



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

Curriculum

Tecnologie biologiche

Enzimi chiave nella pandemia da COVID-19 e nella chimica "verde": il caso della proteasi
principale di SARS-CoV-2 e della cutina sintasi CSY

Key enzymes in the COVID-19 pandemic and "green" chemistry: the case of the main
SARS-CoV-2 protease and CSY cutin synthase

Candidato:

Maria Claudia Cedri

Relatore:

Paolo Mariani

Correlatore:

Lucia Silvestrini

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

1. SCOPO DELLA TESI - - - - -	4
2. INTRODUZIONE - - - - -	5
2.1. Origine della pandemia - - - - -	6
2.2. Coronavirus - - - - -	7
2.3. Infezione e ciclo virale - - - - -	8
2.4. Strategie per il contenimento della pandemia - - - - -	14
2.5. La proteas principale dl SARS-CoV-2 - - - - -	16
2.6. HIV - - - - -	20
2.7. Impatto del SARS-CoV-2 sull'ambiente - - - - -	21
2.8. La cutina sintasi CSY - - - - -	23
2.9 Cristallografia a raggi X - - - - -	25
3. MATERIALI E METODI - - - - -	29
3.1 Cellule di E. coli- - - - -	29
3.2 Vettore per l'espressione di M ^{pro} - - - - -	29
3.3 Trasformazione batterica - - - - -	30
3.4 Induzione dell'espressione genica per la produzione di M ^{pro} - - - -	31
3.5 Terreni di coltura- - - - -	32
3.6 Tamponi utilizzati - - - - -	33
3.7 Estrazione delle proteine totali - - - - -	36

3.8 Cromatografia di affinità	37
3.9 SDS page	38
3.10 Attività enzimatica	39
3.11 Test di inibizione	38
3.12 Digestione del plasmide	39
3.13 Gel di agarosio	40
3.14 Kit utilizzati nello screening cristallografico della cutina	
sintasi (CSY)	40
3.15 Cutina sintasi	40
4. RISULTATI	41
4.1 Parte 1	41
4.1.1 Produzione e purificazione di M ^{pro}	41
4.1.2 Saggi di attività e inibizione della M ^{pro}	48
4.2 Parte 2	55
5. DISCUSSIONE	57
6. CONCLUSIONE	60
7. BIBLIOGRAFIA	61

1. SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi è stato condotto presso il MaSBiC (Marche Structural Biology Center) del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche. Il MaSBiC è una infrastruttura dipartimentale focalizzata sulla produzione e purificazione di proteine ricombinanti prodotte in diversi sistemi cellulari. Tali proteine, di diversa origine, possono essere prodotte per studi funzionali o, ad esempio, per studi di tipo strutturale.

Questo lavoro di tesi si è inserito nelle attività svolte presso il MaSBiC, con il duplice scopo di determinare l'attività di alcune molecole a basso peso molecolare su una proteasi virale e di trovare le condizioni migliori per cristallizzare una proteina di origine vegetale.

Nel primo caso, la proteina di interesse è la proteasi principale M^{pro} di SARS-CoV-2. L'attività di produzione nel MaSBiC di questa proteina è iniziata durante il periodo di lockdown del 2021, ed ha portato alla pubblicazione di un articolo scientifico di rilevanza per la comprensione del meccanismo di azione di M^{pro} e dell'effetto sulla proteina stessa di alcuni inibitori di nuova sintesi [Silvestrini et al. Sci Rep 11, 9283 (2021)]. Poiché la pandemia è ancora in corso, rimane essenziale avere a disposizione un quantitativo importante e particolarmente puro di questa proteina, per poter testare l'azione antivirale di nuove molecole

opportunamente selezionate. In questa ambito, il lavoro svolto in questa tesi ha riguardato la produzione e purificazione di M^{pro} in quantità utile per condurre dei saggi di attività, e la verifica degli effetti inibitori di due molecole a basso peso molecolare. La prima molecola che è stata considerata, di origine naturale, è la quercetina, recentemente indicata come un forte inibitore di M^{pro}, la seconda, molecola, riproposta come inibitore di M^{pro} essendo attualmente utilizzata per la terapia dell'HIV, è il ritonavir, uno dei due componenti dell'antivirale recentemente approvato dall'Ema per il trattamento dell'infezione Covid-19, tutt'ora soggetto a numerosi studi clinici.

La seconda attività svolta in questa tesi ha riguardato la possibilità di condurre studi strutturali su proteine mediante cristallografia a raggi X. Questa tecnica richiede la produzione di buone quantità di proteina e la produzione di cristalli di dimensioni utili per poter effettuare gli esperimenti di diffrazione. La proteina di interesse è stata la cutina sintasi CSY, una proteina di origine vegetale prodotta in collaborazione con il laboratorio di Biomateriali e Tecnologia Enzimatica dell'Istituto di Agrobiotecnologie (IFA-Tulln an der Donau), dell'Università BOKU di Vienna e con l'Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale. Il lavoro ha riguardato principalmente la messa a punto dei test di cristallizzazione e la determinazione delle migliori condizioni di pH, presenza di co-solventi, temperatura e salinità che permettessero di ottenere

cristalli utili per effettuare esperimenti di diffrazione a raggi X. I test hanno avuto successo e sono stati prodotti cristalli di buona qualità. Gli esperimenti di cristallografia a raggi X, che verranno svolti in collaborazione con il Prof. M. Cianci del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali della nostra Università presso la beam-line P13 (Cianci et al. *J. Synchrotron Rad.* (2017). 24, 323–33) del sincrotrone PETRA III, sono previsti per il prossimo mese.

1. INTRODUZIONE

2.1. Origine della pandemia

Negli ultimi 20 anni la Cina è stata l'epicentro di 3 emergenti infezioni virali che hanno suscitato preoccupazione a livello mondiale: l'influenza aviaria del 1997, un'epidemia di sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus (SARS CoV-1) nel 2003 e la sindrome da trombocitopenia con febbre grave nel 2010 (SFTF). La più recente crisi riguarda lo scoppio di una polmonite virale, ancora in corso.

A dicembre 2019, nella città di Wuhan, capitale della provincia di Hubei (in Cina), si verificò una serie di casi di polmonite inizialmente ad eziologia sconosciuta e poi correlati ad un nuovo coronavirus identificato solo successivamente come SARS-CoV-2 [1] che suggerì fin da subito un'infezione di possibile origine zoonotica [2, 3].

Nei primi di gennaio, infatti, dopo isolamento e sequenziamento del genoma del SARS-CoV-2 è stata osservata una identità di sequenza del 96.2% con quella di Bat-SARSs-CoV RaTG13 (coronavirus del pipistrello) e del 79.5% a quella di SARS-CoV-1. Sulla base di questi risultati si sospetta che i pipistrelli siano gli ospiti naturali di SARS-CoV-2 mentre l'ospite intermedio (reservoir) non è stato ancora identificato in modo certo [3, 4].

Il 12 gennaio l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nomina questo virus come nuovo coronavirus del 2019 (2019 nCoV), l'11 febbraio la malattia viene ufficialmente nominata coronavirus 2019 (COVID-19). Nello stesso giorno la Commissione Internazionale per la tassonomia dei virus (ICTV) ha proposto di nominare il nuovo coronavirus del 2019 come SARS-CoV-2 [4].

Il 22 gennaio viene riportata per la prima volta la trasmissione da persona a persona e l'11 marzo [5], a causa della rapida propagazione del virus in 113 paesi, con 118.319 infezioni e 4292 morti, l'OMS dichiara l'infezione da SARS-CoV-2 pandemia [3, 5].

2.2. Coronavirus e SARS-CoV-2

I Coronavirus sono una famiglia di virus che può infettare sia mammiferi, incluso l'uomo, che gli uccelli [6].

Sono virus formati da un singolo filamento di RNA a senso positivo (+ssRNA) compreso tra le 27 e le 32 kb, il più grande tra tutti i virus a RNA conosciuti fino ad ora, protetto da un nucleocapside elicoidale e rivestito di pericapside (envelope) formato da un doppio strato lipidico. (nome spicole che ricordano corona) [7].

SARS-CoV-2 appartiene alla sottofamiglia delle *Orthocoronavirinae* genere *betacoronavirus*. Ad oggi si conoscono 7 coronavirus che possono infettare

l'uomo di cui 4 (coronavirus umani comuni) in genere causano un'infezione del tratto respiratorio ad andamento stagionale, più comunemente nota come "raffreddore" [6]. Le altre 3 forme, emerse negli ultimi 20 anni, SARS-CoV-1, MERS-Cov (Middle East Respiratory Syndrome) e SARS-CoV-2 tutte appartenenti al genere dei *betacoronavirus* sono altamente patogeniche dal momento che causano delle severe sindromi respiratorie [6].

Il genoma dei coronavirus codifica per diverse proteine non strutturali coinvolte nella replicazione virale e per 4 proteine strutturali: la proteina N che forma il nucleocapside virale, la proteina spike (S), la proteina di membrana (M) e la proteina dell'envelope (E). Queste ultime 3 si trovano sulla superficie esterna dell'envelope [9]

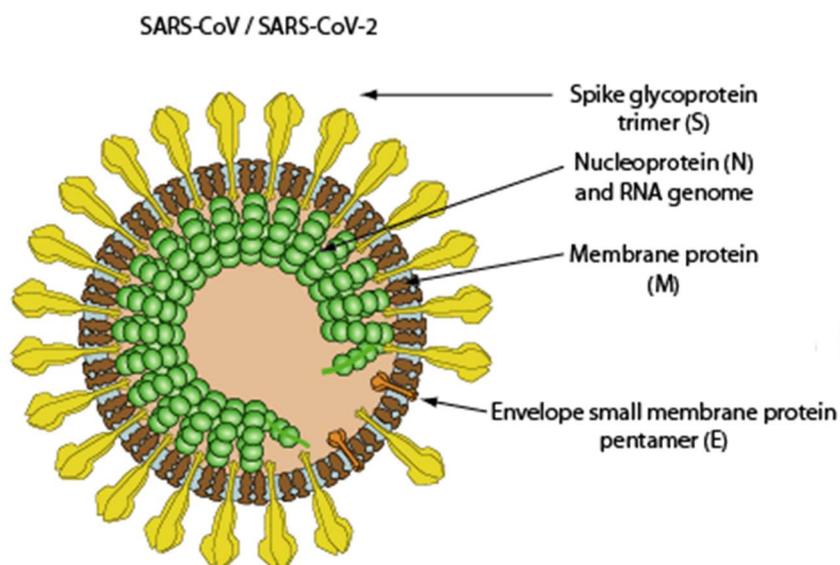


Figura 1: struttura a corona del SARS-CoV-2, S: glicoproteina Spike, N: nucleoproteina, M: proteina della membrana, E: envelope [8].

2.3. Infezione e ciclo virale

SARS-CoV-2 viene trasmesso dalle persone infette, sintomatiche e asintomatiche, mediante droplet provocato da starnuti, tosse o dalla conversazione ravvicinata. Come il SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 infetta le cellule umane che esprimono sulla loro superficie l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 umana (ACE 2) [10].

L'espressione e la distribuzione dei recettori ACE2, localizzati a livello del tratto respiratorio, gastrointestinale, del fegato e del miocardio influenza il tropismo del virus e della sintomatologia [10].

