenuto di alfa-elica (17% e 25%). Questo suggerisce che queste versioni sono meno stabili e hanno una conformazione più "rilassata" rispetto alle altre.
- Gli spettri mostrano che le versioni G-O, G-N3 e G-N3C5 hanno una fluorescenza simile, indicando strutture simili.
- Tuttavia, G-C5 ha un'emissione diversa, suggerendo che la mancanza della parte C-terminale altera significativamente la conformazione della proteina.



RISULTATI

- **Citotossicità delle gelonine con le cellule tumorali**
- Misurata la citotossicità della gelonina nei confronti della crescita della linea cellulare tumorale K562.
- E' stata poi monitorata la capacità dei mutanti della gelonina di causare danni al DNA nelle cellule K562.
- Ulteriore studio > Le cellule che sono state trattate con la gelonina completa (G-O) hanno prodotto la minor quantità di DNA durante la fase S. Questo suggerisce che la gelonina completa inibisce efficacemente la sintesi del DNA.



CONCLUSIONI

- In questo studio, sono state espresse e purificate quattro gelonine ricombinanti: gelonina intatta (G-O), troncata N-terminale (G-N3), troncata C-terminale (G-C5) e gelonina troncata N e C-terminale (G-N3C5). L'analisi degli spettri CD e fluorescenti hanno suggerito che la conformazione di G-C5 e G-N3C5 era significativamente diversa da G-O. È stato riportato che la delezione degli amminoacidi C-terminali determina il cambiamento strutturale più significativo della proteina, mentre la delezione degli amminoacidi N-terminali ne altera meno la conformazione.
- Gli esperimenti di analisi dell'attività DNasi hanno mostrato che la gelonina a lunghezza intera era molto diversa dalla gelonina troncata. La gelonina intatta mostra un'attività DNasi più forte e determina la fusione di una grande quantità di DNA duplex.
- Al contrario, la gelonina troncata C-terminale possiede una minore attività DNasi e la maggior parte del campione di DNA rimane non scissa.
- Gli esperimenti attuali suggeriscono che la gelonina intatta dovrebbe essere selezionata come tossina piuttosto che la gelonina troncata.

Grazie per
l'attenzione

Andrea D'Elia

