UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Tesi di Laurea Magistrale

In Biologia Molecolare ed Applicata

EFFETTO DI PEPTIDOMIMETICI DIRETTI CONTRO eIF4E NELLA TRADUZIONE CAP-DIPENDENTE

Effect of peptidomimetics directed against eIF4E in Cap-dependent translation

Tesi di Laurea Magistrale di:

Ludovica Pasquini

Relatrice:

Prof.ssa Anna La Teana

Correlatori:

Prof. Daniele Di Marino

Dott.ssa Alice Romagnoli

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2020/2021

INDICE:

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 La sintesi proteica negli eucarioti……3
1.2 I ribosomi…….3
1.3 Il macchinario della traduzione……...4
1.4 Il reclutamento del ribosoma sull'mRNA……...5
1.5 La fase d'inizio della traduzione…….....8
1.6 Il complesso eIF4F……10
1.7 Il fattore d'inizio eIF4E……11
1.8 eIF4E e cancro……...13

Scopo della tesi……...15

CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI

2.1 Il vettore di espressione pMCSG7…….……...…18

2.1.2 Clonaggio indipendente dalla ligazione…….20

2.2 Trasformazione di pMCSG7+eIF4E in ceppi di *E. Coli*.…….….21

2.2.2 Ceppo batterico BL21…….23

2.2.3 Ceppo batterico Rosetta……..23

2.3 Prova di espressione in piccola scala…….24

2.3.2 Test di solubilità…….26

2.4 SDS-PAGE……28

2.4.2 Colorazione e decolorazione gel……29

2.5 Produzione di eIF4E su larga scala……...30

2.6 Purificazione ed estrazione di eIF4E…….31

2.6.2 Estrazione da corpi di inclusione…….…...33

2.7 Dialisi……36

2.8 Concentrazione……..…….…...37

2.9 Cromatografia per gel-filtrazione…….….37

2.10 m^7GTP pull down assay……..……..….….38

2.11 Coltura cellule eucariotiche A549……..……...…….40

2.11.2 Passaggio cellule A549 in adesione..…….……..40

2.12 SUnSET…….……..42

2.13 Western Blot……47

CAPITOLO 3 – RISULTATI

3.1 Prova di induzione in piccola scala……..…….……51

3.2 Test di solubilità……..…….….52

3.3 Cromatografia per affinità…….…53

3.4 Estrazione da corpi di inclusione……...53

3.5 Cromatografia per gel-filtrazione……..55

3.6 Saggio m^7GTP pull down…..…….……..56

3.7 SUnSET assay……..……57

3.8 Western Blot……..61

CAPITOLO 4 – DISCUSSIONE……..62

CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI……66

BIBLIOGRAFIA……...……68

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 La sintesi proteica negli eucarioti

La sintesi proteica è un processo biochimico che ha luogo prevalentemente nel citoplasma cellulare, precisamente sui ribosomi, grazie al quale i geni presenti nel DNA vengono convertiti in proteine. Tale processo si svolge in due stadi: il primo è detto *trascrizione*, avviene nel nucleo e prevede che l'informazione contenuta nel DNA venga copiata in molecole di RNA; segue poi la fase di *traduzione* in cui l'informazione racchiusa nell'RNA messaggero (mRNA) viene tradotta, con l'ausilio di altri due tipi di RNA, il ribosomiale (rRNA) e l'RNA di trasporto (tRNA); la sintesi proteica prevede anche l'intervento di fattori di inizio, allungamento e terminazione.

1.2 I ribosomi

Nel processo di traduzione proteica hanno un ruolo chiave i ribosomi. Queste particelle ribonucleoproteiche sono costituite da RNA e proteine ribosomiali e si articolano in due subunità: una maggiore e una minore. La subunità maggiore,

indicata negli organismi eucariotici come *60S*, in base alla sua velocità di sedimentazione quando sottoposta a forza centrifuga, contiene il centro peptidil-transferasico, responsabile della formazione dei legami peptidici nella catena polipeptidica nascente; la subunità minore, *40S*, contiene il centro di decifrazione, in cui i tRNA carichi 'decifrano' i codoni dell'mRNA. L'intero ribosoma eucariotico è indicato come *80S.* Le due subunità ribosomiali hanno la capacità di associarsi e dissociarsi durante il processo di sintesi proteica e questo alternarsi delle due fasi viene indicato come ciclo ribosomiale.

1.3 Il macchinario della traduzione

Il macchinario responsabile della traduzione proteica converte l'informazione contenuta nell'mRNA in proteina e per fare ciò si avvale di quattro componenti: l'mRNA, il tRNA, l'amminoacil-tRNA sintetasi ed il ribosoma. Il loro compito è quello di tradurre un codice scritto in un alfabeto di quattro basi in un codice scritto nel linguaggio dei 20 amminoacidi [1].

L'mRNA è formato da una serie ordinata di triplette nucleotidiche chiamate *codoni*, ciascuno dei quali codifica per un determinato amminoacido. Il codice genetico però è ridondante, ossia alcuni amminoacidi possono essere codificati da più di un codone, ma in realtà ogni organismo ha dei codoni 'preferenziali'

che vengono usati per la codifica di determinati amminoacidi; questa caratteristica prende il nome di 'codon usage'.

Nell'apparato della traduzione sono presenti degli enzimi, le amminoacil-tRNA sintetasi, che accoppiano i tRNA complementari con i rispettivi amminoacidi. Ruolo terminale è quello del ribosoma, il quale oltre a determinare il corretto riconoscimento dell'mRNA da parte di ciascun tRNA ha il compito di catalizzare la formazione del legame peptidico tra la catena proteica nascente e gli amminoacidi associati agli specifici tRNA.

Il macchinario per la traduzione decifra solamente una porzione dell'mRNA, quella utile alla sintesi della proteina, che è costituita da una serie consecutiva di codoni contigui, detta *open reading frame* (ORF). Ciascuna ORF specifica una singola proteina [1]. Negli organismi eucariotici generalmente l'mRNA possiede un'unica ORF e per tale ragione questi messaggeri vengono denominati mRNA *monocistronici* [1].

1.4 Il reclutamento del ribosoma sull'mRNA

La traduzione inizia all'estremità 5' dell'open reading frame e procede verso l'estremità 3'. Il codone d'inizio, negli organismi eucarioti, è sempre AUG e codifica per l'amminoacido Metionina; questo amminoacido viene poi

generalmente rimosso da una proteasi specifica al termine della sintesi proteica. I codoni di stop invece sono UAA, UAG, UGA, i quali non codificano per alcun amminoacido e determinano quindi la terminazione dell'allungamento della catena polipeptidica.

Affinché la traduzione possa iniziare è necessario che il ribosoma venga reclutato sull'mRNA. Negli organismi procariotici per facilitare il riconoscimento ed il legame sono presenti le sequenze di Shine-Dalgarno, brevi sequenze nucleotidiche poste a monte del codone di inizio, complementari ad una sequenza localizzata vicino alla regione 3' del rRNA 16S.

Negli eucarioti, invece, esistono due possibili meccanismi di reclutamento ribosomiale:

il legame tra il messaggero ed il ribosoma può essere favorito da una modificazione chimica a carico dell'mRNA: il *cap* 5'. Si tratta di una guanina metilata unita all'estremità 5' dell'mRNA, tramite un legame 5'— 5' poco usuale. Questa guanina è legata al 5' del messaggero tramite tre gruppi fosfato. In questo caso si parla di traduzione *cap-dipendente*. Peraltro, il *cap* ha anche la funzione di proteggere il filamento di mRNA dall'attacco da parte di nucleasi.

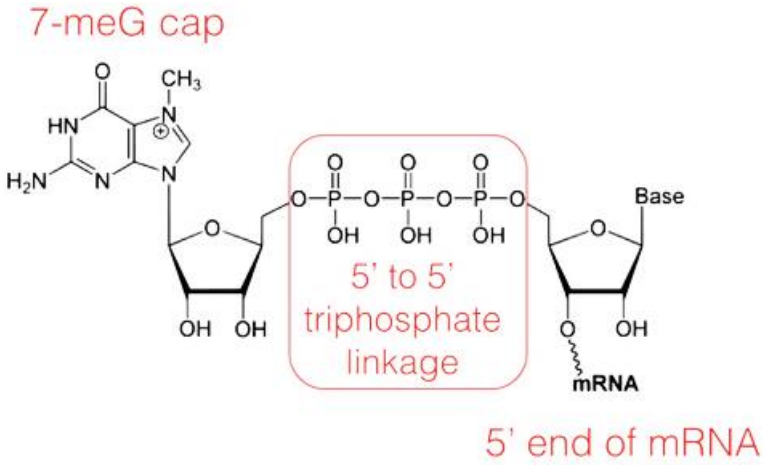


Fig. 1 struttura del cap al 5'

In alternativa, in alcuni organismi eucariotici è possibile che avvenga una traduzione *cap-indipendente,* processo che prevede la diretta interazione del macchinario della traduzione con un IRES, ovvero un sito interno di entrata del ribosoma presente sull'mRNA [2]; inoltre, negli eucarioti, è stata individuata una sequenza analoga alla Shine Dalgarno dal punto di vista funzionale: si tratta della sequenza di Kozak, costituita da una base purinica posta a monte del codone di inizio ed una guanina sita a valle. La presenza di questa sequenza aumenta di molto l'efficienza di traduzione [1]. Infine, il rendimento è notevolmente migliorato anche per merito della presenza della coda di poli-A all'estremità 3' dell'mRNA.

1.5 La fase d'inizio della traduzione

La formazione di un complesso tra la subunità ribosomiale minore, l'mRNA e il tRNA d'inizio (UAC) determina l'inizio della traduzione.

Il complesso, che prende il nome di 'complesso di pre-inizio 43S', una volta formatosi comincia a scansionare l'mRNA in direzione 5'→3', sino ad incontrare il codone d'inizio (AUG); raggiunto tale codone avviene l'appaiamento con l'anticodone UAC presente sul tRNA definito 'metioninico' situato nel sito P del ribosoma. È importante che il ribosoma sia posizionato correttamente sul codone d'inizio perché ciò fissa il 'reading frame' per la traduzione dell'mRNA [1].

A questo punto, la subunità maggiore del ribosoma si unisce con quella minore e l'mRNA si troverà inserito tra le due parti; il ribosoma neo-assemblato abbraccia una porzione di mRNA di circa trenta nucleotidi.

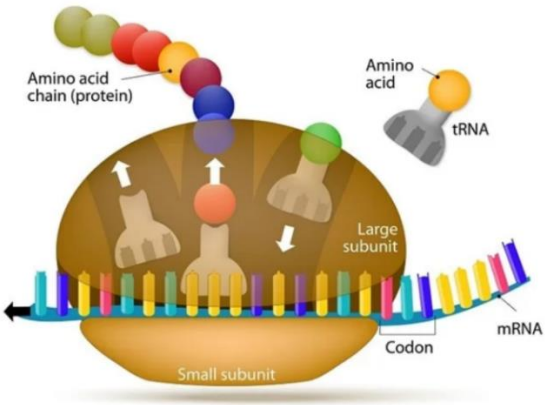


Fig. 2 struttura del ribosoma assemblato contenente il filamento di mRNA

La catena peptidica si allunga nel seguente modo:

quando il secondo codone dell'mRNA si appaia con il suo anticodone, posto su un secondo tRNA, quest'ultimo si lega al secondo sito di legame del tRNA sulla subunità maggiore del ribosoma. Il sito catalitico sulla subunità maggiore catalizza due importanti reazioni: la rottura del legame tra il primo amminoacido con il suo tRNA e la formazione del legame peptidico tra la metionina ed il successivo amminoacido; i due amminoacidi si trovano quindi attaccati al tRNA nel secondo sito di legame, mentre il tRNA vuoto si stacca con l'aiuto di specifiche proteine, e il ribosoma si sposta di un codone verso destra lungo l'mRNA.

Il processo si ripete sistematicamente fino al momento in cui si raggiunge un codone di terminazione; i codoni di stop, a differenza degli altri, non si legano ad un tRNA, ma nel momento in cui il complesso li incontra accade che delle proteine specifiche si legano al ribosoma e fanno sì che quest'ultimo liberi la catena proteica neosintetizzata e l'mRNA.