La penetrazione nella cellula ospite è mediata dalla Spike, una glicoproteina formata da due subunità funzionali: la subunità S1, superficiale, che contiene il dominio di legame al recettore "Receptor Binding Domain" (RBD) e la subunità S2, transmembrana. Tra le due subunità è presente un sito di taglio proteolitico per alcune serina proteasi presenti sulla superficie della cellula ospite, come la TMPRSS2. L'azione di queste proteasi attiva la capacità fusogena del virus che penetra all'interno della cellula attraverso la formazione di una vescicola endocitica. Questo passaggio è fondamentale per il rilascio del genoma virale nel citosol della cellula ospite [13].

All'interno del citosol il genoma virale sfrutta i sistemi di traduzione proteica dell'ospite per la produzione di due grandi poliproteine Pp1a e Pp1ab, di 4.405 e 7.096 aminoacidi rispettivamente, composte da proteine non strutturali (Nsp) e strutturali, insieme ad alcune proteine accessorie (Figura 2). La traduzione delle proteine non strutturali è immediata poiché necessaria alla replicazione e all'assemblaggio dei virioni [15].

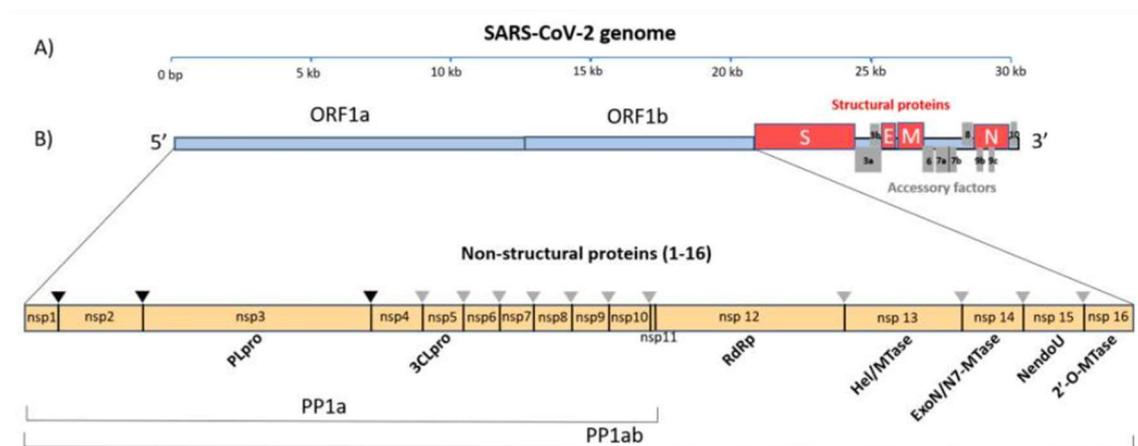


Figura 2: struttura del genoma del SARS-CoV-2. Pp1a, poliproteina 1a che codifica per le proteine non strutturali (Nsp2, Nsp4, Nsp6) [14]

L'espressione e la quantità delle Nsp è regolata da un frameshifting programmato ribosomiale -1 (-1RF) che si verifica tra ORF1a e ORF1b. Un -1RF richiede 2 segnali: uno "slippery site" (5'-U UUA AAC-3'), a monte del segnale di STOP per la traduzione di ORF1a e, a valle di questo, una struttura secondaria a RNA detta "RNA pseudoknot". Quest'ultima può interagire con il punto di entrata dell'mRNA determinando una pausa nella traduzione da

parte del ribosoma che si trova a livello dello “slippery site”. Il ribosoma può tradurre UUA, AAC, fare un passo indietro di un nucleotide e tradurre CGG continuando con la traduzione di ORF1b [38].

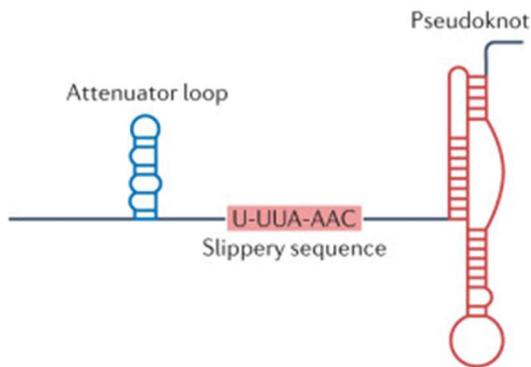


Figura 3: Lo pseudoknot che interagisce con il punto di entrata dell'mRNA nel ribosoma determinando una pausa nella traduzione a livello della slippery sequence (U-UUA-AAC) [15].

La regolazione di questo passaggio dipende sia dalla stabilità dello “pseudoknot” a RNA che da alcune molecole sia virali che dell'ospite che possono interagire con questa struttura destabilizzandola controllando i livelli di pp1a e pp1ab [16, 17].

NON-STRUCTURAL PROTEIN	FUNCTION
Nsp1	Degradazione dell'mRNA dell'ospite
Nsp2	Sconosciuta
Nsp3	proteasi del tipo di papaina, PL _{pro}
Nsp4	Proteina di legame al reticolo endoplasmatico della cellula ospite
Nsp5	Proteasi principale, M ^{pro}
Nsp6	Formazione degli organelli replicativi
Nsp7	Cofattore di Nsp12
Nsp8	Cofattore di Nsp12
Nsp9	Proteina che lega RNA
Nsp10	Cofattore di Nsp6 e di Nsp14
Nsp11	sconosciuta
Nsp12	RNA polimerasi
Nsp13	Elicasi, 5' trifosfatasi
Nsp14	Esoribonucleasi
nsp15	Endoribonucleasi
nsp16	2'-O-Metiltransferasi

Tabella 1: le diverse Nsp svolgono ruoli differenti come indicato in tabella [15].

2.4. Strategie per il contenimento della pandemia

La pandemia da COVID-19 è una delle più grandi minacce alla sanità umana del ventunesimo secolo con più di 257 milioni di casi e più di 5 milioni di morti riportate in tutto il mondo (23 Novembre 2021) [18]

La gravità della situazione e il suo impatto su tutto il globo hanno unito team di scienziati provenienti da tutto il mondo per lo sviluppo di vaccini che fossero efficaci e di immediato utilizzo per prevenire gravi manifestazioni cliniche, l'ospedalizzazione e le morti da COVID-19. Una volta somministrati i vaccini inducono una risposta anticorpale nei confronti dell'antigene contenuto nel vaccino. Tutti i vaccini oggi in uso inducono una risposta anticorpale che blocca la proteina spike per inibire il suo legame con ACE2 e impedire l'infezione. Tuttavia, non ci sono ancora dati certi sulla durata della risposta anticorpale derivata né da un'infezione naturale né da quella indotta dai vaccini in particolar modo in questo momento in cui stanno emergendo nuove varianti.

Mutando il virus, potrebbe esprimere dei nuovi epitopi antigenici che potrebbero non essere riconosciuti così efficacemente dai sistemi di difesa dell'ospite [20].

Ad esempio, alcuni studi preliminari hanno dimostrato che la variante Omicron è in grado di sfuggire all'immunità dell'ospite già infettato o vaccinato con più

di una dose. Questa variante presenta infatti 32 mutazioni sulla proteina Spike, di cui 10 nel RBD, rispetto al ceppo originale verso cui si sono sviluppati i vaccini [20].

Ad ogni modo, ci sono alcune recenti osservazioni sull'aumento delle chances del sistema immunitario nel rispondere alla variante dopo potenziamento vaccinale [20].

Oltretutto è da tener presente quanto la risposta anticorpale vari molto tra i soggetti infetti e questo può dipendere da numerosi fattori nell'ospite rendendo ancora più difficile stabilire una quantificazione della durata degli anticorpi [20].

Anche se i vaccini rimangono ad oggi l'unica difesa nei confronti del virus, si rendono necessarie nuove strategie di sviluppo di farmaci che possano in qualche modo bloccare il ciclo virale e progettati su porzioni proteiche conservate.

Sono infatti, in fase di studio diversi farmaci rivolti contro il SARS-CoV-2. I principali target virali sono rappresentati dall'RNA-polimerasi RNA dipendente e le due proteasi del virus (proteasi principale M^{pro} e la proteasi papain-like PL_{pro}).

Nell'era dei big data, la tendenza è quella di utilizzare algoritmi che per fare un'iniziale screening di agenti antivirali (*in silico* Molecular Modeling) partono

da farmaci già esistenti per evitare lunghi trial clinici e i costi della sperimentazione [21].

Questa però non è l'unica via ed in effetti alcune aziende farmaceutiche si sono cimentate nella sintesi *de novo* di agenti terapeutici per massimizzare la specificità dell'interazione del farmaco con il target virale.

2.5. La proteasi principale di SARS-CoV-2 M^{pro}

La Nsp5, 3C-like protease o M^{pro} (Main protease) conosciuta anche come C30 endopeptidasi o 3-proteasi simile alla chimotripsina, è la proteasi principale del SARS-CoV-2 codificata da una sequenza presente sulla poliproteina pp1a/pp1ab. M^{pro} catalizza il taglio proteolitico a 11 siti conservati della poliproteina pp1a/pp1ab negli stadi iniziali dell'infezione per produrre le proteine funzionalmente mature richieste per la replicazione virale [22].

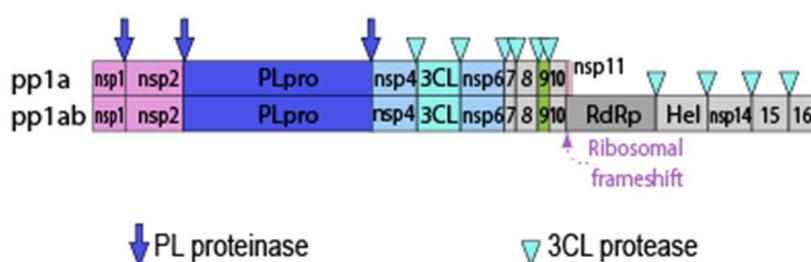


Figura 4: siti di taglio della PL^{pro} in blu e della M^{pro} in azzurro su pp1a e pp1ab [23]

La M^{pro} del COVID 19 è attiva nella forma omodimerica anche se ogni monomero è dotato di un suo sito attivo. Tuttavia, nella forma monomerica la tasca del sito attivo non è disponibile per interagire con il substrato ed è

necessaria la dimerizzazione resa possibile dall'interazione tra i monomeri che ne assicura l'attività catalitica dovuta a cambiamenti conformazionali all'interno del sito attivo indotti dalla dimerizzazione stessa [24].

M^{pro} è una cisteina proteasi di 306 aminoacidi che, come molte altre cisteina proteasi, presenta nel sito attivo una diade catalitica cisteina-istidina (Cys145, His41) che riconosce e taglia in maniera specifica il legame peptidico Leu-Gln↓(Ser, Ala, Gly) [25].

La HIS 41 è il residuo “attivatorio” per l'inizio della catalisi che deprotona il gruppo tiolico della Cys145 che si trasforma in un potente nucleofilo in grado di fare un attacco a livello del C α della sequenza peptidica del substrato. Per iniziare un nuovo ciclo di attività catalitica la HIS 41 deve tornare deprotonata [26].