Le cellule eucariotiche, per iniziare la traduzione, necessitano di molte proteine ausiliarie. È stato detto che una fase cruciale per l'inizio della traduzione è quella del riconoscimento dell'mRNA da parte del complesso di pre-inizio 43S. Esso avviene mediante l'individuazione del *cap* al 5', presente nella maggior parte degli mRNA eucariotici, ad opera del complesso eIF4F.

1.6 Il complesso eIF4F

Il complesso eIF4F funge da ponte tra l'mRNA ed il ribosoma, sfruttando anche il fattore eIF3 presente sulla subunità 40s, il quale a sua volta è parte di un complesso con il primo tRNA e con il fattore eIF1A [2].

L'eIF4F è un complesso etero-trimerico composto da: eIF4A, eIF4G ed eIF4E; il fattore 4A è un'ATPasi RNA-dipendente con attività elicasica quindi va a svolgere le strutture secondarie dell'mRNA, favorendo il rilascio delle proteine legate all'estremità 5' dello stesso; il fattore 4G è una proteina scaffold, cioè con funzione strutturale, implicata nell'assemblaggio del complesso; il fattore 4E infine è la proteina responsabile del legame con il *cap* [1].

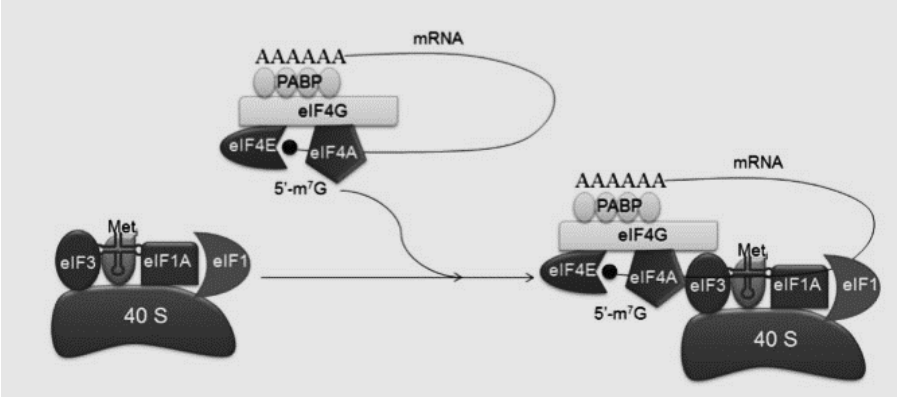


Fig. 3 struttura del complesso eIF4F

1.7 Il fattore d'inizio eIF4E

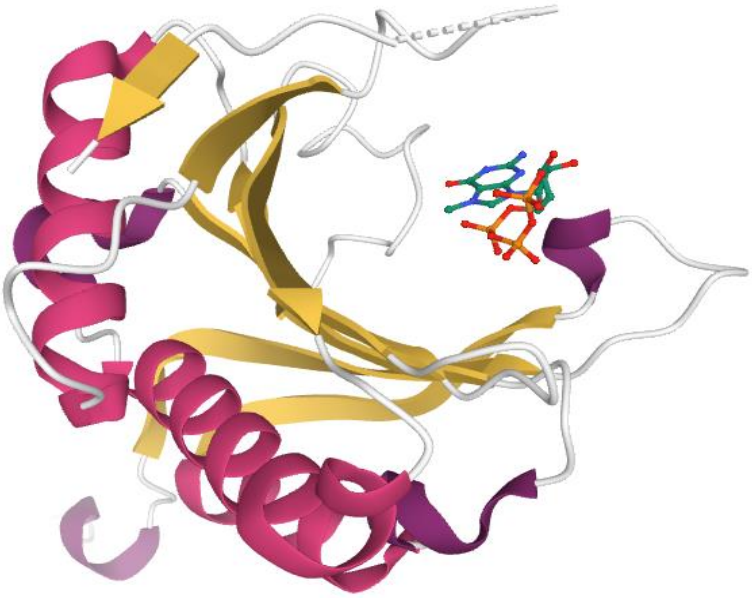


Fig. 4 struttura del fattore eIF4E

Il fattore d'inizio eIF4E è una proteina eucariotica costituita da 217 aminoacidi, con un peso molecolare di circa 25kDa, codificata dall'omonimo gene collocato sul cromosoma 4, braccio *q*, regione 2, banda 3.

Studi strutturali hanno mostrato che eIF4E ha la forma di un guanto da baseball e consiste di un singolo dominio α/β, composto di otto fogli β antiparalleli e tre lunghe α eliche. La superficie concava contiene una stretta fessura all'interno della quale viene legato il *cap*. Nello specifico, sono le catene laterali di due residui di triptofano (W56 e W102) a supportare il riconoscimento del cap [1].

La superficie dorsale invece mostra una porzione idrofobica responsabile dell'interazione tra eIF4E e eIF4G e anche tra eIF4E e le 4E-binding proteins (4E-BPs), come 4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3. Poiché eIF4G e le 4E-BPs hanno lo stesso sito di legame, competono tra di loro per l'interazione con eIF4E.

eIF4E stimola in modo preferenziale la traduzione di un set di mRNA, definiti appunto 'eIF4E-sensibili'.

Gli mRNA, infatti, possono essere classificati in due categorie:

-mRNA forti, che hanno delle 5'UTR relativamente corte e non strutturate e codificano generalmente per geni house-keeping come la beta-actina o la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi;

-mRNA deboli, che hanno 5'UTR lunghe e altamente strutturate.

I messaggeri deboli sono molto più sensibili alla disponibilità di eIF4E e solitamente codificano per fattori di crescita e sopravvivenza.

Numerosi studi, inoltre, hanno dimostrato che una over-espressione di eIF4E ha effetti drammatici sulla crescita cellulare e conduce alla trasformazione tumorale.

1.8 eIF4E e cancro

È noto che l'over espressione di eIF4E sia causa di deregolazione della crescita cellulare e trasformazione cancerosa.

In virtù di ciò, eIF4E è diventato un interessante bersaglio terapeutico nell'ambito delle ricerche sul cancro.

Nella progressione tumorale ha un ruolo importante la *fosforilazione* di eIF4E, modificazione mediata da Mnk-1 (proteina chinasi che interagisce con MAP chinasi) [2]. La fosforilazione di eIF4E, precisamente a carico della serina 209, porta ad un aumentato tasso di traduzione, questo fenomeno è associato all'attivazione concomitante della traduzione ed espressione cap-dipendente del fenotipo cellulare trasformato. Elevati livelli di fosforilazione a carico di eIF4E sono stati riscontrati nel 60% dei tumori, ma comunque va sottolineato che né la progressione della crescita tumorale né l'aggressività dello stesso sembrano correlare col grado di fosforilazione di 4E.

In passato gli approcci terapeutici contro i tumori erano focalizzati su tre strategie:

-rompere il legame di eIF4E con il *cap*-mRNA;

-danneggiare l'integrità del complesso eIF4F;

-agire sull'attività enzimatica dell'intero complesso 4F. [2]

Di recente invece ci si basa su un nuovo approccio: dato che per la fase di inizio della traduzione cellulare ha un ruolo chiave la formazione del complesso eIF4E/eIF4G, molto probabilmente impedire l'assemblaggio di tale complesso può essere considerato come una vera e propria strategia terapeutica, in quanto evitandone la formazione viene di conseguenza inibita la traduzione, poiché non si formerà il complesso eIF4F, che a sua volta è determinante nel favorire il legame tra mRNA e subunità 40S del ribosoma.

Quindi si va ad agire sul pathway PI3K/Akt/mTOR, il quale causa la defosforilazione delle 4E-binding proteins (4E-BPs) e quindi la conseguente inibizione dell'eIF4E stesso. Il complesso eIF4E/eIF4G è regolato proprio dalle 4E binding proteins (4E-BPs). Queste proteine in condizioni fisiologiche, cioè quando non sono fosforilate, si legano saldamente al 4E, impedendo il legame con eIF4G e quindi non avviene la formazione del complesso eIF4F.

Se le 4E-BPs vengono invece fosforilate si staccano dal sito di legame del 4E e quindi sarà possibile il legame 4E/4G.

Volendo invece agire per via diretta, in passato si è pensato di creare degli oligonucleotidi antisenso (ASO), rivolti contro eIF4E, i quali inibissero preferenzialmente la traduzione di mRNA 4E-sensibili codificanti per proteine, come il fattore VEGF, la ciclina D1, la survivina, il c-Myc e Bcl-2, in cellule in coltura. È stato verificato che somministrazioni intravenose di ASO hanno

ridotto selettivamente l'espressione di eIF4E e drasticamente soppresso la crescita tumorale.

Infine, per inibire l'attività pro-tumorale di eIF4E si può anche agire usando composti alternativi alle 4E-BPs che vadano a bloccare l'interazione tra 4E e 4G, determinando la mancata formazione del complesso eIF4F. Ad oggi, le molecole meglio caratterizzate in grado di disaccoppiare il legame 4E/4G sono le 4EGI.

Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi è stato svolto presso il centro di ricerca di biologia molecolare e strutturale NY-MaSBiC (New York-Marche Structural Biology Center) dell'Università Politecnica delle Marche, con l'obiettivo di studiare ulteriori sistemi di inibizione della fase di inizio della traduzione, oltre quelli già noti, al fine di mettere a punto strategie terapeutiche efficaci nell'ambito delle patologie tumorali.

Il target degli esperimenti condotti è stato il fattore di inizio eIF4E, componente del complesso eIF4F, che è essenziale per l'avvio della traduzione.

Inoltre, nell'ambito di questo progetto è stata anche testata l'efficacia del peptide Cy_9B.

Cy_9B è un *peptidomimetico* progettato e caratterizzato dal Professor Daniele Di Marino, che è in grado di legarsi sul fattore 4E sullo stesso sito in cui si lega il fattore eIF4G, precludendo quindi a quest'ultimo la possibilità di legame. Questo peptidomimetico è stato progettato sulla base delle informazioni strutturali relative alla classe delle 4E-BPs, molecole che interferiscono con l'interazione 4E-4G occupando lo stesso sito di legame di 4G su 4E. Il peptide Cy_9B, nello specifico, si basa sulla struttura della 4E binding proteins CYFIP1, la quale interagisce con 4E tramite una sequenza poco conservata, non condivisa dalle altre 4E-BPs.

I peptidomimetici hanno caratteristiche superiori rispetto alle altre molecole ad oggi note in grado di inibire l'attività di 4E, sia dal punto di vista fisico-chimico che strutturale. Innanzitutto, provocano una scarsa risposta immunitaria, inoltre mostrano una maggiore resistenza alle peptidasi, ma soprattutto sembrano avere un migliore trasporto sistemico e una maggiore capacità di penetrazione cellulare, con elevata specificità per il target.

Questo lavoro si inserisce in un quadro operativo ben più ampio in cui è stato inizialmente prodotto il fattore eIF4E tramite tecniche di clonaggio, espressione e purificazione; dopo aver prodotto e purificato eIF4E è stata saggiata la sua attività mediante m^7GTP pull down assay, cioè è stato verificato se eIF4E ricombinante fosse in grado di legare il *cap.* La proteina ricombinante prodotta

sarà utilizzata per la caratterizzazione *in vitro* del binding tra eIF4E ed il peptide Cy_9B, determinando quindi la KD di interazione tramite tecniche di microcalorimetria (ITC) e successivamente per la determinazione della struttura del complesso proteina-peptide. In questo lavoro di tesi, inoltre, è stato messo a punto anche un saggio SUnSET su cellule eucariotiche tumorali per valutare l'effetto diretto del peptide Cy_9B sulla traduzione.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Il vettore di espressione pMCSG7

Per gli esperimenti in oggetto di questo lavoro di tesi è stato utilizzato il vettore di espressione batterico pMCSG7. Questo vettore è stato originariamente prodotto dal Midwest Center for Structural Genomics (MCSG) e poi modificato dal NYCOMPS (New York Consortium on Membrane Protein Structure).

Il pMCSG7 è dotato di un His-tag canonico di sei istidine, utile per agevolare i processi di purificazione sfruttando la cromatografia per affinità con ioni nichel, ma è stato modificato mediante l'aggiunta di quattro ulteriori istidine all'N-terminale, per un totale di dieci. Tale plasmide possiede anche:

- promotore inducibile del gene 10 del fago T7
- gene per la resistenza all'Ampicillina, che funge da marcatore di selezione
- sito di taglio TEV
- operatore LAC
- sequenze RBS
- sito di clonaggio LIC
- terminatore di T7.

Per inserire all'interno del plasmide la sequenza codificante per eIF4E è stata utilizzata la tecnica del clonaggio LIC.

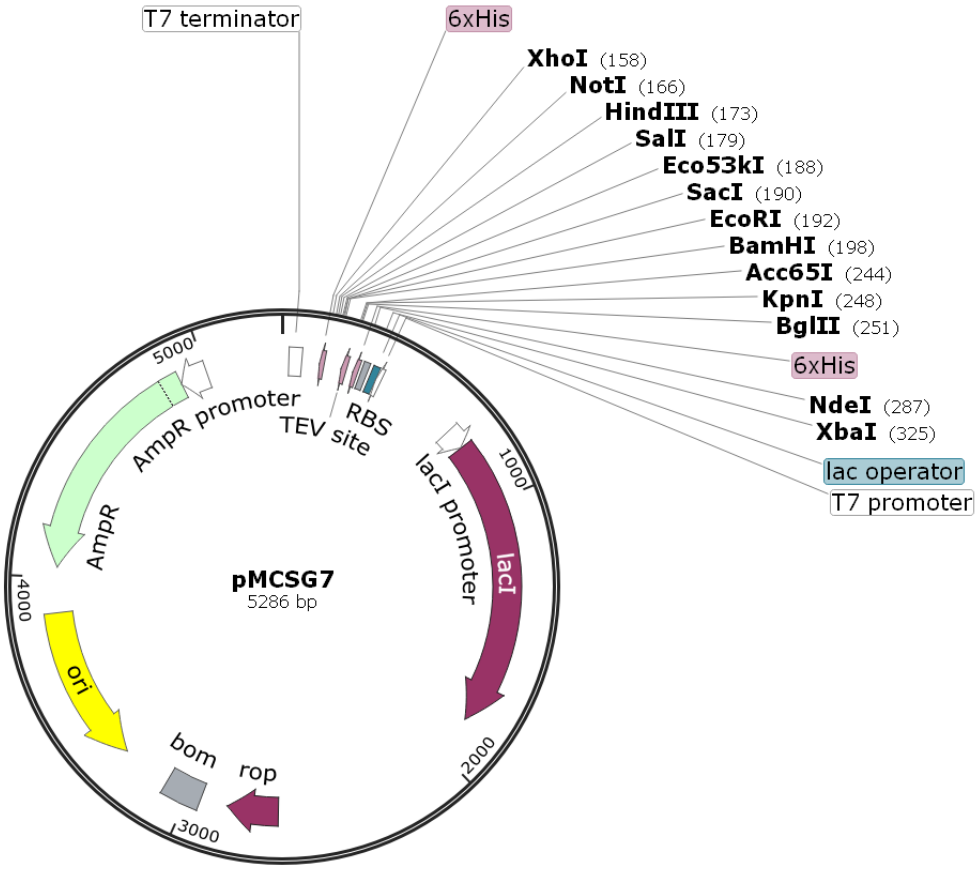


Fig. 5 mappa del vettore pMCSG7

2.1.2 Clonaggio indipendente dalla ligazione

Il clonaggio LIC (*ligation independent cloning*) consente l'inserimento di una sequenza d'interesse all'interno di un plasmide senza l'utilizzo di enzimi, ma sfruttando unicamente l'attività esonucleasica 3' → 5' della polimerasi T4.

Il protocollo LIC prevede due fasi: una di preparazione del vettore e dell'inserto e una di annealing tra i due.

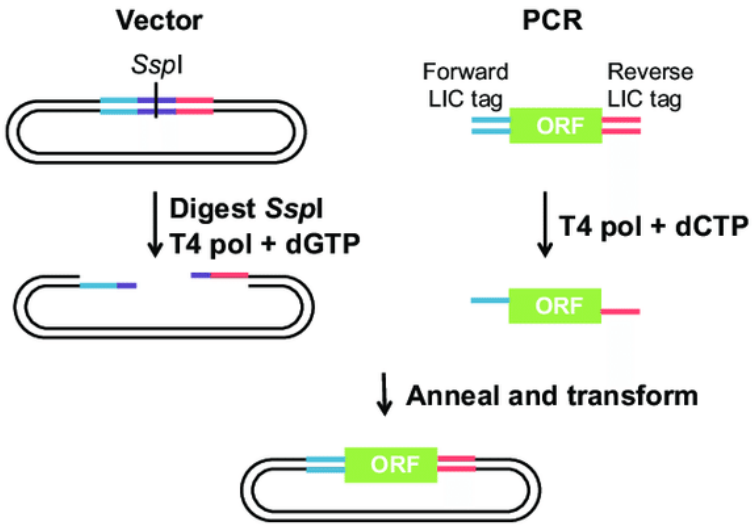


Fig. 6 schema di un clonaggio LIC

In primis, bisogna linearizzare il vettore usando uno specifico enzima di restrizione (in questo caso *SspI*).

L'inserto invece viene amplificato tramite reazione a catena della polimerasi (PCR).

Successivamente, sia il vettore che l'inserto vengono trattati separatamente con la polimerasi T4 e dNTPs.

In particolar modo al vettore viene aggiunto dGTP e all'inserto dCTP; in questo modo la polimerasi digerirà i nucleotidi fino a quando incontrerà una guanina nel caso del vettore e una citosina nel caso dell'inserto.

Così facendo si ottengono sia sul vettore che sull'inserto estremità coesive che semplificheranno il successivo step in cui l'inserto andrà ad inserirsi all'interno del plasmide.

Infatti, nella fase di annealing vettore e inserto si mettono ad incubare insieme per un'ora. Durante questo tempo l'inserto, dotato delle 'code LIC', andrà ad appaiarsi con il vettore, il quale recherà le code LIC complementari.

2.2 Trasformazione di pMCSG7+eIF4E in ceppi di E.Coli

I vettori ricombinanti contenenti l'inserto, ottenuti tramite LIC e successivamente purificati, sono stati usati per la trasformazione in cellule batteriche *competenti*, al fine di ottenere alti livelli di espressione della proteina d'interesse.

E. Coli non è un microrganismo dotato di *competenza genetica*, a differenza di molti altri batteri, ma è stato reso competente mediante un trattamento con ioni calcio.

Sono stati testati i ceppi batterici BL21 e Rosetta, per valutare quale dei due consentisse di ottenere una resa migliore e in quali condizioni operative.

Entrambi i ceppi di Coli testati ospitano un sistema pET, cioè contengono all'interno del proprio genoma una cassetta di espressione DE3, dotata del promotore LAC e della sequenza codificante per il gene 1 di T7, ossia la RNA polimerasi; inoltre, nell'ospite è presente un piccolo plasmide chiamato pLys, che reca il gene codificante per il lisozima di T7, molecola che funge da inibitore per la RNA polimerasi di T7, ed un plasmide pET dotato del promotore di T7, attivato dalla RNA polimerasi, e che porta la sequenza target da codificare.

Il sistema pET è utile per bloccare una eventuale espressione proteica basale indesiderata, prima dell'induzione con IPTG. Infatti, il plasmide pLys codifica per il gene del lisozima di T7, che è espresso sotto il controllo di un promotore costitutivo, quindi funziona sempre seppur a bassi livelli. Le poche molecole di lisozima che vengono prodotte sequestrano le molecole di RNA polimerasi di T7 presenti in esigua quantità prima dell'induzione con IPTG, quindi l'RNA

polimerasi non sarà disponibile per il legame col promotore di T7 presente sul plasmide pET, dove è presente il gene target.

Nel momento in cui si induce il sistema con IPTG verrà prodotta una grande quantità di RNA polimerasi e il lisozima prodotto da pLys non è più sufficiente a bloccare questo eccesso, che quindi agirà sul promotore di T7, favorendo l'espressione del transegene.

2.2.2 Ceppo batterico BL21

Il ceppo BL21 di *Escherichia Coli* è uno dei principali ospiti usati nella pratica di laboratorio per ottenere alti livelli di produzione di proteine ricombinanti.

Nello specifico per i successivi esperimenti è stato usato il ceppo BL21-DE3, cioè un BL21 modificato, dotato della cassetta di espressione DE3, derivata dal batteriofago λ, in cui è presente il gene della RNA polimerasi di T7 sotto il controllo del promotore lacUV5.

2.2.3 Ceppo Rosetta

Il ceppo Rosetta usato negli esperimenti è un Rosetta-DE3 quindi anch'esso modificato e dotato di una copia del gene per la RNA polimerasi di T7 sotto il

controllo del promotore lacUV5; questo ceppo viene ampiamente impiegato per ottenere l'espressione di proteine eucariotiche che hanno codoni che riscontrano uno scarso codon usage in *E.Coli*, ossia che vengono usati raramente da questo batterio per la codifica degli amminoacidi, in favore di altri.

2.3 Prova di espressione in piccola scala

In seguito alla trasformazione dei due ceppi di Coli è stata preparata una piastra con terreno LB agarizzato, ampicillina e cloramfenicolo (LB+Amp+Clo).

Per 200mL di terreno (circa 8-10 piastre):

- Triptone 1% → 2g
- Estratto di lievito 0,5% → 1g
- NaCl 1% → 2g
- Agar 1,5% → 3g

Gli antibiotici sono stati aggiunti al terreno liquido dopo la sterilizzazione in autoclave e prima della solidificazione in piastra.

La piastra è stata seminata per metà con il ceppo BL21+pMCSG7+4E e per metà con Rosetta+pMCSG7+4E ed è stata posta ad incubare over-night a 37°C; il giorno successivo dalla stessa è stata prelevata una colonia per ciascuno dei due ceppi, per sviluppare colture liquide. Le singole colonie prelevate sono state

inoculate in due falcon da 50mL contenenti anch'esse LB+Amp+Clo, per un volume totale di 10mL ciascuna.

Le due falcon contenenti rispettivamente BL21+pMSCG7+eIF4E e Rosetta+pMSCG7+eIF4E, sono state poste ad incubare a 37°C per circa tre ore in blanda agitazione a 250 rpm, per consentire alle cellule di crescere e raggiungere una densità ottica (O.D.) pari ad almeno 0,6 necessaria per procedere con l'induzione.

Raggiunto tale valore, misurato con il *Nanodrop*, è stato prelevato 1mL di campione da ciascuna delle due falcon, trasferito in eppendorf e centrifugato per 10 minuti a 5000g, ottenendo così il pellet da utilizzare successivamente come controllo pre-induzione. Le due eppendorf sono state conservate inizialmente in frigo a 4°C e poi sono state messe ad incubare a 20°C per sedici ore, insieme ai campioni indotti con concentrazioni di IPTG pari a 0,5mM e 0,1mM successivamente preparati.

Infatti, da ciascuna coltura liquida è stato prelevato anche:

-1mL che è stato indotto con 0,5mM di IPTG per tre ore a 37°C;

-1mL che è stato indotto con 0,5mM di IPTG per sedici ore a 20°C;

-1mL che è stato indotto con 0,1mM di IPTG per sedici ore a 20°C.

Le due eppendorf contenenti i campioni indotti per tre ore a 37°C al termine dell'induzione sono stati centrifugati per dieci minuti a 5000g, il surnatante è stato scartato ed il pellet è stato congelato a -80°C fino al giorno successivo.