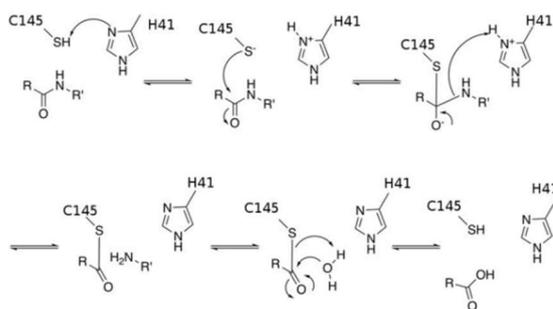


Figura 5: meccanismo della catalisi enzimatica di M^{pro} [26]

Ogni monomero è formato da tre domini strutturali. I domini I e II (residui 1-101 e 102-184 rispettivamente) sono formati da 6 β -strand antiparalleli che si associano a formare dei β -barrel. Il dominio III (residui 201-306) è invece

formato da un cluster globulare di 5 α -eliche coinvolte nella dimerizzazione di M^{pro} probabilmente attraverso la formazione di un ponte salino tra la Glu290 di uno dei due monomeri e l'Arg 4 dell'altro [25]

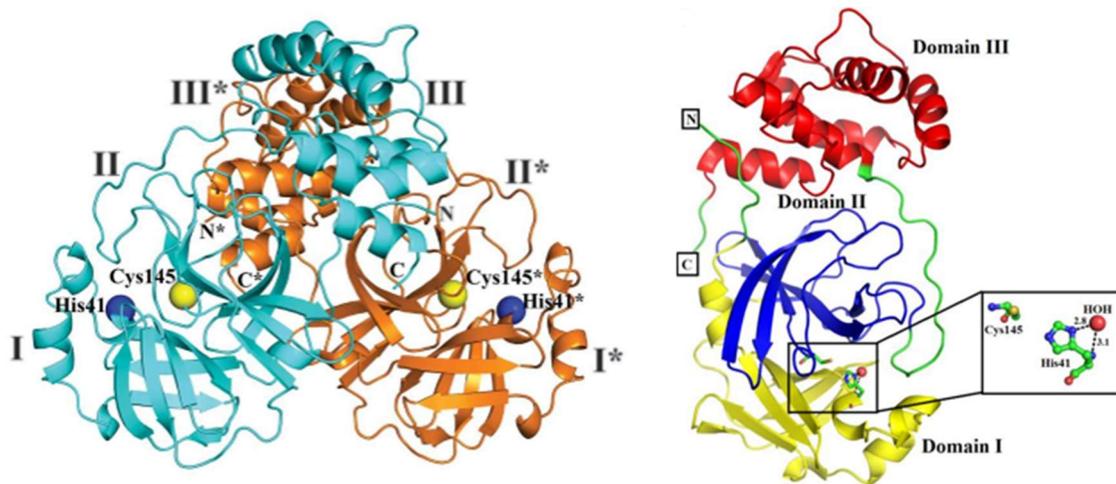


Figura 6: B) Immagine tridimensionale dell'omodimero M^{pro} in cui sono mostrati i domini (I, II, III) e i residui aminoacidici del sito catalitico. Gli asterischi indicano l'appartenenza dei domini al monomero in arancione [25, 27]

In altri studi è stato proposto che per la dimerizzazione siano necessari anche i domini N-terminali di ogni monomero (N-Finger) che interagiscono tra di loro e con le rispettive corrispondenti estremità C-terminali [28].

Dal momento che condivide il 96% di sequenza proteica con la M^{pro} del SARS-CoV-1, ci sono già molte informazioni che si possono sfruttare soprattutto riguardo farmaci precedentemente testati in grado di bloccare la M^{pro} del SARS-CoV-1 ed in effetti, le strutture tridimensionali che derivano dalla cristallografia a raggi X della SARS CoV-2 e della SARS COV-1 (codice PDB 2BX4) sono decisamente simili (root mean square deviation di 0.53 Å per ogni atomo Ca) [22].

```

Mpro~_Sars_cov_2      SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTT L NGLW LDDVYVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIR
Mpro_Sars~_cov_1     SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTT L NGLW LDDVYVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR
*****;*****

Mpro~_Sars_cov_2      KSNHNFLVQAGNVQLRVIGHSMQNCVLKLVDTANPKTPKYK FVRIQPGQTF SVLACYNG
Mpro_Sars~_cov_1     KSNHSFLVQAGNVQLRVIGHSMQNCLLRLKVDTSNPKTPKYK FVRIQPGQTF SVLACYNG
****.*****;*****;*****

Mpro~_Sars_cov_2      SPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCGSVGFNIDYDCVSFCYMHMELPTGVHAGTDLEGN
Mpro_Sars~_cov_1     SPSGVYQCAMRPNHTIKGSFLNGSCGSVGFNIDYDCVSFCYMHMELPTGVHAGTDLEGK
*****.*****;

Mpro~_Sars_cov_2      FYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRF TTT L NDFNLVAMKYNYE
Mpro_Sars~_cov_1     FYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRF TTT L NDFNLVAMKYNYE
*****;*****

Mpro~_Sars_cov_2      PLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEF TPFDVVRQC
Mpro_Sars~_cov_1     PLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTI LEDEF TPFDVVRQC
*****;*****;

Mpro~_Sars_cov_2      SGVTFQ
Mpro_Sars~_cov_1     SGVTFQ
*****

```

Figura 7: allineamento della sequenza proteica del SARS-CoV 2 e SARS-CoV 1 ottenuta con Clustal W. Dei 306 residui, 295 sono conservati (*), 10 mantengono caratteristiche chimico fisiche molto simili (:), 2 mantengono caratteristiche chimico fisiche abbastanza simili (.).

Tuttavia, mentre nella M^{pro} SARS-CoV-1 si forma un legame H (2.60 Å) tra la Thr284 del dominio III di un monomero e la Ile 286 del dominio III dell'altro, nella M^{pro} SARS-CoV2 al posto della treonina è presente una alanina e al posto dell'isoleucina, una leucina. Questa mutazione sembra aver determinato un incremento sia nell'attività che nella compattezza della M^{pro} SARS CoV-2 rispetto al suo antenato (5.21 Å verso 6.77 Å) [25].

Un esempio di inibitori “ripescati dalle librerie di inibitori già testati per la M^{pro} della SARS-CoV-1 sono gli α-ketoammidi.

2.6. HIV

La dimerizzazione delle unità monomeriche è essenziale per l'attività di un'altra proteasi virale, quella dell'HIV (Human Immunodeficiency Virus) nel cui sito attivo, i residui amminoacidici come cisteina e/o metionina, una volta modificati determinano una perdita della capacità di dimerizzazione con conseguente perdita di attività. Alcuni esperimenti hanno confermato che diversi inibitori della proteasi di HIV presentano effetti inibitori sulla replicazione del SARS-CoV-2 inibendo M^{pro}.

Alcuni di questi come il Darunavir, Lopinavir, Nelfinavir e Ritonavir sono stati studiati attraverso metodologie di docking molecolare e simulazioni di dinamica molecolare che hanno permesso di visualizzare l'interazione con l'His 41 del sito catalitico della M^{pro} e altri due aminoacidi chiave: Met49 e Met 165 [29].

2.7. Impatto del SARS-CoV-2 sull'ambiente

La pandemia da COVID 19 non è solo un'emergenza sanitaria. La sua presenza ha avuto un notevole impatto sulla vita e le relazioni delle persone con l'adozione di norme per il distanziamento sociale e misure di contenimento del rischio di contagio virale. La plastica monouso si è prospettata fin da subito una delle migliori strategie per difendersi dal contagio: guanti, mascherine, camici, divisori in plexiglas, tamponi rapidi. Il lavoro da casa a cui molte persone sono state "costrette" per limitare i contagi sul posto di lavoro ha portato ad un aumento del consumo di plastica utilizzata per imballaggi singoli. Durante il lockdown è aumentato per ovvi motivi anche lo shopping online di beni che non appartenevo alle prime necessità molto spesso imballati in materiale plastico.

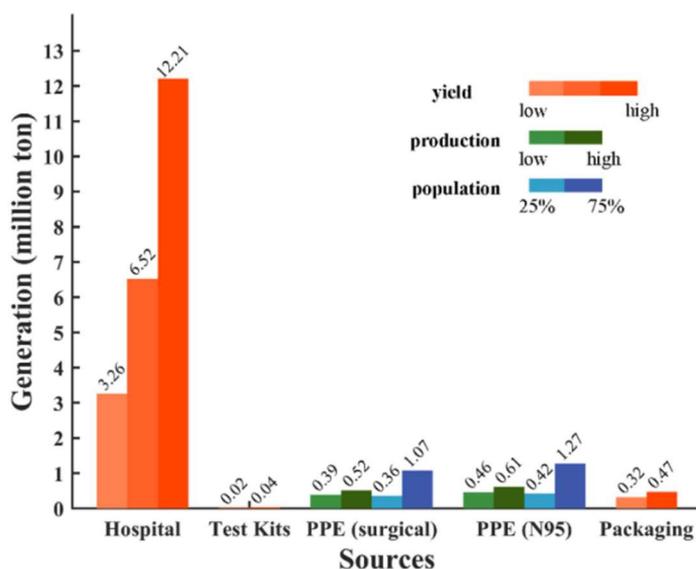


Figura 8: nella figura è mostrato in percentuale l'aumento di plastica proveniente da diversi fonti. PPE: personal protective equipment [30].

C'è stata una difficoltà generale da parte delle nazioni nel trattare i rifiuti plastici data l'elevata produzione. Complice di questa situazione è anche la disattenzione di alcuni individui nel corretto riciclaggio dei rifiuti.

Molti di questi rifiuti plastici, macro e microplastiche, finiscono nei mari e convivono, come materiale abiotico, con la fauna endemica.



Figura 9: impatto delle mascherine sul mondo marino

In questo panorama si inserisce la necessità di trovare catalizzatori enzimatici in grado di degradare la plastica contribuendo al suo riciclo e quindi alla riduzione dell'ingente quantità nei mari come nella terraferma.

2.8. La cutina sintasi

La cutina sintasi CSY è un enzima che appartiene alla superfamiglia di proteine che contengono un dominio GDSL, il cui nome deriva dalla sequenza aminoacidica che compone il dominio stesso. Le GDSL esterasi/lipasi sono degli enzimi idrolitici che condividono 5 blocchi di sequenze consenso (I-V) di cui i blocchi I, III e V che mostrano un elevato grado di omologia e sono importanti per la loro classificazione. Possiedono, inoltre, 4 residui catalitici che non variano da un enzima all'altro: Ser (blocco I), Gly (blocco II), Asn (blocco III), and His (blocco V) [31].

Questi enzimi hanno un'elevata specificità e regioselettività di substrato [31]. e mostrano attività proteasica, tiosterasica, arilesterasica, lisofosfolipasica, aciltrasferasica.

Il sito catalitico è flessibile e cambia la conformazione in presenza di differenti substrati conferendo alla proteina una caratteristica di "multifunzionalità".

Le GDSL idrolasi sono state trovate in tutti i regni e recenti studi hanno rivelato la loro abbondanza nel regno delle piante dove sono coinvolte in diversi processi cellulari anche se ad oggi rimane ancora poco noto sia il meccanismo di azione che la loro struttura tridimensionale [31].