Il mattino seguente i campioni indotti con 0,5mM e 0,1mM di IPTG per sedici ore a 20°C hanno terminato il periodo di incubazione e sono stati centrifugati con le stesse modalità dei precedenti campioni, per recuperarne il pellet;

2.3.2 Test di solubilità

I pellet ottenuti il giorno precedente dai campioni indotti a 37°C per tre ore sono stati scongelati e, insieme ai pellet ottenuti dai campioni incubati per sedici ore, sono stati risospesi con 600µL di Lysis Buffer, preparato secondo le proporzioni presenti nella tabella sottostante (Tabella 1).

	Concentrazione finale	Concentrazione iniziale	Volume iniziale
Hepes (pH 7,8)	20 mM	1000 mM (1M)	60 µL
KCl	300 mM	4000 mM (4M)	225 µL
EDTA	1 mM	25 mM (0,025M)	120 µL
DTT	2 mM	1000 mM (1M)	6 µL
Glicerolo	10%	50%	600 µL

Acqua			Portare a Volume

Tab. 1 composizione Lysis buffer

Dopo l'aggiunta del tampone i campioni sono stati sottoposti ad alcuni secondi di miscelazione tramite vortex e trasferiti su una apposita *plate* per essere sonicati.

Al termine, i campioni sono stati trasferiti in nuove eppendorf e sono stati centrifugati per 30 minuti a 12000g alla temperatura di 4°C (poiché le cellule a questo punto risultano lisate).

Infine, il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato risospeso con 200 µL di Sample Buffer 2X. I campioni sono stati bolliti per 10 minuti a 100° usando il termoblocco e da ogni campione sono stati prelevati 5 µL per eseguire una elettroforesi SDS-PAGE.

Quindi sono stati caricati su gel, insieme ad uno standard, i campioni:

a) Pre-indotto BL21
b) Pre-indotto Rosetta
c) BL21 indotto con 0,5mM IPTG a 37°C per 3 ore
d) Rosetta indotto con 0,5mM IPTG a 37°C per 3 ore

e) BL21 indotto con 0,1mM IPTG a 20°C per 16 ore

f) Rosetta indotto con 0,1mM IPTG a 20°C per 16 ore

g) BL21 indotto con 0,5mM IPTG a 20°C per 16 ore

h) Rosetta indotto con 0,5mM IPTG a 20°C per 16 ore.

2.4 SDS-PAGE

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil-solfato, meglio nota come SDS-PAGE, è una tecnica analitica molto utile per separare le proteine e che consente anche di visualizzarle. Nel caso della SDS-PAGE si include il sodio dodecil-solfato (SDS) nei tamponi di carica del gel e di elettroforesi; l'SDS è un detergente che denatura le strutture secondarie e le strutture terziarie che non presentano legami disolfuro e inoltre riveste le proteine di una carica negativa. La quantità di SDS legato a ciascuna proteina è proporzionale al suo peso molecolare e la velocità di migrazione attraverso il gel è inversamente proporzionale al logaritmo del peso molecolare. [4]

La mobilità attraverso il gel può essere influenzata da fattori come la fosforilazione della proteina o la presenza di molecole multimeriche. [3]

L'SDS-PAGE è un sistema in cui si prepara un gel discontinuo, in cui la parte sovrastante, definita *stacking*, ha una più bassa percentuale di poliacrilammide

rispetto alla porzione sottostante del gel, detta *running*. Le due parti presentano anche differenti valori di pH. La porzione dello *stacking* serve per 'allineare' le proteine prima di procedere con la loro effettiva separazione. [5]

Durante l'elettroforesi, i complessi SDS-proteina - carichi negativamente - migrano attraverso il gel poroso, le proteine più piccole riescono a passare attraverso i pori più rapidamente rispetto alle proteine di dimensioni maggiori. Al termine dell'elettroforesi, per visualizzare le proteine che sono state separate nel gel è stato usato il colorante Blu Comassie.

2.4.2 Colorazione e decolorazione del gel

Il gel è stato colorato immergendolo per circa 30 minuti in una vaschetta con Blu Comassie, in blanda agitazione;

Successivamente, il gel è stato decolorato rimuovendo il Comassie e ricoprendolo con Destain, lasciandolo ancora in blanda agitazione per circa 30 minuti.

Al termine, il gel è stato visualizzato utilizzando il *Chemidoc*.

2.5 Produzione di eIF4E su larga scala

Avendo osservato che la resa migliore in termini di produzione della proteina è stata ottenuta con le cellule del ceppo Rosetta, per la produzione su larga scala sono state prelevate dalla piastra descritta nel paragrafo 2.3 esclusivamente colonie del ceppo Rosetta. Le colonie prelevate sono state stemperate in falcon contenente LB+Amp+Clo per un volume totale di 5mL. Quando la coltura ha raggiunto una O.D. adeguata è stata inoculata per intero in una beuta di LB+Amp+Clo di volume pari a 500mL. La beuta è stata messa in incubatore a 37°C per circa tre ore in agitazione a 250 rpm, allo scopo di raggiungere il valore minimo di 0,6 di densità ottica prima di procedere con l'induzione con IPTG, analogamente a quanto descritto in precedenza per la produzione in piccola scala.

Dagli esperimenti condotti in piccola scala è emerso che la resa migliore è stata ottenuta con l'induzione a 37°C per tre ore, pertanto, su grande scala è stata eseguita solo questa modalità di induzione.

2.6 Purificazione ed estrazione eIF4E

Per la purificazione è stata effettuata inizialmente la tecnica Ni-NTA, che prevede l'uso di una resina composta di agarosio al 6% derivatizzato con acido Nitrilotriacetico (NTA), caricato con ioni nickel bivalenti. Gli ioni nickel legano selettivamente e ad alta affinità le istidine che costituiscono il tag all'N-terminale.

Per la purificazione il pellet ottenuto in precedenza è stato risospeso con un buffer di lisi così composto:

-Hepes a pH 7,8 → 25mM

-NaCl → 300mM

-Benzonasi → 4U/mL

-$MgCl_2$ → 1mM

-PMSF → 0,5mM

-TCEP → 0,5mM

-TRITON X-100 → 0,5%

Il campione è stato posto in agitazione per 10 minuti a 4°C e successivamente sonicato. Poi è stato sottoposto a centrifuga per trenta minuti, a 12000g, nuovamente alla temperatura di 4°C.

Il surnatante ottenuto, definito 'lisato chiarificato', è stato utilizzato per la prova di purificazione con la resina Ni-NTA. Ad esso sono stati aggiunti 500µL di resina e poi è stato sottoposto a centrifuga per un minuto a 800g. Il pellet ottenuto dalla precedente centrifugazione (12000g a 4°C per 30') invece è stato conservato a -80°C.

La resina è stata lavata poi con dieci volumi di colonna di H_2O ed è stata equilibrata con 5mL di buffer contenente Hepes (a pH 7,8) 25mM e NaCl 300mM. Il lavaggio è stato condotto per due volte.

Poi alla resina è stato aggiunto il lisato chiarificato e sono stati lasciati ad incubare per un'ora a 4°C, per favorire il binding tra il nickel e le istidine. Al termine dell'incubazione il lisato e la resina sono stati trasferiti su una colonna ed è stato raccolto il flow-through. Sono stati eseguiti dei lavaggi con il buffer precedentemente descritto per ridurre la presenza di eventuali aspecifici e sono state raccolte delle frazioni da 2mL di campione.

Infine, è stata fatta l'eluizione con buffer contenente:

-Hepes a pH 7,8 → 25mM

-NaCl → 300mM

-Imidazolo → 250mM

Da questo processo sono state raccolte dieci frazioni da 500µL ciascuna.

Dato che l'imidazolo compete con le istidine per il legame con gli ioni nickel favorisce il distacco della proteina d'interesse dalla resina. Quindi a seguito dell'ultimo passaggio la proteina dovrebbe essersi staccata dalla resina e dovrebbe essere presente nelle frazioni raccolte. Per confermare ciò sono state effettuate delle letture allo spettrofotometro a 280nm e una successiva SDS-PAGE.

2.6.2 Estrazione da corpi d'inclusione

Sulla base della letteratura e dell'esito del precedente esperimento è stato riscontrato che eIF4E precipita nei corpi di inclusione, quindi purificarla risulta difficile. Pertanto, è stato scelto di effettuare l'estrazione e la purificazione direttamente dai corpi di inclusione.

Sono necessari sei diversi tamponi:

<u>BUFFER A</u>: Vf=20mL

- Hepes a pH 7,8 → 20mM
- KCl → 300mM
- EDTA → 1mM
- DTT → 2mM
- Glicerolo → 10%

- Inibitori proteasi → 1X
- H_2O → portare a volume

<u>BUFFER B:</u> Vf=60mL

- Hepes a pH 7,8 → 20mM
- Guanidina → 1M
- Glicerolo → 10%
- DTT → 2mM
- H_2O → portare a volume

<u>BUFFER C</u>: Vf=20mL

- Hepes a pH 7,8 → 20mM
- Guanidina → 6M
- Glicerolo → 10%
- DTT → 2mM
- H_2O → portare a volume

<u>BUFFER D</u>: Vf=100mL

- Hepes a pH 7,8 → 20mM
- KCl → 300mM
- DTT → 2mM

- H_2O → portare a volume

<u>BUFFER E:</u> Vf=2L

- Hepes a pH 7,8 → 20mM
- KCl → 300mM
- H_2O → portare a volume

Il pellet ottenuto dalla produzione in larga scala è stato risospeso nel buffer A in proporzione di 10mL per grammo di cellule, è stato anche vortexato per alcuni secondi per favorirne la risospensione. Successivamente il campione è stato sonicato e poi centrifugato per trenta minuti a 12000g a 4°C (adoperando la centrifuga *Sorvall RC 6+ Thermo Scientific*).

Al termine il surnatante è stato trasferito in un'altra falcon e il pellet è stato risospeso in 20mL di buffer B.

A questo punto il campione è stato sottoposto a ultracentrifuga (*Optima L-90K* Beckman) a 19000rpm per 30 minuti a 4°C. La risospensione con buffer B è stata eseguita tre volte, prestando attenzione al corretto bilanciamento della centrifuga tra un passaggio e l'altro.

Poi il pellet è stato lavato con 10mL di buffer C.

Al termine dell'ultima centrifuga eIF4E si trova nel surnatante, assieme ad altre proteine, ed è denaturata.

2.7 Dialisi

Per rimuovere la guanidina utilizzata in precedenza è stata scelta la tecnica della dialisi. Quindi la quantità di agente solubilizzante rimasta nel campione si rimuove tramite filtrazione usando un tubo a membrana (Spectra/Por™) da 3,5 kDa di cutoff (6,4 ml/cm) ed è stato usato il buffer E descritto nel paragrafo precedente. Il campione è stato mantenuto in dialisi a 4°C overnight.

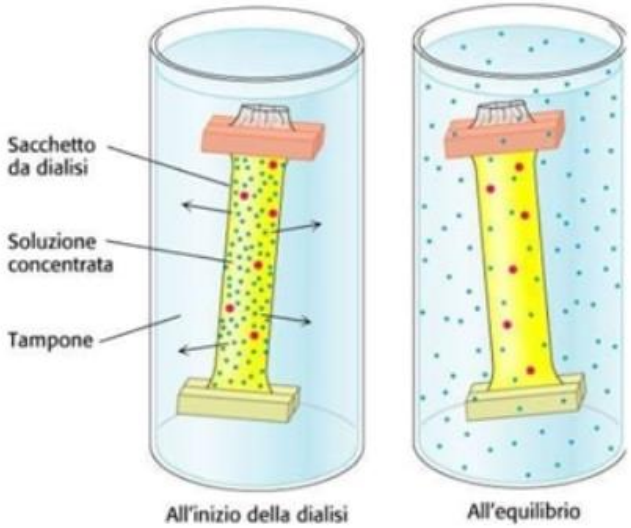


Fig.7 Dialisi

2.8 Concentrazione

Al termine della dialisi la proteina è stata concentrata mediante l'uso del concentratore *Centricon – Millipore* con cutoff di 10kDa (15mL).

Il campione è stato centrifugato in volumi di 15mL per volta a 2500g per un quarto d'ora alla temperatura di 4°C. È stato ottenuto un volume finale di circa 9mL.

Infine, è stata misurata la concentrazione della proteina tramite il saggio Bradford.

2.9 Cromatografia per gel-filtrazione

È stata eseguita una cromatografia per gel-filtrazione ad esclusione di taglia usando colonne HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-200 HR con un range di separazione di 5000-250000 Da e con un flow rate di 0,5 ml/min per purificare ulteriormente il campione.

Come primo step è stata effettuata una filtrazione preparativa con due volumi di colonna di H_2O e due volumi di equilibration buffer, così composto:

- Hepes a pH 7,8 → 20mM
- KCl → 300mM

La colonna poi è stata equilibrata con 0,05 volumi di colonna di equilibration buffer ed è stato caricato il campione concentrato. Poi è stata fatta l'eluizione raccogliendo frazioni da 2mL. Sul cromatogramma è stato poi visualizzato il picco corrispondente a eIF4E.

2.10 m^7GTP pull down assay

Per ulteriore conferma della corretta produzione del fattore eIF4E è stata condotta una prova di purificazione in cui si sfrutta l'affinità di legame tra il *cap* dell'mRNA e la resina 7-metil-GTP sefarosio sui campioni di lisati chiarificati ottenuti come descritto nel paragrafo 2.6.

Sono stati utilizzati 30µL di beads, ma essendo in etanolo sono stati necessari dei passaggi, ripetuti per tre volte, per equilibrarle: è stata eseguita una centrifuga per un minuto a 1000g, seguita da un minuto di riposo in ghiaccio, al fine di consentire la sedimentazione delle beads; poi lo strato di etanolo separatosi in seguito alla centrifuga è stato delicatamente aspirato con una pipetta; infine, è stato fatto un lavaggio con 500µL di wash buffer, così composto:

- Tris HCl a pH 7,4 → 50mM
- KCl → 100mM

- $MgCl_2$ → 5mM
- Triton X-100 → 0,5%
- Inibitori di proteasi → 1X
- H_2O → portare a volume

Poi le beads sono state saturate con 50µL di BSA 0,1mg/mL in 450µL di wash buffer, per un'ora in agitazione a 4°C.

Dopodiché sono state eseguite nuovamente due centrifughe da un minuto a 1000g, intervallate da un lavaggio con 500µL di wash buffer. A questo punto è stata delicatamente rimossa la piccola quantità di etanolo ancora presente.

Successivamente, a ciascuno dei campioni è stato aggiunto wash buffer, 5µL di GTP e il lisato chiarificato precedentemente scongelato e sono stati messi ad incubare per un'ora e mezza a 4°C in rotazione. È stata poi eseguita una centrifugazione a 1000g per un minuto ed è stato recuperato il surnatante. Poi sono stati fatti tre lavaggi consecutivi con 500µL di wash buffer. Infine, l'eluizione è stata fatta con 60µL di m7GTP 250µM, in rotazione per 30 minuti a 4°C. Al termine è stata fatta un'ulteriore centrifugazione, il surnatante è stato recuperato e i campioni sono stati usati per una SDS-PAGE.

2.11 Coltura cellule eucariotiche A549

Sono state preparate, a partire da uno stock conservato a -80°C, delle colture di cellule eucariotiche A549 da utilizzare per esperimenti di misurazione dell'espressione proteica.

Le A549 sono cellule epiteliali tumorali di polmone, che crescono in adesione.

Sono state scongelate rapidamente, per evitare danni da shock termico, ponendo la eppendorf per un tempo massimo di due minuti nel bagnetto riscaldato a 37°C.

Poi sotto cappa è stata preparata una flask T25 con 5mL di terreno e 1mL di cellule ed è stata messa ad incubare overnight a 37°C con il 5% di CO_2.

Il terreno usato per tale coltura è il D-MEM, contenente glucosio, glutammina, piruvato di sodio e bicarbonato di sodio.

2.11.2 Passaggio cellule A549 in adesione

Sulla base della letteratura è stato stabilito di eseguire gli esperimenti di espressione proteica tra il quarto ed il quinto passaggio di propagazione della coltura cellulare. Pertanto, dal momento dello scongelamento e dell'avvio di una nuova coltura è stato necessario seguire per vari giorni il protocollo in seguito

descritto, per far sì che le cellule restassero vive e non raggiungessero mai la confluenza.

Per propagare la coltura precedentemente descritta, avviata a partire dalle cellule scongelate dallo stock e incubata overnight, è stato scaldato nel bagnetto termostatato il terreno D-MEM, un'aliquota di tripsina ed il PBS (tampone fosfato). La flask lasciata ad incubare il giorno precedente è stata prelevata dall'incubatore e portata sotto cappa.

Tutto il terreno è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con 5mL di PBS; successivamente è stato aggiunto in flask 1mL di tripsina, per favorire il distaccamento delle cellule tra loro e dalle pareti del contenitore.

Il tempo d'azione ottimale per la tripsina varia da coltura a coltura, in questo caso è stata lasciata a contatto con le cellule per dieci minuti.

Per bloccare l'attività della tripsina sono stati aggiunti alla coltura 4mL di D-MEM nuovo ed il tutto è stato trasferito in falcon. È stato prelevato 1mL di campione da osservare al microscopio per eseguire la conta cellulare.

Poi la falcon è stata centrifugata per 5 minuti a 500g, il surnatante è stato eliminato quasi completamente, solo alcuni microlitri sono stati conservati per risospendere il pellet. Al pellet sono stati aggiunti 5mL di terreno nuovo e da questa provetta è stata prelevata una quantità di cellule stabilità sulla base dei

calcoli eseguiti al microscopio, i quali tengono conto sempre del fattore di diluizione.

Le cellule prelevate sono state trasferite in una nuova flask già preparata con adeguato volume di terreno D-MEM, per un volume finale di 5mL.

Questo protocollo è stato ripetuto nel tempo fino al quinto passaggio, momento in cui le cellule in coltura sono state utilizzate per allestire l'esperimento SUnSET.

2.12 SUnSET

Il saggio SUnSET (Surface sensing of translation) è una tecnica non radioattiva per monitorare la sintesi proteica, alternativa ai classici metodi basati sulla marcatura radioattiva [6].

Per la messa a punto dell'esperimento è stata fatta una prima prova su lisato cellulare, per definire le condizioni operative più idonee, valutando differenti tempi e concentrazioni di puromicina, poiché variano in base alla linea cellulare utilizzata. Per l'esperimento vero e proprio sono state usate le A549, ad una confluenza del 60-80% circa ed il peptide Cy_9B.

Per la prova è stata usata una piastra multi-well da 24 pozzetti ma ne sono stati utilizzati solo quattro per la prima riga, contenenti ciascuno 50000 cellule e

500µL di D-MEM e quattro per la seconda, contenenti 100000 cellule e 500µL di D-MEM. La multi-well è stata messa ad incubare overnight in incubatore a 37°C con il 5% di CO_2. Il giorno seguente da ogni pozzetto è stato rimosso tutto il terreno e sostituito con terreno nuovo.

Poi ai pozzetti della prima riga è stata aggiunta puromicina 20µM ed ai pozzetti della seconda riga è stata aggiunta puromicina 2µM; la puromicina è un antibiotico analogo strutturale dell'aminoacil-tRNA, che viene incorporato nelle catene polipeptidiche nascenti e ne ostacola l'allungamento.

Poi la multi-well è stata messa in incubatore a 37°C con il 5% di CO_2.

Da questo momento ogni pozzetto ha subito un trattamento a tempi differenti: dopo mezz'ora è terminato il tempo di incubazione del primo, dopo un'ora del secondo, dopo due ore del terzo e l'ultimo è stato lasciato ad incubare overnight. Al termine dei diversi tempi di incubazione, da ciascun pozzetto è stato rimosso il terreno ed eseguito un lavaggio con 500µL di PBS, immediatamente rimosso. Poi sono stati aggiunti 100µL di tripsina, lasciata ad agire per dieci minuti; la tripsina è stata neutralizzata con 300µL di D-MEM nuovo e il contenuto del pozzetto è stato trasferito in eppendorf, che è stata sottoposta a centrifugazione per due minuti a 6000g.

Tutte le operazioni descritte finora sono state condotte sottocappa a temperatura ambiente, quelle descritte in seguito sono state invece condotte in ghiaccio.

Al termine della centrifuga i campioni sono stati lavati con 500µL di PBS e sono state fatte tre centrifughe da due minuti ciascuna, a 6000g.

Ad ogni provetta sono stati aggiunti 50µL di RIPA buffer, descritto nella tabella sottostante (Tabella 2). I campioni poi sono stati vortexati per dieci secondi ognuno, ogni cinque minuti, nell'arco di mezz'ora. In seguito, i campioni sono stati centrifugati a 12000g per dieci minuti, a 4°C. Il surnatante è stato prelevato e trasferito in nuove eppendorf, per eseguire un saggio di Bradford. I pellet invece sono stati eliminati, trattandosi di scarti e detriti.

Per il saggio di Bradford sono stati usati 2µL di campione, uniti a 498µL di acqua e 500µL di reattivo di Bradford, ed è stata misurata l'O.D. 600

Poi i campioni sono stati caricati su gel d'acrilammide.

Come condizione migliore è stata individuata l'incubazione con 2µM di puromicina quindi l'esperimento col peptide è stato eseguito seguendo questo protocollo e utilizzando anche 4EGI 100µM come controllo positivo, essendo la molecola maggiormente caratterizzata in grado di disaccoppiare il complesso 4E/4G e l'anisomicina 40µM come controllo negativo, molecola che blocca l'inizio della traduzione.

È stata nuovamente preparata una multi-well con tre file di pozzetti da 50000 cellule, tutte sospese in 500µL di D-MEM, per testare tempi differenti di incubazione (2h, 6h, 24h), come descritto in precedenza. La piastra è stata messa ad incubare overnight a 37°C con il 5% di CO_2.

Il giorno seguente le cellule presentavano una confluenza ottimale (60-80%).

Per ogni fila, nel primo pozzetto è stata aggiunta anisomicina e nell'ultimo 4EGI. Il secondo pozzetto non è stato trattato col peptide, mentre nei pozzetti tre, quattro e cinque sono state aggiunte concentrazioni crescenti di Cy_9B, rispettivamente:

-2,5µL Cy_9B → cioè 25µM

-5µL Cy_9B → cioè 50µM

-10µL Cy_9B → cioè 100µM

Poi la multi-well è stata messa in incubatore per 30' a 37°C con il 5% di CO_2.

Al termine del tempo di incubazione è stato rimosso tutto il terreno e sono stati fatti due lavaggi con 500µL di PBS ciascuno. Poi ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 500µL di una miscela di terreno D-MEM e puromicina 2µM.

La multi-well è stata nuovamente lasciata ad incubare per 30' alle condizioni precedentemente descritte. Al termine, è stato rimosso il terreno ed eseguito un

lavaggio con 500µL di PBS. Ai pozzetti sono stati aggiunti 100µL di tripsina, lasciata ad agire per dieci minuti. La tripsina è stata neutralizzata con 300µL di D-MEM nuovo e il contenuto dei pozzetti è stato trasferito in quattro eppendorf, le quali sono state sottoposte a centrifugazione per due minuti a 6000g.

Al termine della centrifuga i campioni sono stati lavati con 500µL di PBS a 4°C e sono state fatte tre centrifughe da due minuti ciascuna, a 6000g e poi è stato aggiunto il RIPA buffer. I campioni poi sono stati vortexati come descritto in precedenza. In seguito, sono stati centrifugati a 12000g per dieci minuti, a 4°C ed è stato recuperato il surnatante.

Per il saggio di Bradford anche in questo caso sono stati usati 2µL di campione, uniti a 498µL di acqua e 500µL di reattivo di Bradford, ed è stata misurata l'O.D. 600.

Le concentrazioni sono risultate le seguenti:

1) 0µM peptide → 0,83
2) 25µM peptide → 0,92
3) 50µM peptide → 0,65
4) 100µM peptide → 0,81

Le concentrazioni calcolate sono servite per determinare quanto campione caricare su gel d'acrilammide, stabilendo di voler caricare per ciascun pozzetto 40µL di volume finale.