La multifunzionalità di questa famiglia di enzimi e la loro versatilità li rendono un oggetto di ricerca interessante con possibili applicazioni in ambito farmaceutico, alimentare, biochimico e le piante potrebbero essere un'importante risorsa per la loro purificazione e caratterizzazione [32].

la cutina sintasi nelle piante catalizza la polimerizzazione dei monomeri di cutina partecipando, alla formazione della cuticola, una barriera idrofobica, che si trova sulla superficie di foglie e giovani fusti, costituita oltre che da cutina anche da cere con funzione protettiva contro gli stress ambientali (essiccazione ed agenti patogeni) e impermeabilizzante dei tessuti sottostanti.



Figura 10: la cuticola, formata da cera e cuticola, due costituenti lipidici, forma una barriera sulla superficie dell'epidermide delle piante.

La composizione monomerica della cutina cambia nelle diverse specie di piante; uno dei monomeri più diffusi è l'acido diidrossiesadecanoico (DHHA) [33]

La cutina sintasi del *Solanum lycopersicum*, nota come CD1 (Cutin Deficient 1) è un modello emergente per lo studio della biosintesi della cuticola [33].

Data la necessità di far fronte all'inquinamento da plastica, diventa fondamentale l'identificazione e lo sviluppo di nuovi enzimi che, opportunamente ingegnerizzati, possano essere impiegati su ampia scala e a basso costo nel processo di degradazione della plastica. Uno di questi potenziali enzimi è la CSY. In questa tesi, non saranno descritti in dettaglio tutti i dati e gli aspetti scientifici riguardanti la CSY poiché è un lavoro in collaborazione con altre Università e sarà coperto da brevetto.

Della cutina sintasi conosciamo la sequenza amminoacidica che può essere utilizzata per fare predizione di struttura secondaria e terziaria (homology modeling) anche se nel PDB (Protein Data Bank) non esistono al momento strutture con una % di identità così elevata da poter essere utilizzate come modello (identità inferiore al 30%).

2.9. Cristallografia a raggi-X

La cristallografia a raggi-X fornisce il metodo più diretto per produrre l'immagine tridimensionale di una molecola proteica (o acido nucleico) ed acquisire informazioni riguardo l'attività, il meccanismo di riconoscimento dei substrati e i cambiamenti conformazionali a cui va incontro [34].

Un cristallo è una matrice tridimensionale contenente i suoi atomi, molecole o ioni sostituenti la cui posizione viene replicata in modo periodico nelle tre dimensioni dello spazio [34].

L'unità fondamentale del cristallo è la cella unitaria, che, traslata nelle 3 dimensioni dà la forma del cristallo. Le celle unitarie per i cristalli hanno dimensioni che in genere vanno dai 30 Å ai 1000 Å di diametro [34].

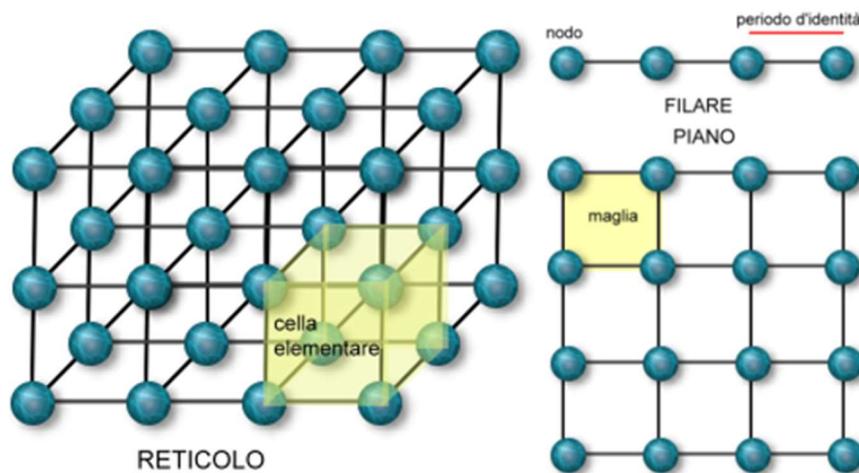


Figura 11: struttura del cristallo che mette in evidenza la cella elementare, l'unità strutturale del cristallo la cui ripetizione nelle 3 dimensioni dà origine al reticolo cristallino. Un filare è formato da un allineamento di atomi posti ad una distanza fissa chiamata periodo di identità. Due filari paralleli, ciascuno con il suo periodo di identità individuano il piano reticolare [35]

Sulla base della forma della cella unitaria, le strutture cristalline si possono dividere in gruppi che prendono il nome di sistemi cristallini. Questi, sono descritti da 6 parametri (a , b , c , α , β , γ) individuati su un sistema di coordinate x , y , z la cui origine viene posta sul vertice di una cella e i cui assi sono fatti coincidere con i tre spigoli della cella.

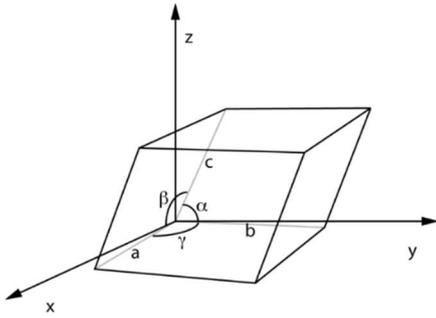


Figura 12: cella unitaria in cui sono evidenziati i parametri a , b , c (lati della cella), α , β , γ (angoli che si originano dall'incontro dei tre assi) [36]

La cristallizzazione è un processo che include diversi steps: nucleazione, crescita del nucleo e cessazione della crescita [37]

La nucleazione è una fase fondamentale in cui le proteine nel buffer di soluzione passano da uno stato disordinato ad uno altamente ordinato. Quando i nuclei superano una dimensione critica questi cominciano a crescere. Quando il cristallo è maturo la crescita si arresta [37].

Il processo di cristallizzazione è fortemente influenzato dalle proprietà chimico-fisiche del solvente, della proteina e dalle forze di interazione della proteina con il solvente [37].

La cinetica della cristallizzazione dipende dalla concentrazione della proteina e dalle caratteristiche dell'agente precipitante presente nel solvente che concorrono a determinare la precipitazione della proteina in un precipitato cristallino [37].

Per la cristallizzazione delle macromolecole è necessario che il processo avvenga lentamente da poter dare il tempo alle proteine di organizzarsi in una struttura cristallina che possa diffrangere in maniera ottimale i raggi X.

Quando un cristallo viene illuminato con la lunghezza d'onda dei raggi X, l'onda elettromagnetica viene diffranta. Le immagini di diffrazione rappresentano i dati sperimentali che vengono processati e utilizzati per ottenere la struttura tridimensionale della proteina [34].

3. MATERIALI E METODI

3.1. Cellule di *E. coli*

Le cellule utilizzate nell'esperimento per la produzione di Mpro, proteasi del SARS-CoV-2 appartengono al ceppo BL21pLys (F-, ompT, hsdS: (rB-, mB-), dem, gal, \ (DE3), pLysS, Cm) di *E. coli*, adatto alla trasformazione e alla produzione delle proteine dopo induzione con Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG).

3.2. Vettore per l'espressione di M^{Pro}

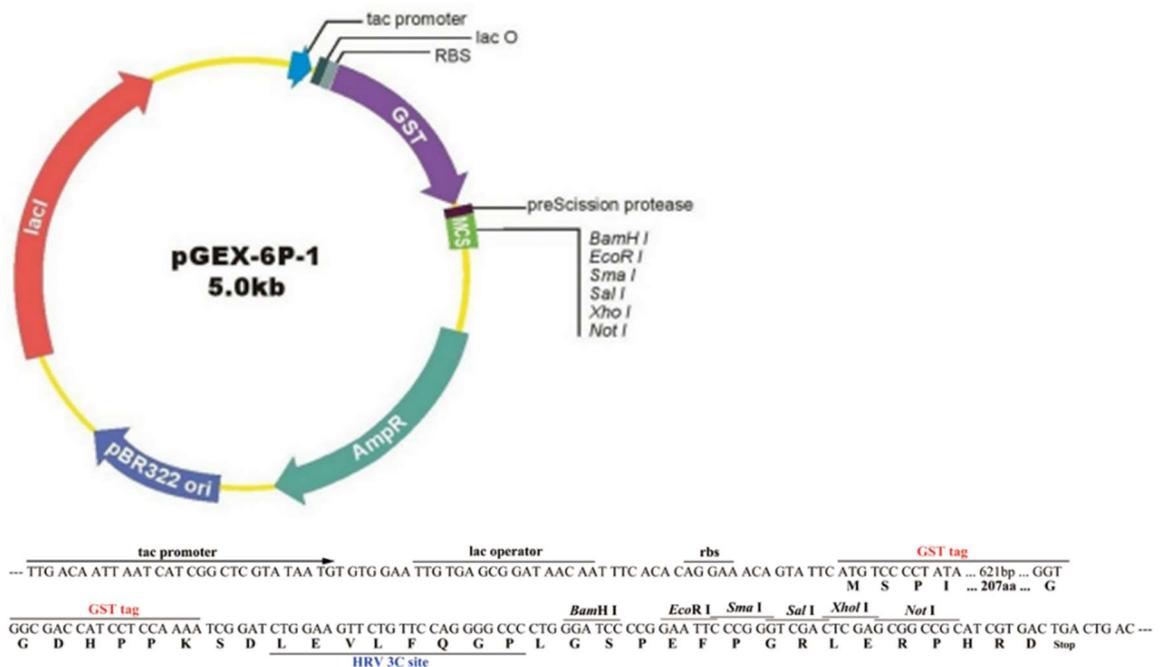


Figura 13: In figura 2.2 vediamo la struttura e la sequenza del plasmide utilizzato nella trasformazione del ceppo BL21pLys di *E. coli*.

Il plasmide ha come marcatore la resistenza all' ampicillina. Il cDNA per M^{pro} viene clonato nel sito di clonaggio multiplo (MCS) che si trova a valle della sequenza che codifica per la GST (glutathione S-transferasi). L'MCS viene riconosciuto e tagliato da diversi enzimi di restrizione. In particolare, quelli da noi utilizzati sono BamH I (5'-GGATCC-3') e Xho I (5'-CTCGAG.3'). il cDNA di M^{pro} fuso alla GST viene trascritto dall'RNA polimerasi dell'ospite dopo il legame al promotore tac. M^{pro} viene tradotta dal macchinario molecolare di traduzione dell'ospite. La GST poi viene tagliata via grazie all' attività autocatalitica della M^{pro} che riconosce una sequenza di 8 aminoacidi posta tra la GST e il suo codone di inizio della trascrizione. Il taglio della GST è già una evidenza dell'attività della M^{pro} che agisce in forma dimerica (1µl-40 ng plasmide per 10⁶ cellule di E.coli).

3.3. Trasformazione batterica

Le cellule competenti BL21 di E. coli sono state trasformate con il plasmide pGEX-6P-1 M^{pro}.

La trasformazione viene fatta sotto cappa a flusso laminare con una concentrazione di 1µl (40 ng) di plasmide aggiunto a una concentrazione di circa 10⁶ cellule BL21 in una provetta da 1.5 ml. Le cellule con il plasmide

vengono mantenute in ghiaccio per circa 15 minuti prima di far avvenire la trasformazione mediante shock termico in bagnetto termostatico (20 s a 42°C). Dopo shock termico alla sospensione cellulare vengono aggiunti 800 µl di LB (vd Tabella 2) e il tutto viene incubato a 37°C in agitazione per 1 h. trascorso il tempo necessario, le cellule sono state piastrate su LB+amp+cam e le piastre sono state incubate per 16-18 ore a 37°C.