Volendo una concentrazione finale di 20µg per campione sono state divise le concentrazioni ottenute per 20 e al valore ottenuto sono stati addizionati in proporzioni adatte il RIPA buffer e il Sample Buffer 2X.

I campioni sono stati caricati su un gel d'acrilammide al 12%.

NaCl	150mM
Nonidet	1%
Doc	0,5%
SDS	0,1%
Tris HCl pH 7,4	25mM

Tab.2 RIPA Buffer

2.13 Western Blot

È stato eseguito un Western Blot, tramite trasferimento semi-dry utilizzando il Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad), per identificare la proteina eIF4E usando anticorpi anti-puromicina e anti-GADPH. Dopo la corsa

elettroforetica il gel è stato equilibrato con tampone di trasferimento 1X, che contiene 20-30% etanolo. Le membrane di trasferimento sono state attivate immergendole per circa venti secondi in acqua sterile deionizzata e successivamente sono state anch'esse equilibrate con lo stesso tampone utilizzato per il gel.

Tre fogli di nitrocellulosa da 3mm sono stati immersi in una vaschetta contenente tampone di trasferimento e poi sono stati posti sul fondo del cassetto del trans-blot; sopra a tali fogli è stata posizionata la membrana di trasferimento e al di sopra è stato posizionato il gel, ricoperto da tre ulteriori fogli di nitrocellulosa. È stato avviato il programma standard (SD), della durata di circa 30 minuti.

La membrana è stata poi saturata con TBST-Milk al 5%, cioè TBST (soluzione salina tamponata con tris e Tween) e siero di latte.

La membrana di trasferimento è stata posta in una vaschetta per eseguire la colorazione con il colorante Ponceau, lasciato ad agire per dieci minuti in agitazione blanda, e poi è stata decolorata con acqua deionizzata.

Successivamente, la membrana è stata tagliata a metà in modo tale da ottenere una membrana contenente i campioni di controllo e metà dello standard ed

un’altra membrana con i campioni d’interesse e metà dello standard, dato che ciascun gruppo di campioni doveva essere trattato con uno specifico anticorpo.

Le membrane sono state poste in due vaschette con 10mL di TBST-Milk ciascuna, lasciandole a incubare per circa due ore a 37°C. In seguito, è stato rimosso il TBST-Milk ed eseguito un lavaggio con TBST, lasciandolo agire per cinque minuti in leggera agitazione.

A questo punto la membrana dei campioni di controllo (GAPDH) è stata ricoperta con 4mL di TBST-BSA all’1%, perché l’anticorpo anti-GAPDH va 1:2000 e la membrana dei campioni trattati con puromicina è stata ricoperta con 10mL di TBST-Milk poiché l’anticorpo anti-puromicina va messo 1:10000.

Alle membrane sono stati successivamente addizionati i rispettivi anticorpi: 1µL di anticorpo anti-puromicina e 2µL di anticorpo anti-GAPDH. Sono state chiuse e lasciate ad incubare al buio overnight in agitazione a 400rpm alla temperatura di 4°C.

Il giorno seguente da ciascuna vaschetta è stato rimosso il liquido contenente gli anticorpi primari e sono stati eseguiti tre lavaggi con TBST, ponendo le vaschette in agitazione sul vortex.

Sono stati aggiunti poi a ciascuna vaschetta gli anticorpi secondari, entrambi da disciogliere in 10mL di TBST-BSA al 3% ed entrambi legati alla perossidasi di

rafano, utilizzata in seguito come sistema di rivelazione chemiluminescente. Ai campioni di controllo è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-rabbit e ai campioni d'interesse è stato aggiunto l'anti-mouse e poi sono stati messi ad incubare per un'ora a 37°C a 25 rpm.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Prova di induzione in piccola scala

I plasmidi pMCSG7+eIF4E ricombinanti, ottenuti tramite clonaggio LIC ed estratti e purificati dalle cellule competenti GC-5, sono stati introdotti, mediante trasformazione, nelle cellule batteriche al fine di ottenere alti livelli di espressione. Sono stati testati i ceppi di *E.Coli* BL21 e Rosetta, per valutare quale dei due consentisse di ottenere una resa migliore del fattore di inizio eIF4E. I due ceppi sono stati indotti con concentrazioni differenti di IPTG e a temperature differenti:

- 37°C per 3 ore con IPTG 0,5mM
- 20°C per 16 ore con IPTG 0,1mM
- 20°C per 16 ore con IPTG 0,5mM

In ciascuno dei i casi l'IPTG ha consentito una regolazione dell'espressione di 4E, dato che sia nelle cellule BL21 che nelle cellule Rosetta era presente il sistema pET, costituito da vettori contenenti il promotore *lac*.

Dagli esperimenti è emerso che la condizione che ha portato a risultati migliori è stata l'induzione a 37°C per 3 ore con IPTG 0,5mM in cellule Rosetta.

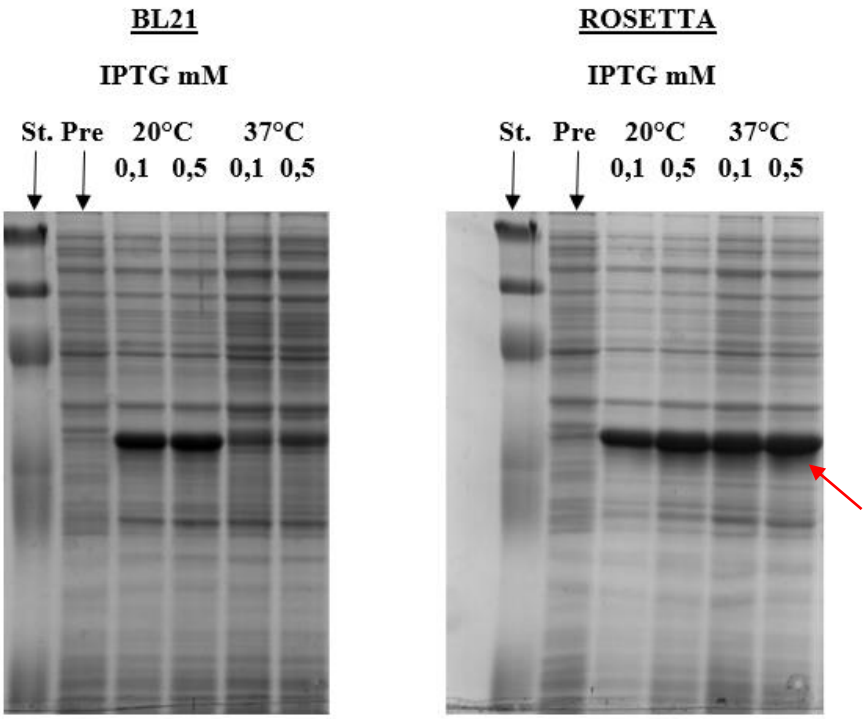


Fig.8 Elettroforesi su gel d'acrilammide

3.2 Test di solubilità

Sulla base della letteratura e degli esperimenti condotti è stato riscontrato che il fattore di inizio eIF4E prodotto ed espresso in *E.Coli* viene depositato in corpi di inclusione. Essi sono aggregati proteici insolubili, che solitamente si formano come conseguenza di alti livelli di espressione proteica e di folding scorretto della proteina stessa [9]. Quindi dopo aver prodotto la proteina è stato eseguito un test di solubilità, cioè mediante SDS-PAGE è stata verificata la presenza di 4E nel surnatante o nel pellet, i quali erano stati precedentemente separati e

caricati separatamente, in presenza dello standard *Blue Easy Prestained Protein Marker*.

3.3 Cromatografia per affinità

Dopo aver individuato le condizioni ottimali per la produzione della proteina eIF4E in larga scala è stata eseguita una prima prova di purificazione tramite cromatografia per affinità, utilizzando la resina Ni-NTA, come descritto nel paragrafo 2.6. Però la presenza di 4E non è stata riscontrata, pertanto i risultati non vengono riportati. Ciò conferma quanto riportato in letteratura, ossia che eIF4E precipita nei corpi di inclusione. Quindi, per la sua estrazione è stato seguito un protocollo di estrazione da corpi di inclusione.

3.4 Estrazione da corpi di inclusione

La formazione di corpi di inclusione è determinata dal non corretto ripiegamento della proteina eterologa e anche da componenti proteiche dell'ospite che vengono inglobate nell'aggregato in fase di formazione.

La formazione dei corpi di inclusione non è da considerarsi sempre un fenomeno negativo, in quanto in alcuni casi consente di proteggere la cellula ospite se la proteina espressa risulta tossica.

In *E.Coli* i corpi di inclusione si accumulano a livello intracellulare sottoforma di particelle di dimensioni comprese tra 0,2 e 1,5µM [7].

Solitamente quando il livello di espressione proteica supera il 2% del totale delle proteine cellulari dell'ospite si va incontro alla formazione di corpi di inclusione [8]. Per l'estrazione di eIF4E dai corpi di inclusione è stato sato come agente denaturante il cloruro di guanidinio, il quale ad elevate concentrazioni (fino a 6M) rompe i legami idrofobici e i legami idrogeno delle proteine, portando alla loro denaturazione [10]. Successivamente, la proteina denaturata è stata separata da eventuali contaminanti tramite centrifugazione e poi è stata diluita per poi poter essere rinaturata attraverso un processo di dialisi.

È stata eseguita una rinaturazione lenta, variando nel tempo le concentrazioni di denaturante. Infine, per valutare la resa finale dello step di refolding sono state prelevate due aliquote di campioni post-dializzato e sono state sottoposte a SDS-PAGE.

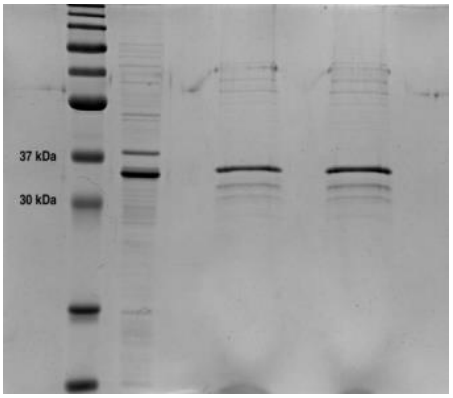


Fig.9 SDS-PAGE post-dialisi

Il gel mostra la presenza di 4E, quindi conferma la corretta estrazione del fattore dai corpi di inclusione, ma è possibile notare che oltre a eIF4E sono presenti altre bande; pertanto, è stata eseguita una ulteriore purificazione tramite gel-cromatografia.

3.5 Cromatografia per gel-filtrazione

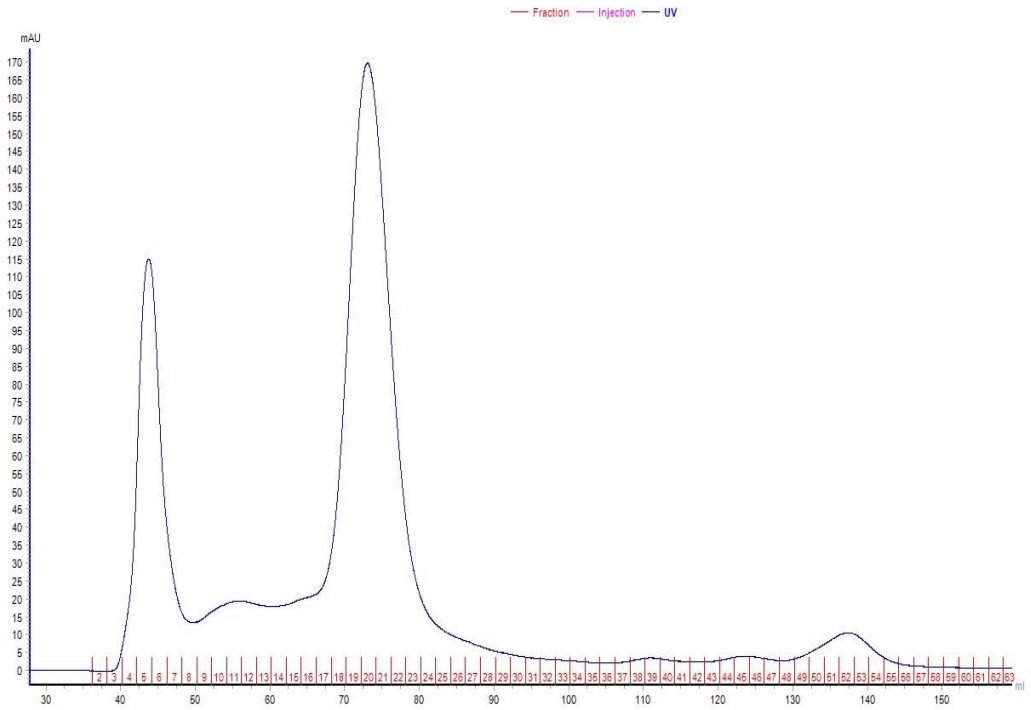


Fig.10 Gel-cromatografia

Il risultato della gel-cromatografia, eseguita come descritto nel paragrafo 2.9, mostra due picchi, il secondo dei quali comprende le frazioni 18-23 che sono quelle corrispondenti a eIF4E.