3.4. Induzione dell'espressione genica per la produzione di Mpro

Le singole colonie ottenute sono state replicate in delle piastre master ed ogni colonia è stata identificata con un numero. Una volta cresciuta la biomassa, sono stati scelti dei cloni per gli inoculi in terreno liquido (vd Tabella 2).

Le cellule sono state inoculate in 20 ml di terreno liquido+amp+cam (Paragrafo 3.5). In questa maniera è stato ottenuto un pre-inoculo che viene posto in incubazione a 180 rpm, 37°C per 16-18 h. Trascorso il tempo necessario, la coltura viene versata nella beuta contenente 1 L di terreno e lasciata crescere fino al raggiungimento di una densità ottica OD600 pari a 0.6-0.8 misurata allo spettrofotometro. Raggiunto questo valore, l'induzione della produzione di M^{pro} in cellule BL21 viene innescata attraverso l'aggiunta di IPTG 0.5 mM e le

colture vengono lasciate crescere in induzione per 3 h. trascorse le 3 h la biomassa viene raccolta mediante centrifugazione.

3.5. Terreni utilizzati

Le BL21 di E. coli sono state coltivate in terreno LB (brodo di lisogenia), nutrizionalmente ricco, usato sia come terreno liquido che come terreno solido. Quest'ultimo è stato ottenuto mediante aggiunta di agar alle componenti utilizzate per il terreno liquido. Per preparare un litro di terreno liquido LB sono stati utilizzati i componenti indicati in Tabella 1.

Tabella 2: Componenti del terreno LB liquido

Tryptone	10 g/L
Estratto di lievito	5 g/L
NaCl	10 g/L

Per un terreno solido LB oltre agli ingredienti indicati in Tabella 2 è stato aggiunto Agar 2%. Il contenuto liquido viene versato in diverse piastre Petri. La procedura viene fatta sotto cappa aspirante a flusso laminare così da evitare contaminazioni batteriche esterne. Una volta che il terreno si è solidificato le piastre vengono riposte in frigo a 4°C.

Sia per le colture liquide che per quelle solide, dopo la sterilizzazione in autoclave (121°C, 20 min) e quando il terreno si è parzialmente raffreddato, sono stati aggiunti gli antibiotici cloramfenicolo (cam, 34 ug/ml) e ampicillina (amp, 100 ug/ml), per selezionare le cellule contenenti il plasmide di espressione.

3.6. Tamponi utilizzati

3.6.1. Tabella 3: Tampone di lisi

	Concentrazione
Tris HCL	20 mM
NaCl	300mM
ddH2O	To volume

3.6.2. Tabella 4: Tamponi per i lavaggi

Lavaggio	Concentrazione	Lavaggio	Concentrazione	Lavaggio	Concentrazione
I		II		III	
Tris HCl	20 mM	Tris HCl	20 mM	Tris HCl	20 mM
NaCl	500 mM	NaCl	1000 mM	NaCl	300 mM
Imidazolo	10 mM	Imidazolo	10 mM		

3.6.3. Tabella 5: Tampone per l'eluizione

	Concentrazione
Tris HCL	20 mM
NaCl	0.3 M
Imidazolo	0.3 M

3.6.4. Tampone di mantenimento

Tris HCL 50 mM pH 7.6

3.6.5. Tabella 6: TGS 1X

Tris Base	30 g/L
Glicina	144 g/L
SDS	10 g/L

3.6.6. Tabella 7: Precission cleavage buffer

	Concentrazione
Tris HCl	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1mM
DDT	1mM

3.6.7. Tabella 8: Sample buffer

	Concentrazione
Tris HCl	0.2 M
DTT	0.4 M
SDS 8%	277 mM
Blu di Bromofenolo	6 mM
Glicerolo	4.3 M

3.7. Estrazione

Una volta rimosso il sovrnatante le cellule batteriche sono risospese nel tampone di lisi (vd Tabella 3) mediante agitazione meccanica. Per la rottura delle cellule è stata utilizzata la tecnica della sonicazione in cui gli ultrasuoni creano delle variazioni di pressione nel liquido attraverso cui si propagano provocando la rottura cellulare con la conseguente fuoriuscita dell'estratto.



Figura 14: sonicatore utilizzato per la lisi delle cellule di E. coli BL21 con all'interno la proteina

A questo punto, si opera una centrifugazione frazionata dell'omogenato a 4000 rpm per 1 h che permette di separare il pellet (particelle più grandi e dense) dal surnatante che contiene la M^{pro} ed altre particelle che rimangono sospese nel tampone di lisi dalle quali la M^{pro} dovrà essere separata. La separazione avviene grazie alla presenza del 6xHis tag con la quale la proteina viene prodotta. Il surnatante viene prelevato e posto in resina nichel a girare over night.

3.8. Cromatografia di affinità

Il surnatante viene incubato con una resina al nichel (Nickel Chelating Resin G-Biosciences®). Lo ione metallico Ni²⁺, fissato ad una matrice solida, lega il 6xHis tag fuso all'estremità C-terminale della M^{pro} ma non le altre proteine batteriche presenti nel surnatante. Dopo alcuni lavaggi con il wash I, wash II e wash III, (vd Tabella 4) allo scopo di staccare dalla resina le proteine che si sono legate in maniera aspecifica, si procede con l'eluizione della M^{pro} con imidazolo (tabella 5). La resina viene poi lavata con MES e acqua ed infine equilibrata in etanolo 20% per un successivo riutilizzo.

È possibile ottenere una stima della concentrazione della proteina in imidazolo leggendo l'assorbanza a 280 nm con lo spettrofotometro.

La M^{pro} che è stata eluita e si trova nel tampone di eluizione (vd Tabella 5) è stata poi dializzata in tampone di mantenimento (vd paragrafo 3.6.4) per la sua conservazione o nel Precission buffer (vd Tabella 7) per la rimozione del tag di istidine. La dialisi mediante ultrafiltrazione ha lo scopo di scambiare il tampone contenente imidazolo con quello di mantenimento o con il buffer per il taglio del tag (vd Tabella 7) e di concentrare la proteina.

3.9. SDS-PAGE

Tabella 9

Running gel

% Gel	12%
H2O	1.34 ml
Acrilamide 30%	1.60 ml
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	1 ml
SDS 10%	40 μ l
Temed	40 μ l
APS 10%	20 μ l
Volume totale	4 ml

Tabella 10

Stacking gel

% Gel	4%
H2O	1.5 ml
Acrilamide 30%	350 μ l
Tris HCl 1.5 M pH 6.8	625 μ l
SDS 10%	25 μ l
Temed	2.5 μ l
APS 10%	25 μ l
Volume totale	2.5 ml

I campioni di M^{pro}, precedentemente preparati con sample buffer 4X (vd Tabella 8), vengono fatti correre su un SDS-PAGE in cui, oltre a caricare i campioni, viene caricato anche la scala di riferimento per i pesi molecolari. La separazione di proteine mediante SDS-PAGE evidenzia diverse bande dopo colorazione con Blu di Comassie. La banda di nostro interesse ha un peso di circa 35 kDa.

3.10. Attività enzimatica della Mpro

L'attività enzimatica della Mpro è stata verificata sul substrato specifico AVLQSKFR che, una volta tagliato, emette fluorescenza a 514-567 nm. La fluorescenza è stata misurata mediante fluorimetro De Novix DS-11 FX+ e i valori di fluorescenza liberata sono stati inseriti in un grafico in funzione del tempo.

3.11. Test di inibizione dell'attività enzimatica di Mpro

Il Ritonavir e Quercetina sono stati testati come inibitori dell'attività della Mpro sul substrato AVLQSKFR. L'emissione della fluorescenza è stata misurata come nel paragrafo 2.12.

3.12. Digestione del plasmide

Il plasmide pGEX-6-p è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Xho I* e *BamH I*. I campioni di plasmide non digerito, plasmide digerito con *BamH I* e di plasmide digerito con *BamH I* e *Xho I* sono stati caricati sul gel di agarosio (vd Tabella 10) e separati mediante la tecnica dell'elettroforesi.

3.13. Gel di agarosio

Tabella 10

% gel	1%
Agarosio	0.5 gr
TBE	50 ml

3.14. Kit per lo screening cristallografico della Cutina sintasi (CSY)

I kit di screening di cristallizzazione utilizzati appartengono alla Jena Bioscience. Ogni kit è composto da 96 soluzioni da 1,7 ml ognuna delle quali rappresenta una condizione di cristallizzazione differente. I kit testati sono stati il CS-201L, CS-202L, CS-203L, CS-206L e il CS-207L.

3.15. Cutina sintasi (CSY)

La cutina sintasi, una proteina di origine vegetale, è stata utilizzata alla concentrazione di 2 mg/ml per effettuare un primo screening di cristallizzazione utilizzando i kit del paragrafo 3.14.

4. RISULTATI

4.1. Parte 1

4.1.1. Produzione e purificazione di M^{pro}

Il primo obiettivo della tesi è stato quello di produrre la proteina ricombinante M^{pro} utilizzando il plasmide pGEX-6P-1 per la trasformazione delle cellule BL21 pLys di E. coli.

Le colonie di cellule trasformate sono state replicate prima su terreni LB+amp+cam e poi quelle che hanno mostrato una crescita migliore, sono state replicate su piastre master permettendoci di avere degli stock di cellule trasformate da poter utilizzare di volta in volta per la produzione della proteina ricombinante.

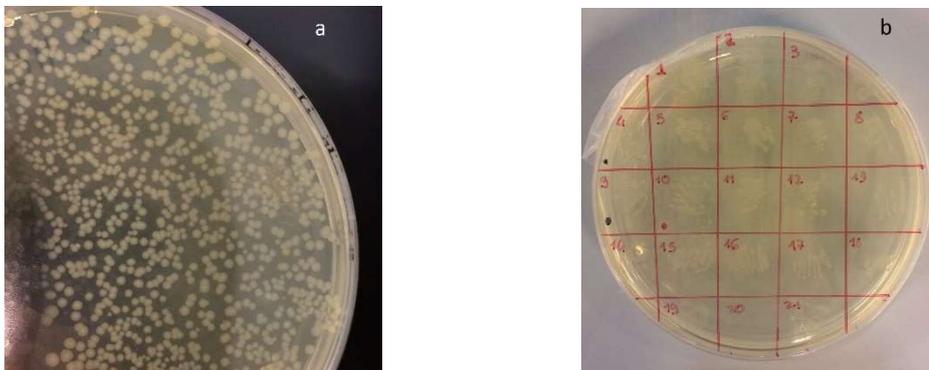


Figura 15: a) cellule di E. coli replicate su terreno LB+amp+cam; b) piastra master in cui le cellule di ogni quadrato derivano da una singola colonia prelevata dalla piastra in figura a.

Il progetto di tesi è iniziato con delle prove di espressione per la produzione ricombinante della proteina in una quantità necessaria ad effettuare studi strutturali quali Small Angle X-Ray Scattering (SAXS).