Le frazioni corrispondenti a questo picco sono state unite e concentrate, per formare il pool di 4E, con una concentrazione di proteina di 1mg/mL.

3.6 Saggio m^7GTP pull down

È stato eseguito un saggio m^7GTP pull down per valutare se la proteina eIF4E ricombinante prodotta si fosse ripiegata correttamente e se fosse quindi attiva, cioè in grado di svolgere la sua funzione primaria di legare il *cap*. Il saggio è stato condotto in condizioni non denaturanti, per preservare le interazioni proteina-proteina e le modificazioni post-traduzionali. I risultati sono stati analizzati mediante SDS-PAGE.

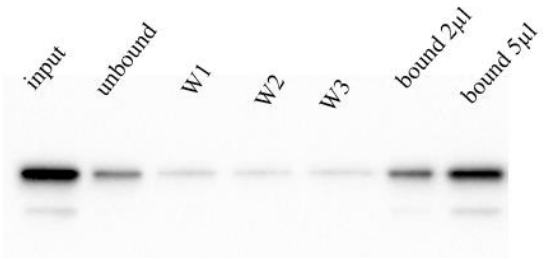


Fig.14 SDS-PAGE di eIF4E purificato

I risultati mostrano la presenza di eIF4E nell'eluato, ciò indica che c'è stata interazione tra tale fattore e la resina utilizzata, confermando quindi che il fattore 4E prodotto risulta attivo poiché lega bene il *cap* il quale a sua volta lega la resina 7-metil-GTP sefarosio.

3.7 SUnSET assay

Per valutare l'effetto del peptide Cy_9B sulla traduzione è stato eseguito un saggio SUnSET, una tecnica non radioattiva alternativa alle varie metodiche esistenti maggiormente diffuse. È stata condotta una prima prova su lisato cellulare per stabilire un protocollo adatto alla linea cellulare scelta, valutando differenti tempi e concentrazioni di inibitore della traduzione.

I campioni ottenuti sono stati caricati su gel d'acrilammide e poi è stato eseguito un Western Blot, per valutare quale fosse il protocollo migliore da seguire per testare l'effetto del peptide Cy_9B. Inoltre, è stata eseguita anche una colorazione della membrana di nitrocellulosa con il colorante Rosso Ponceau; il Ponceau è un colorante fortemente elettronegativo che si lega ai gruppi amminici delle proteine e alle regioni non covalenti e non polarizzate.

PUROMICINA 20µM **PUROMICINA 2µM**

30’ 1H 2H ON 30’ 1H 2H ON

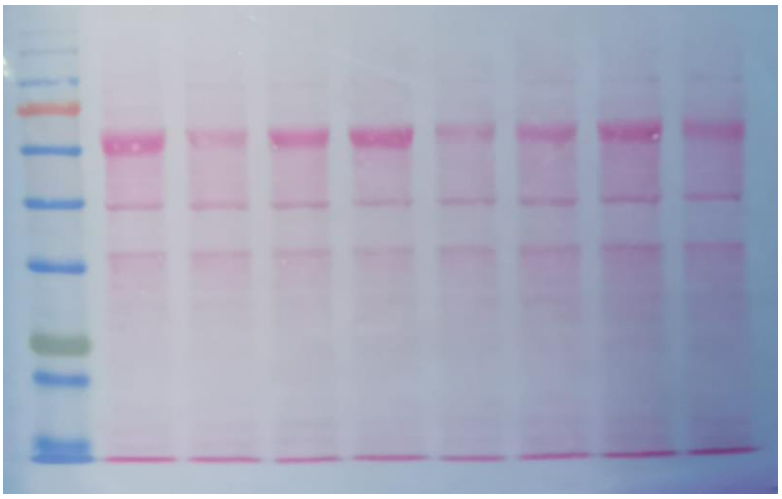


Fig.12 Ponceau prova SUnSET con Puromicina

PUROMICINA 20µM **PUROMICINA 2µM**

30’ 1H 2H ON 30’ 1H 2H ON

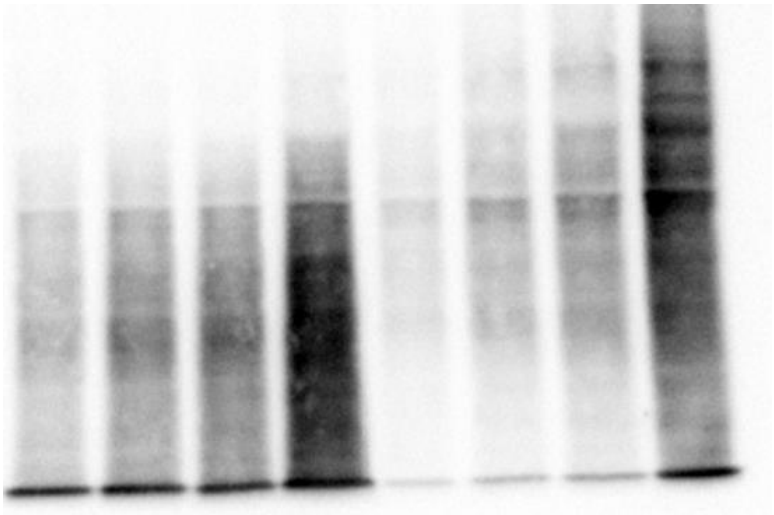


Fig.13 Western Blot prova SUnSET con Puromicina

Il SUnSET con Cy_9B è stato condotto su cellule A549, cioè cellule tumorali epiteliali di polmone che crescono in adesione. Sono state usate per l'esperimento cellule al quinto passaggio, al 70% circa di confluenza. Inoltre, è stata usata l'anisomicina come controllo negativo e il 4EGI come controllo positivo. Dai risultati il peptide sembra funzionare, in particolar modo alle concentrazioni 25µM e 50µM per 24h.

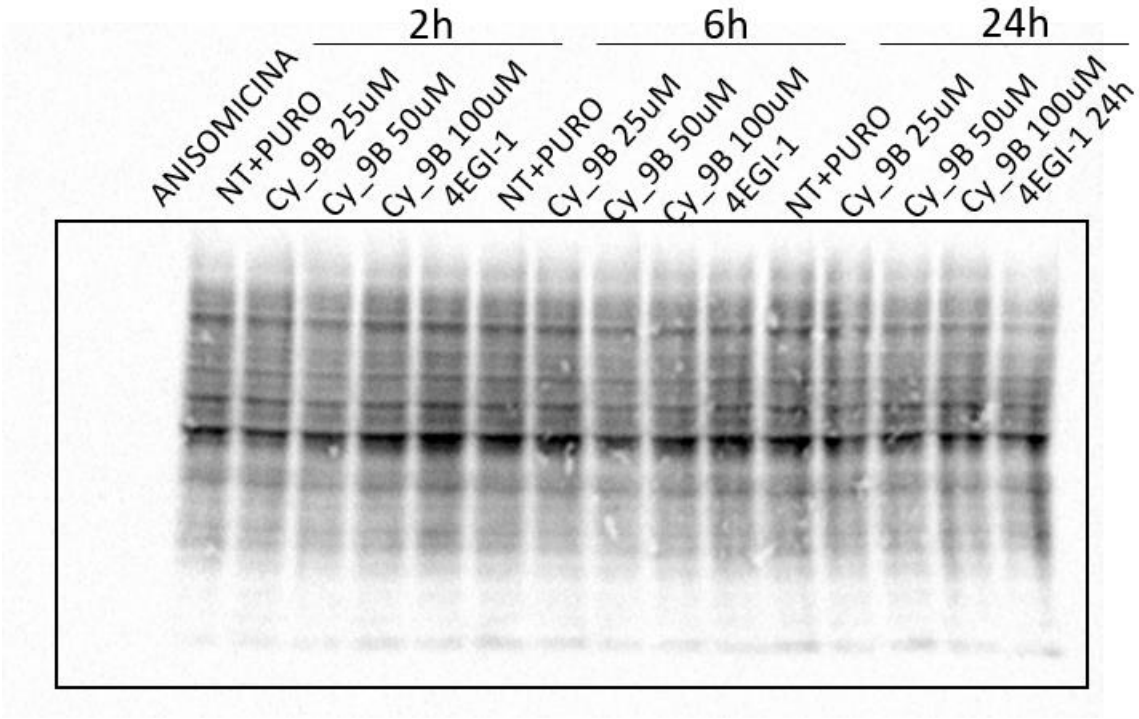


Fig.14 Western Blot SUnSET

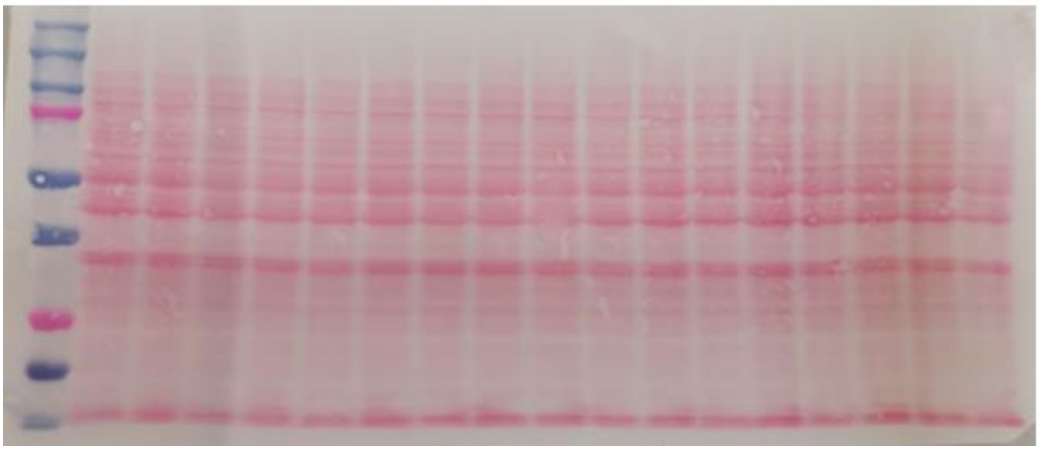
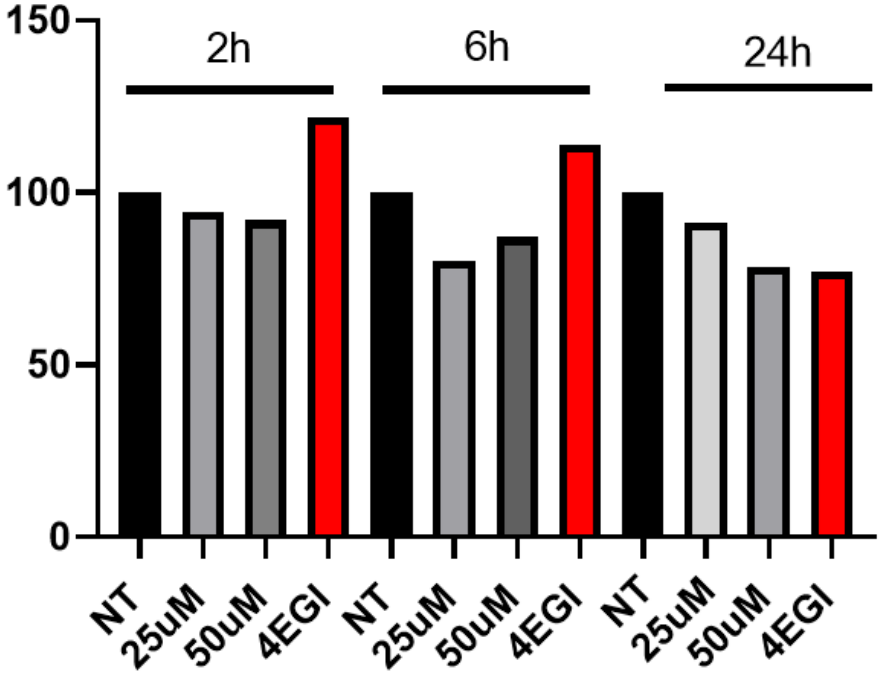


Fig.15 Ponceau SUnSET



3.8 Western blot

È stato eseguito un Western Blot in cui sono stati utilizzati anticorpi primari anti-GADPH (controllo) e anti-puromicina. In figura sono mostrati:

nell'immagine di sinistra lo standard di peso proteico (1) e la proteina visualizzata tramite SDS-PAGE; nell'immagine di destra invece sono riportati l'immunoblot di eIF4E purificato con l'anticorpo anti-GADPH (3) e l'immunoblot di eIF4E purificato con l'anticorpo anti-puromicina (4).