Per la crescita microbica in terreno liquido sono stati utilizzati 500 ml di terreno LB con aggiunti gli antibiotici di selezione come indicato in Materiali e Metodi (paragrafo 3.5). Una volta che la coltura microbica ha raggiunto una densità ottica OD600 di 0.6-0.8, l'espressione di M^{pro} è stata indotta mediante aggiunta di IPTG 0.5 mM. Dopo circa 3 h di incubazione, il contenuto delle beute è stato diviso in tubi da 50 ml e sottoposto a centrifugazione per recuperare la biomassa di E.coli. Ad ogni aliquota di biomassa è stato aggiunto il tampone di lisi (Tabella 3 in ml), e la biomassa è stata risospesa meccanicamente (vortex) in modo da ottenere una soluzione omogenea da sottoporre a sonicazione.

Il sonicato è stato centrifugato per il recupero del sovranatante che è stato poi incubato con la resina al nichel over night e poi passato su colonna. I primi esperimenti di purificazione hanno avuto come scopo la valutazione dell'espressione della proteina M^{pro} e, utilizzando dei tamponi di lavaggio a diversa forza ionica (Tabella 4) e con una minima quantità di imidazolo in modo da staccare il più possibile i contaminanti aspecifici con il nichel, è stato possibile ottenere una minima quantità di proteina ricombinante.

Con l'eluato abbiamo preparato dei campioni da far correre su SDS page utilizzando come riferimento di taglia il marcatore di pesi molecolari.

La proteina di nostro interesse ha un peso molecolare di circa 35 kDa considerando l'His-tag necessario per la purificazione.

Essendo tuttavia la banda corrispondente ad M^{pro} piuttosto flebile è stato eseguito inizialmente un esperimento di Western Blot al fine di accertare che la banda identificata fosse realmente M^{pro} espressa.

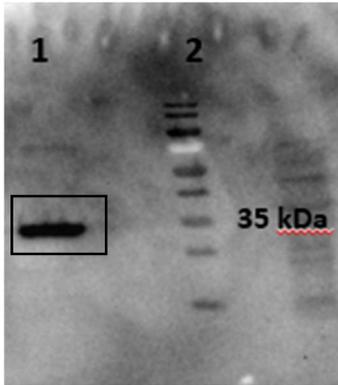


Figura18: Western Blot, pozzetto 1 M^{pro} nel rettangolo in nero, pozzetto 2: marcatore di peso molecolare

Dal Western Blot la proteina risultava espressa ma in quantità non sufficienti per la produzione di cui avevamo bisogno.

Viste le produzioni di M^{pro} avvenute nei periodi precedenti, per indagare il problema è stata fatta una digestione del plasmide pGEX-6P-1 per vedere se ci fossero problemi a questo livello; il gene che codifica per M^{pro} si trova tra il sito di taglio per *Bam HI* e *Xho I*, enzimi utilizzati nella digestione del plasmide.

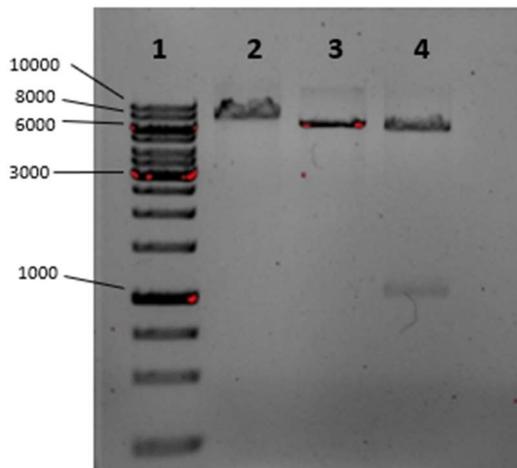


Figura 16: Elettroforesi su gel di agarosio, digestione del plasmide. Pozzetto 1: marcatore di pesi molecolare; pozzetto 2: plasmide non digerito pozzetto 3: plasmide digerito con BamH I; pozzetto 4: plasmide digerito con BamH I e Xho I in cui è possibile osservare la sequenza genica che codifica per M^{PRO}.

È stata inoltre valutata la possibilità che la proteina potesse formare dei corpi di inclusione.

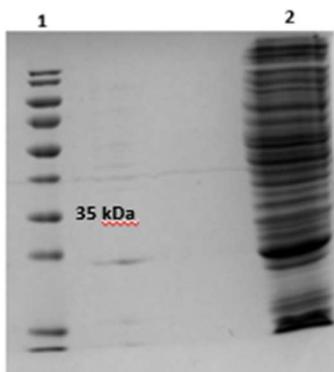


Figura 17: SDS-PAGE su cui sono stati caricati i campioni di corpi di inclusione nel pozzetto 1, mentre nel pozzetto il marcatore di peso molecolare. Non mostra un'evidente presenza di proteina negli stessi.

Dal momento che la digestione del plasmide aveva fornito i frammenti di peso molecolare corrispondente a quelli che ci si aspetterebbe dalla sua digestione

con gli enzimi *BamH I* e *Xho I*, che il Western Blot aveva confermato la presenza effettiva della proteina e che la proteina non si trovava nei corpi di inclusione ma veniva comunque espressa in quantità minime in soluzione, è stato ipotizzato che potesse esserci un difetto nella qualità del plasmide.

Questa ipotesi è stata avvalorata solo in seguito quando, dopo aver cambiato (stock) di plasmide è stata ottenuta la quantità di proteina desiderata.

Rispettando il protocollo e arrivando allo step della sonicazione, è stato aumentato il numero delle sonicate da 2 a 3 per ottenere una migliore rottura delle cellule. Dopo la separazione del pellet (detriti cellulari) dal sovrinatante contenente la proteina, quest'ultimo è stato incubato con la resina al nichel per il tempo necessario dopo di che è stato passato su colonna.



Figura 19: passaggio in prima colonna del sovrinatante ottenuto dalla centrifugazione del sonicato. Nei becker è presente il non legato conservato

Dalla misurazione allo spettrofotometro ad $A=280$ nm, è stata ottenuta fino a 1.256 mg/ml di proteina in 10 ml di tampone di eluizione (vd Tabella 5). Da questo sono stati preparati dei campioni per vedere se effettivamente la concentrazione di proteina osservata fosse realmente corrispondente a quella di nostro interesse.

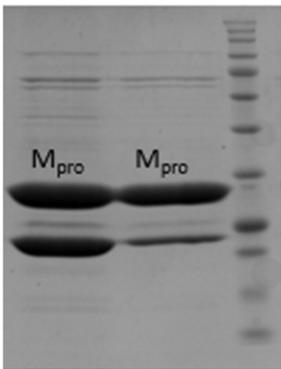


Figura20: SDS-PAGE in cui sono stati fatti correre dei campioni preparati dalla purificazione da prima colonna cromatografica del sovratanante contenente M^{pro}

La proteina in tampone (vd Tabella 5) di eluizione è stata poi dializzata con membrane filtranti (cut off 30 kDa) per averla nuovamente nel tampone di lisi (vd Tabella 3) e procedere ad una seconda purificazione.



Figura 21: dispositivo da 50 ml per ultrafiltrazione (30 kDa cut off)

Dal momento che la proteina era destinata a studi strutturali, era necessario che fosse quanto più pura possibile. Per questo la proteina dializzata è stata incubata nuovamente in resina al nichel e passata su seconda colonna con lo stesso procedimento utilizzato precedentemente. L' eluato è stato dializzato per conservarlo nel tampone di mantenimento (Paragrafo 3.6.4) a 4°C.

Avendo osservato un'elevata quantità di proteina nell' eluato iniziale, è stato nuovamente passato su colonna anche il non legato ottenendo 0.752 mg/ml di proteina in circa 10 ml di tampone di eluizione. Il procedimento di dialisi è stato lo stesso indicato nel paragrafo 3.8.

Una volta raggiunta una certa quantità di proteina purificata, dializzata e mantenuta nel tampone di mantenimento, si è reso necessario un ulteriore scambio di buffer per avere la proteina nel Precision cleavage buffer (vd

Tabella 7) in modo da poter tagliare l'His-tag fuso alla M^{pro} mediante Prescission proteasi.

Per rimuovere la Prescission proteasi dalla soluzione contenente Mpro, è stata utilizzata una resina GSH (Glutathione-S-Trasferasi) che lega in maniera specifica il GST tag (glutathione) fuso alla Prescission proteasi ma anche il prodotto di fusione Mpro-GST, il cui tag GST viene solitamente rimosso *in vivo* durante l'espressione in *E. coli*.

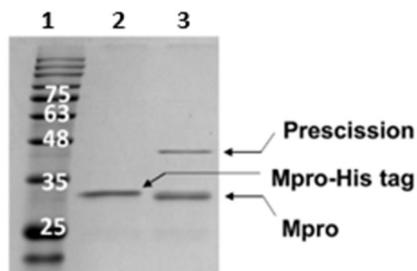


Figura 22: SDS-PAGE, pozzetto 1: marcatore di peso molecolare (kDa), pozzetto 2: M^{pro}-HIS tag, pozzetto 3: Prescission [Silvestrini et al. Sci Rep 11, 9283 (2021)]

4.1.2 Saggi di attività e inibizione della M^{pro}

Dopo questa prima parte di esperimenti, la Mpro prodotta è stata utilizzata per saggi di attività enzimatica.

Saggio di attività

Verificare l'attività di M^{pro} sul substrato specifico AVLQSKFR è stato un passaggio fondamentale e necessario ad avere la certezza del suo corretto ripiegamento strutturale e della presenza del dimero, poiché l'attività catalitica si esplica in forma dimerica.

Per i saggi di attività, ca. 10 μg di M^{pro} (stock 1.5 mg/ml) in tampone di mantenimento (paragrafo 3.6.4) sono stati aggiunti a 181 μl del tampone di attività (Tris-HCl 50 mM, pH 7.6). La mix è stata incubata per 20 min a 30 °C. Trascorso questo tempo è stata aggiunta una quantità di substrato pari a 40 μM per un volume finale della mix di 200 μl . L'emissione di fluorescenza che si verifica a seguito del taglio del substrato da parte di M^{pro} è stata monitorata per 30 min dal tempo $t=0$ al tempo $t=30$ registrandone il valore ad ogni minuto. Alla fluorescenza emessa dal substrato dovuta all'attività di M^{pro} è stato sottratto il bianco ottenuto monitorando l'emissione della fluorescenza (alla stessa maniera dell'attività) del substrato (40 μM) nel tampone di attività e in assenza di M^{pro} .

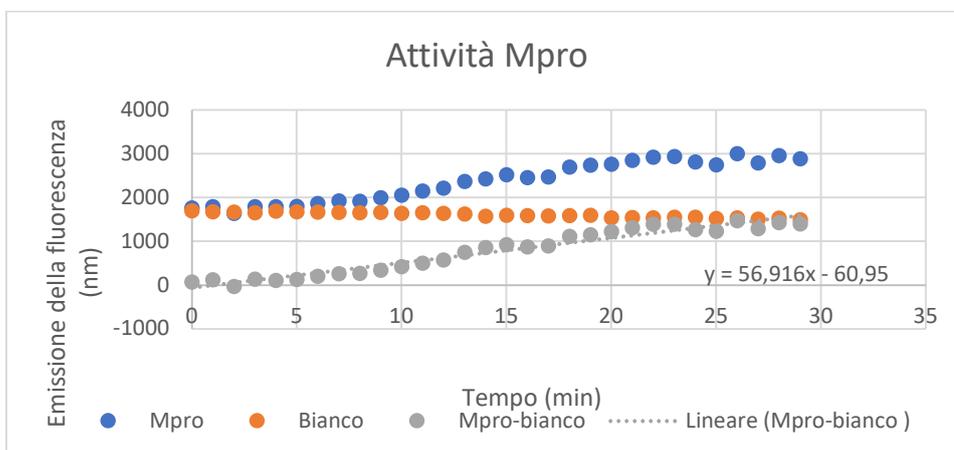


Figura 23: Grafico che riporta l'andamento lineare dell'aumento della fluorescenza (nm) in funzione del tempo (min).