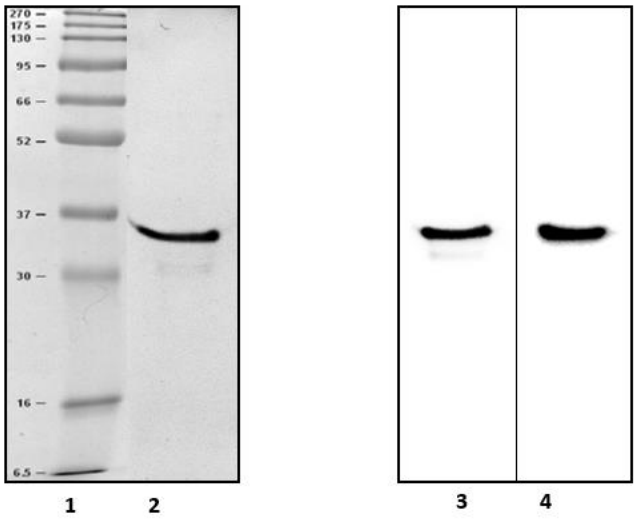


Fig.16 visualizzazione eIF4E

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

Il fattore di inizio della traduzione eIF4E è una proteina eucariotica costituita da 217 amminoacidi e con un peso molecolare di 25KDa. Il suo ruolo principale è quello di legare il *cap*, ossia una particolare struttura presente al 5' di alcuni mRNA che ne facilita il legame con la subunità 40S del ribosoma, consentendo quindi l'avvio della traduzione proteica.

Perciò, il fattore 4E riveste un ruolo centrale nel controllo dell'inizio della traduzione, specialmente nei casi in cui una deregolazione della sintesi proteica può causare gravi conseguenze, favorendo la progressione di patologie, come nel caso dei tumori.

eIF4E è stato prodotto come fattore ricombinante presso il laboratorio MaSBiC (Università Politecnica delle Marche - Ancona) mediante vari esperimenti che hanno richiesto numerosi tentativi per individuare le condizioni ottimali di espressione. eIF4E è stato espresso in cellule Rosetta, indotte con una concentrazione 0,5mM di IPTG per 3 ore a 37°C, dopo aver testato anche altre condizioni operative in piccola scala. Per quanto riguarda la sua purificazione è stato necessario tentare diverse strategie, per giungere alla conclusione,

supportata anche dalla letteratura, che quella ideale fosse purificare 4E direttamente dai corpi di inclusione. Tale fattore, infatti, precipita facilmente a formare questi aggregati. È stato osservato anche che la temperatura ottimale per lavorare con eIF4E per preservarne la stabilità fosse pari a 4°C.

Il fattore eIF4E ricombinante prodotto è stato inoltre saggiato tramite m^7GTP pull down per testarne l'attività, ossia la capacità di legare il *cap*.
Successivamente il 4E è stato utilizzato anche per studi di binding *in vitro*, per valutare la K_D di interazione con un peptidomimetico, progettato e disegnato dal Prof. Daniele Di Marino. Questo peptide è stato chiamato Cy_9B ed è stato ideato sulla base delle informazioni strutturali relative alla famiglia delle 4E-BPs. Tale peptide, proprio come le 4E-BPs, si lega al fattore 4E, occupando il posto di eIF4G e inibisce la formazione del complesso eIF4F.

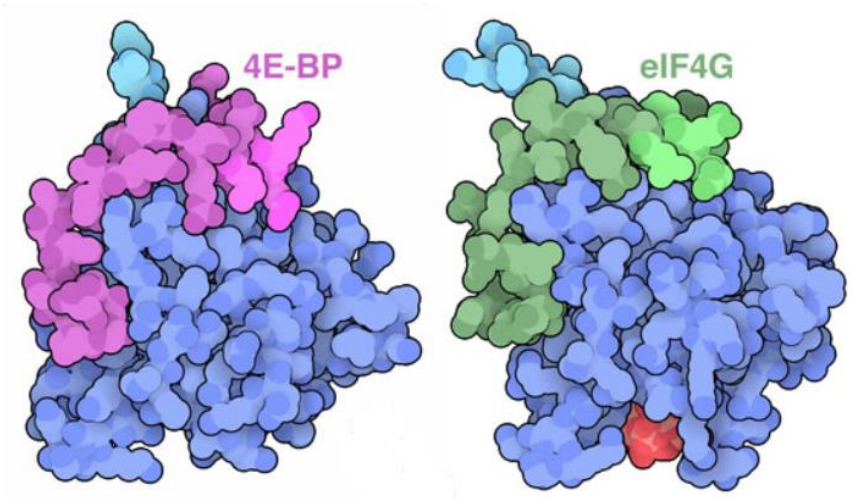


Fig.17 eIF4E e 4E-BP/eIF4G

eIF4G e le 4E-BPs hanno un dominio comune YXXXXLΦ (dove X indica qualsiasi residuo e Φ indica un qualsiasi residuo idrofobico) ma le 4E-BPs hanno un'affinità per il sito di tre volte maggiore rispetto al 4G [11].

Inoltre, l'interazione tra 4E e le 4E-BPs non interferisce con l'interazione tra 4E ed il *cap* [12]. Il legame tra le 4E-BPs e 4E dipende dal loro stato di fosforilazione. È stato osservato che quando le 4E-BPs sono defosforilate si legano a eIF4E nel sito in cui dovrebbe legarsi il complesso eIF4G per formare, assieme al fattore eIF4A, il complesso eIF4F; questo si traduce in un arresto della traduzione.

La soppressione della traduzione determinata dal legame di queste molecole su 4E ha suscitato interesse nell'ambito delle terapie antitumorali e perciò si è pensato di progettare e testare dei farmaci, definiti *peptidomimetici*, in grado di compiere la stessa attività delle 4E-BPs, come il peptide Cy_9B.

È stata testata la funzionalità di tale peptide tramite il saggio SUnSET, dopo aver messo a punto un protocollo adeguato, testando differenti concentrazioni di puromicina, un antibiotico analogo strutturale dell'aminoacil-tRNA, che viene incorporato nelle catene polipeptidiche nascenti e ne ostacola l'allungamento, e variando i tempi di incubazione.

Il risultato atteso era un evidente arresto dell'espressione proteica nelle cellule trattate con Cy_9B. Questo tipo di esperimento necessita di essere ulteriormente perfezionato dal punto di vista operativo, per definire le condizioni migliori per far sì che il peptidomimetico testato risulti efficace nel bloccare la traduzione.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

Il fattore di inizio della traduzione eIF4E ha un ruolo chiave nella regolazione della traduzione eucariotica. La sua presenza nelle cellule è essenziale per consentire la formazione del complesso eIF4F, responsabile del reclutamento dell'mRNA sul ribosoma. Nello specifico, inoltre, eIF4E riconosce e lega il *cap*, una particolare struttura chimica presente al 5' di alcuni mRNA definiti eIF4E-sensibili. È stato dimostrato che una over-espressione di 4E ha effetti drammatici sulla crescita cellulare e può portare alla trasformazione oncogenica. Lo scopo di questa tesi era di testare la capacità di binding con 4E di un peptidomimetico, progettato sulla base delle informazioni strutturali relative alle 4E binding proteins. Le 4E-BPs fungono da regolatrici dell'attività di 4E in quanto sono in grado di andare ad occupare lo stesso sito di legame in cui si lega il fattore eIF4G. Se 4G non si lega con 4E non avviene la formazione del complesso 4F (del quale fa parte anche il fattore eIF4A) e quindi non ci sarà traduzione.

Il fattore di inizio utilizzato per gli esperimenti in oggetto di questa tesi è stato prodotto utilizzando come sistema di espressione il ceppo di *E.Coli* Rosetta,

dotato di un sistema di plasmidi pET, inducibile con IPTG. È stato anche osservato che eIF4E è una proteina piuttosto instabile se non mantenuta a 4°C e in seguito alla produzione precipitava nei corpi di inclusione. Per la purificazione è stata fatta una prova sfruttando la cromatografia per affinità con resina Ni-NTA ma non è andata a buon fine; quindi, è stata eseguita una estrazione e purificazione diretta dai corpi di inclusione.

Successivamente è stato condotto un saggio m^7GTP per verificare l'effettiva funzionalità del 4E prodotto e tale esperimento ha dimostrato che il 4E prodotto era in grado di legare la resina, quindi di legare il *cap*. Infine, la parte finale di questo lavoro aveva come obiettivo quello di testare la funzionalità del peptide Cy_9B, progettato dal Prof. Di Marino sulla base di una particolare 4E-BP, ossia la CYFIP1, la quale interagisce con 4E tramite una sequenza poco conservata, non condivisa dalle altre 4E-BPs. Cy_9B avrebbe dovuto presumibilmente inibire l'espressione proteica, comportandosi in maniera analoga alle 4E-BPs, ossia occupando il sito di legame di eIF4G, precludendo quindi la formazione del complesso 4F. Questa capacità è stata valutata eseguendo un saggio SUnSET, messo a punto facendo prima delle prove con puromicina a differenti concentrazioni e tempi di incubazione.

Gli esperimenti eseguiti necessitano di essere migliorati dal punto di vista operativo, ma confermano l'efficacia del peptide *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

[1] Biologia Molecolare del gene - J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick.

[2] Cap-Dependent Translation Initiation Factor eIF4E: An Emerging Anticancer Drug Target - Y. Jia, V. Polunovsky, P. B. Bitterman, C. R. Wagner.

[3] One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE) – J. L. Brunelle, R. Green.

[4] Fondamenti di biologia molecolare – L.A. Allison

[5] One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE) – J.L. Brunelle, R. Green

[6] SunSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis – E. K. Schmidt, G. Clavarino, M. Ceppi, P. Pierre

[7] Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process – A. Singh, V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, A. K. Panda

[8] Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation – A. Mitraki, B. Fane, C. Haase-Pettingell, J. Sturtevant, J. King

[9] Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half – U. Rinas, E. Fruitós, J. Corchero, E. Vázquez, J. Franzoso, A. Villaverde.

[10] Folding and Purification of Insoluble (Inclusion Body) Proteins from Escherichia coli – P.T. Wingfield, I. Palmer, S.M. Liang

[11] Structural insights into the allosteric effects of 4EBP1 on the eukaryotic translation initiation factor eIF4E – N. Siddiqui, W. Tempel, L. Nedyalkova, L. Volpon, A. K. Wernimont, M. J. Osborne, H.W. Park, and K. Borden

[12] High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding and inhibits translation – K. Mochizuki, A. Oguro, T. Ohtsu, N. Sonenberg, Y. Nakamura