La pendenza della curva ottenuta ha una buona linearità rispetto allo standard delle curve (osservato in letteratura) per l'attività di Mpro.

Saggi di inibizione

Una volta accertati dell'attività di Mpro è stata valutata la capacità inibitoria di alcuni ligandi inibitori di origine sintetica e naturale testati a diverse concentrazioni.

Il ritonavir è un ligando di origine sintetica utilizzato nella cura dell'HIV che interferisce con la dimerizzazione della proteasi responsabile della replicazione del virus. In questo momento, insieme ad altri farmaci di origine sintetica come il lupanavir, è al centro di una serie di studi che permettano di dimostrare la sua azione nell'impedire la dimerizzazione della Mpro del SARS CoV-2 e quindi la sua attività.

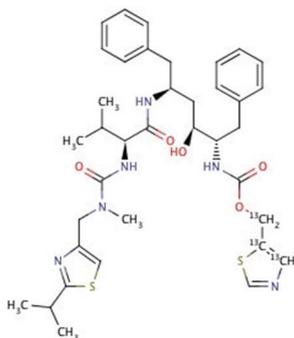


Immagine 24.: struttura molecolare del ritonavir

È stata inizialmente testata una quantità di 30 μM di ritonavir in dimetilsolfossido (DMSO) aggiunto a 7 μl di M^{pro} (stock 1.5 mg/ml) in storage buffer e 180 μl di storage buffer. La mix è stata incubata per 20 min a 30 C° prima dell'aggiunta di 12 μl (40 μM) di substrato ottenendo un volume finale di 200 μl . All'emissione della fluorescenza, monitorata come per i saggi di attività è stato sottratto il bianco. Quest'ultimo è stato preparato con 30 μM di ritonavir aggiunti a 187 μl di tampone di attività incubati per 20 min a 30C°; al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 12 μl di substrato ottenendo anche in questo caso un volume finale di 200 μl .

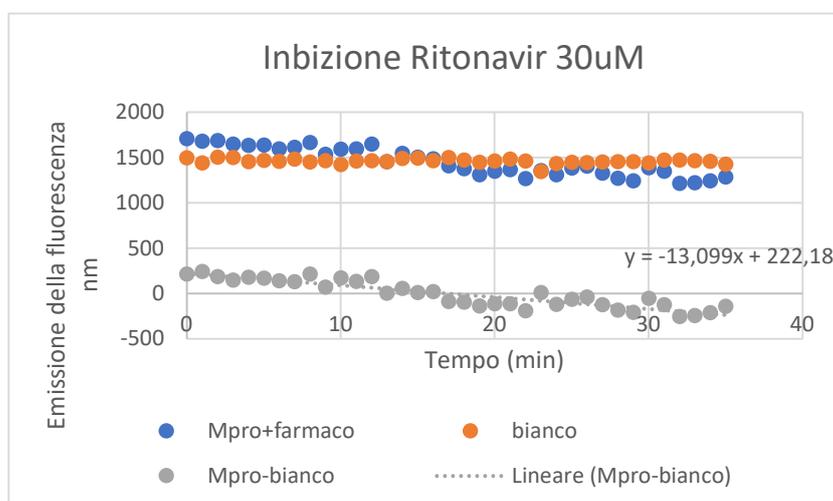


Figura 25: andamento dell'inibizione di Mpro in presenza di 30 μM di Ritonavir

Dal momento che è stata osservata una pendenza negativa della curva dell'emissione della fluorescenza in funzione del tempo, è stato ipotizzato che

potesse essere sufficiente una quantità minore di ritonavir per inibire l'attività di M^{pro} per cui, in un nuovo saggio, sono stati testati 0.5 µl di Ritonavir che però, non sono stati sufficienti per svolgere la funzione una quantità minore di iniritonavir la pendenza è leggermente maggiore di prima, attestando una minore inibizione inibitoria.

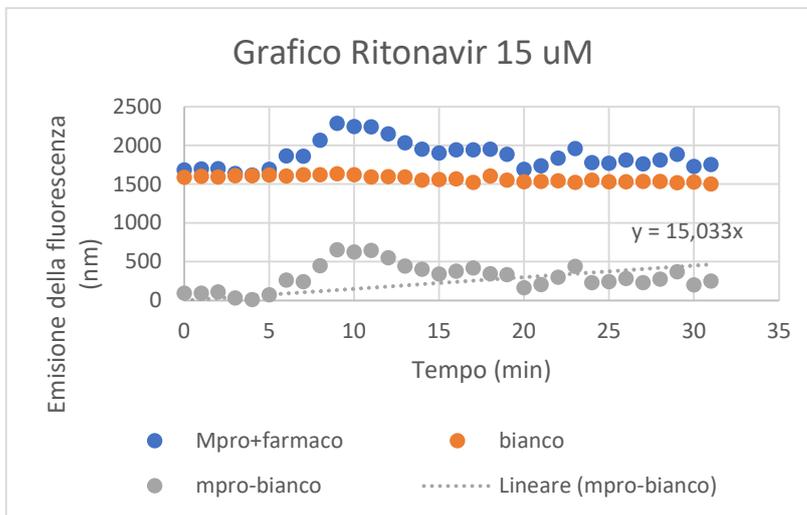


Figura 26: inibizione di Mpro in presenza di 15 µM di Ritonavir. L'andamento della curva non ha mostrato una significativa inibizione dell'attività della M^{pro}.

Il secondo inibitore utilizzato nei saggi enzimatici, la quercetina, è un flavonolo di origine naturale, ampiamente diffuso nei vegetali come capperi e cipolla rossa. Dimostrare la sua efficacia nell'inibizione della Mpro potrebbe aprire la strada per la sintesi di molecole che possano svolgere la funzione di inibizione in maniera più specifica.

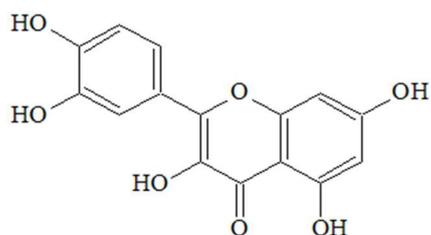


Figura 27: struttura molecolare della quercetina

Dallo stock della quercetina 3 mM sono state testate quantità di 30 e 45 μM . La mix finale contiene quantità differenti di tampone di attività fino ad un volume finale di 200 μl . I saggi sono stati condotti come per il Ritonavir.

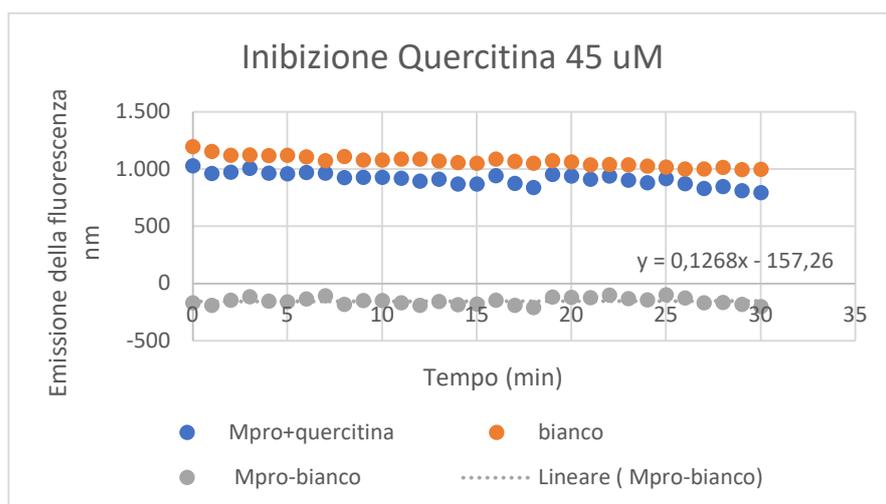


Figura 28: inibizione di M^{pro} in presenza di 45 μM di Quercitrina

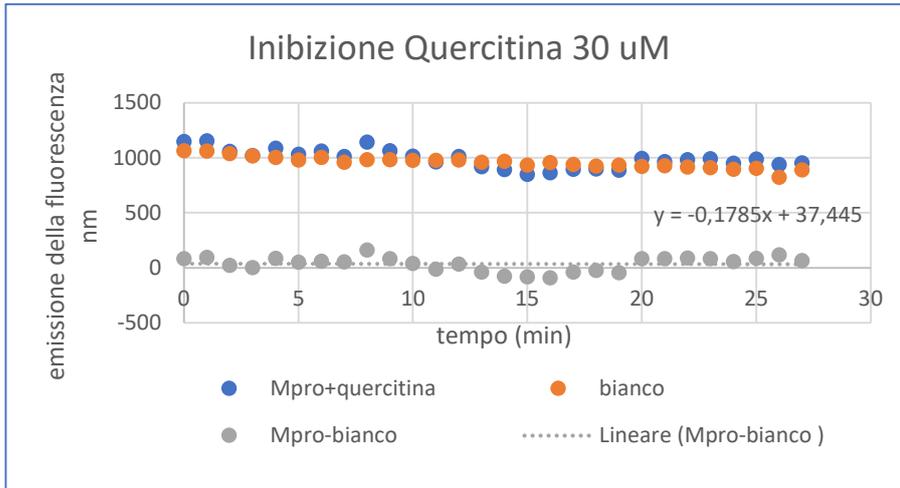


Figura 29: inibizione di M^{pro} in presenza di 30 μM di Quercetina

Come è possibile osservare dai grafici in figura 27 e 28, M^{pro} risulta inibita in presenza di Quercetina sia alla concentrazione di 45 μM, che alla concentrazione di 30 μM con una pendenza della curva molto simile.

Parte 2

Il secondo obiettivo del mio lavoro di tesi è stato quello di fare uno screening di condizioni di cristallizzazione della cutina sintasi utilizzando diversi kit della Jena Bioscience (vd paragrafo 3.14) allo scopo di trovare le condizioni di cristallizzazione che permettano di ottenere un cristallo della proteina da cui sarà possibile derivare la struttura tridimensionale.



Figura 30: da sinistra a destra, puntuali per eppendorf multichannel 100 μ l, kit di cristallizzazione, piastra 96 pozzetti 2-drop, eppendorf multichannel 100 μ l.

Utilizzando le eppendorf multichannel, 100 μ l di buffer del kit jena bioscience sono stati inoculati nei reservoir della piastra 96 pozzetti 2-drop dopo di che 1 μ l di buffer, prelevato da ogni reservoir è stato aggiunto ad una delle due drop insieme ad 1 μ l del buffer contenente la proteina cutina sintasi (2mg/ml).

Le piastre sono state poi riposte in frigo a 18 C° per circa 3 settimane.

Trascorso questo tempo le piastre sono state osservate allo stereoscopio per valutare la formazione dei cristalli.

In particolare, nel kit 201 L, la condizione di cristallizzazione del drop A9 è stata ottimale per la formazione di un cristallo che diffrange la luce.



Figura 31: cristallo ottenuto dalla drop A2 in cui si può osservare come diffrange la luce a seconda della posizione del raggio incidente

Precipitante	Buffer	Additivo
30.00 % w/v Polietilen-glicole-monometil-etero 550	100 mM BICINE; pH 9.0	100 mM NaCl

Figura 32: Condizioni di cristallizzazione della drop A9

In altri drop invece, sono stati osservati dei cristalli probabilmente in fase di crescita come nella drop A12 del kit 206 L.



Figura 33: Cristalli in fase di crescita nella drop A1

5. DISCUSSIONE

Il mio lavoro di tesi si è focalizzato sulla produzione di M^{pro} destinata a saggi di attività, di inibizione, studi strutturali e sullo screening delle condizioni di cristallizzazione di una nuova proteina di origine vegetale, la cutina sintasi.

Il sistema di espressione della M^{pro} in cellule di E. coli ha fornito una quantità di proteina inizialmente inferiore rispetto a quella ottenuta nel periodo precedente al mio lavoro di tesi al MaSBiC ma comunque sufficiente per effettuare i saggi di attività e di inibizione da parte di ligandi inibitori di origine sintetica (ritonavir) e naturale (quercetina).

I saggi di attività di M^{pro} sul substrato fluorescente specifico hanno restituito una curva dell'emissione della fluorescenza in funzione del tempo che aumenta in maniera lineare dimostrando che M^{pro} taglia il substrato con emissione di fluorescenza.

Dopo aver valutato l'effettiva attività della M^{pro} sul substrato ne è stata dimostrata l'inibizione da parte dei ligandi Ritonavir e Quercetina. Entrambi i ligandi hanno inibito in vitro l'attività della M^{pro} anche se, a parità di concentrazione (30µM), il Ritonavir ha mostrato un'attività inibitoria migliore rispetto alla Quercetina. Infatti, la curva dell'attività della M^{pro} in presenza di Ritonavir mostra una pendenza negativa rispetto a quella ottenuta in presenza

di Quercetina, la cui pendenza è invece positiva a parità di concentrazione (30 uM).

Dal momento che la proteina doveva essere utilizzata anche per studi strutturali, si è reso necessario produrne una maggiore quantità rispetto a quella inizialmente ottenuta e utilizzata per i saggi di attività e di inibizione.

Viste le precedenti produzioni della M^{pro} al MaSBiC, sono state condotte una serie di prove per indagare quale fosse il motivo che avesse portato ad una minore espressione della proteina.

Il Western Blot ha evidenziato la presenza della banda di giusto peso molecolare corrispondente a quello della proteina M^{pro}, perciò, anche se la banda non era troppo evidente è stato comunque possibile accertare la sua inequivocabile presenza.

Confermata l'espressione della proteina attraverso il Western Blot è stata fatta un'analisi di restrizione del plasmide da cui sono stati ottenuti i frammenti del giusto peso molecolare indicando che l'integrità del plasmide non era compromessa.

È stata inoltre valutata la possibilità che la M^{pro}, potesse formare degli aggregati proteici andando a costituire i corpi di inclusione. Dall' SDS page caricato con

i campioni di pellet, tuttavia, non è stato possibile identificare la banda corrispondente ad M^{pro} nei corpi di inclusione.

In conclusione, è stato ipotizzato un problema a livello della qualità del plasmide probabilmente a livello della regione regolatrice che avesse diminuito l'espressione della proteina in seguito ad induzione con IPTG.

In effetti, una volta ricomprato il plasmide, e utilizzando lo stesso protocollo delle precedenti espressioni e purificazioni, è stata ottenuta una quantità molto maggiore della proteina che ha reso possibile la sua purificazione oltre che dal sovranatante, anche dal non legato della prima colonna di cromatografia.

Insieme alla produzione della M^{pro}, dallo screening di diversi kit di cristallizzazione sono state ottenute le condizioni di cristallizzazione della proteina cutina sintasi. I dati relativi ai cristalli saranno acquisiti al sincrotrone.

6. CONCLUSIONE

il COVID-19 è una malattia altamente infettiva causata dal virus SARS-CoV-2. L'elevata trasmissibilità dell'infezione è stata recentemente contenuta grazie all'impiego dei vaccini su larga scala dopo circa un anno dall'inizio della pandemia. Oltre all'utilizzo dei vaccini un'arma strategica per combattere il virus è lo sviluppo di farmaci antivirali che possano inibire la replicazione virale. Uno dei target chiave per l'inibizione del ciclo replicativo di SARS-CoV-2 è la proteasi principale M^{pro} che permette l'attivazione delle subunità proteiche funzionali del virus stesso. In questo lavoro di tesi M^{pro} è stata prodotta per via ricombinante in quantità sufficienti a verificare l'azione inibente di potenziali ligandi sia di origine naturale sia derivanti da farmaci già utilizzati per altri trattamenti. M^{pro} prodotta verrà anche utilizzata per indagini strutturali. Oltre alla produzione di M^{pro}, da questo lavoro di tesi è stato possibile identificare le condizioni di cristallizzazione di una nuova proteina, la CSY, di cui non esistono ancora dati strutturali. Le acquisizioni dei dati relativi al cristallo ottenuto faranno immediatamente seguito a questa tesi in base alla disponibilità di slots di tempo-macchina al sincrotrone di Amburgo.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Zou, L., Dai, L., Zhang, X., Zhang, Z., & Zhang, Z. (2020). Hydroxychloroquine and chloroquine: a potential and controversial treatment for COVID-19. *Archives of pharmacal research*, 43(8), 765-772.

[2] Mahdy, M. A., Younis, W., & Ewaida, Z. (2020). An overview of SARS-CoV-2 and animal infection. *Frontiers in veterinary science*, 7, 1084.)

[3] Ji, W., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., & Li, X. (2020). Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *Journal of medical virology*, 92(4), 433-440.

[4] Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., ... & Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Military Medical Research*, 7(1), 1-10.

[5] Martellucci, C. A., Flacco, M. E., Cappadona, R., Bravi, F., Mantovani, L., & Manzoli, L. (2020). SARS-CoV-2 pandemic: An overview. *Advances in biological regulation*, 77, 100736.,

[6] V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170.

[7] Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 724.

[8] Immagine (https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species)

[9] Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., ... & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878.

[10] McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F. A., Tortorici, M. A., Pinto, D., Walls, A. C., ... & Veerler, D. (2021). N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell*, 184(9), 2332-2347.

[11] Puray-Chavez, M., LaPak, K. M., Schrank, T. P., Elliott, J. L., Bhatt, D. P., Agajanian, M. J., ... & Kutluay, S. B. (2021). Systematic analysis of SARS-CoV-2 infection of an ACE2-negative human airway cell. *Cell Reports*, 36(2), 109364.

[12] V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170.

[13] Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11727-11734.

[14] Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells*, 9(5), 1267.

[15] Malone, B., Urakova, N., Snijder, E. J., & Campbell, E. A. (2022). Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 21-39.

[16] Machhi, J., Herskovitz, J., Senan, A. M., Dutta, D., Nath, B., Oleynikov, M. D., ... & Kevadiya, B. D. (2020). The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15(3), 359-386.

[17] Park, S. J., Kim, Y. G., & Park, H. J. (2011). Identification of RNA pseudoknot-binding ligand that inhibits the– 1 ribosomal frameshifting of SARS-coronavirus by structure-based virtual screening. *Journal of the American Chemical Society*, 133(26), 10094-10100.

[18] Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells*, 9(5), 1267.

[19] Drożdżał, S., Rosik, J., Lechowicz, K., Machaj, F., Szostak, B., Przybyciński, J., ... & Łos, M. J. (2021). An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment. *Drug Resistance Updates*, 100794.

[20] Haque, A., & Pant, A. B. (2022). Mitigating Covid-19 in the face of emerging virus variants, breakthrough infections and vaccine hesitancy. *Journal of autoimmunity*, 102792.

[21] Mei, M., & Tan, X. (2021). Current strategies of antiviral drug discovery for COVID-19. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 310.

[22] Davis, D. A., Bulut, H., Shrestha, P., Yaparla, A., Jaeger, H. K., Hattori, S. I., ... & Yarchoan, R. (2021). Regulation of the dimerization and activity of SARS-CoV-2 main protease through reversible glutathionylation of cysteine 300. *Mbio*, 12(4), e02094-21.

[23] immagine (<https://viralzone.expasy.org/9076>)

[24] Panagiotopoulos, A. A., Karakasiliotis, I., Kotzampasi, D. M., Dimitriou, M., Sourvinos, G., Kampa, M., ... & Daskalakis, V. (2021). Natural Polyphenols Inhibit the Dimerization of the SARS-CoV-2 Main Protease: The Case of Fortunellin and Its Structural Analogs. *Molecules*, 26(19), 6068.

[25] Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., ... & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 368(6489), 409-412.

[26] Zanichelli, L'infezione alla luce della biologia strutturale - SARS-CoV-2

[27] Ullah, A., & Ullah, K. (2021). Inhibition of SARS-CoV-2 3CL Mpro by Natural and Synthetic Inhibitors: Potential Implication for Vaccine Production Against COVID-19. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 211.

[28] Arutyunova, E., Khan, M. B., Fischer, C., Lu, J., Lamer, T., Vuong, W., ... & Lemieux, M. J. (2021). N-Terminal finger stabilizes the S1 pocket for the reversible feline drug GC376 in the SARS-CoV-2 Mpro dimer. *Journal of molecular biology*, 433(13), 167003.

[29] Yu, W., Wu, X., Zhao, Y., Chen, C., Yang, Z., Zhang, X., ... & Yuan, X. (2021). Computational Simulation of HIV Protease Inhibitors to the Main Protease (Mpro) of SARS-CoV-2: Implications for COVID-19 Drugs Design. *Molecules*, 26(23), 7385.

[30] Peng, Y., Wu, P., Schartup, A. T., & Zhang, Y. (2021). Plastic waste release caused by COVID-19 and its fate in the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(47).

[31] Chepyshko, H., Lai, C. P., Huang, L. M., Liu, J. H., & Shaw, J. F. (2012). Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. japonica) genome: new insights from bioinformatics analysis. *BMC genomics*, 13(1), 1-19.

[32] Vujaklija, I., Bielen, A., Paradžik, T., Biđin, S., Goldstein, P., & Vujaklija, D. (2016). An effective approach for annotation of protein families with low sequence similarity and conserved motifs: identifying GDSL hydrolases across the plant kingdom. *BMC bioinformatics*, 17(1), 1-17.

[33] Yeats, T. H., Huang, W., Chatterjee, S., Viart, H. M. F., Clausen, M. H., Stark, R. E., & Rose, J. K. (2014). Tomato Cutin Deficient 1 (CD 1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *The Plant Journal*, 77(5), 667-675.

[34] A beginner's guide to X-ray data processing

[35] imagine (<http://arymacrixx.blogspot.com/2013/10/minerali-e-la-loro-struttura.html>)

[36] imagine (https://it.wikipedia.org/wiki/Costante_di_reticolo)

[37] http://amsdottorato.unibo.it/1625/1/TESI_GT.pdf

[38] Bhatt, P. R., Scaiola, A., Loughran, G., Leibundgut, M., Kratzel, A., Meurs, R., ... & Ban, N. (2021). Structural basis of ribosomal frameshifting

during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*, 372(6548), 1306-1313.