



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea
Scienze Biologiche

«Espressione e purificazione di un mutante della Calmodulina
umana per applicazioni biosensoristiche »

«Expression and purification of a mutated version
of Calmodulin for biosensing application »

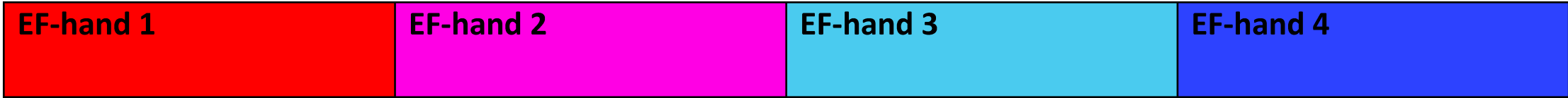
Tesi di laurea di Pompili Aurora

Relatore : prof Di Marino Daniele

Anno accademico 2022/2023

Sessione estiva

Calmodulina(CaM)

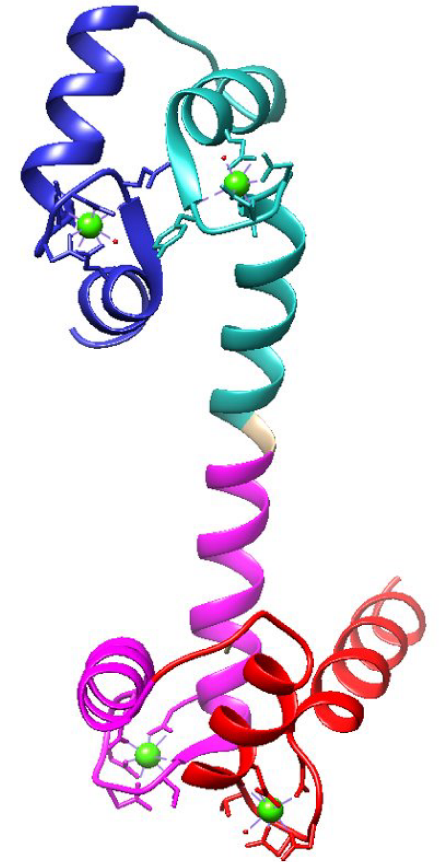


N-lobe

C-lobe

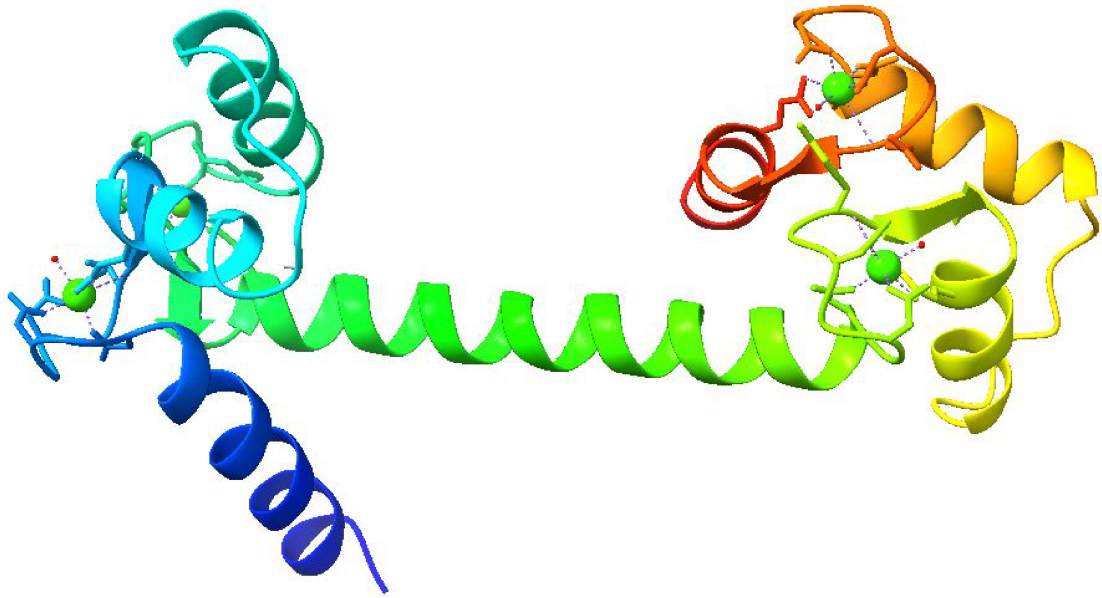
EF-hand = helix-loop-helix

- Conformazione a manubrio
- Due domini globulari collegati da un connettore flessibile
- Ognuna delle due porzioni terminali può legarsi con due ioni Ca con elevata affinità
- il legame con il calcio fa assumere alla calmodulina una conformazione estesa dove espone un gran numero di siti idrofobici che permettono interazioni con una gran varietà di target
- Il dominio C-terminale è 10 volte più affine al calcio del dominio N-terminale



PDB ID: 1CCL

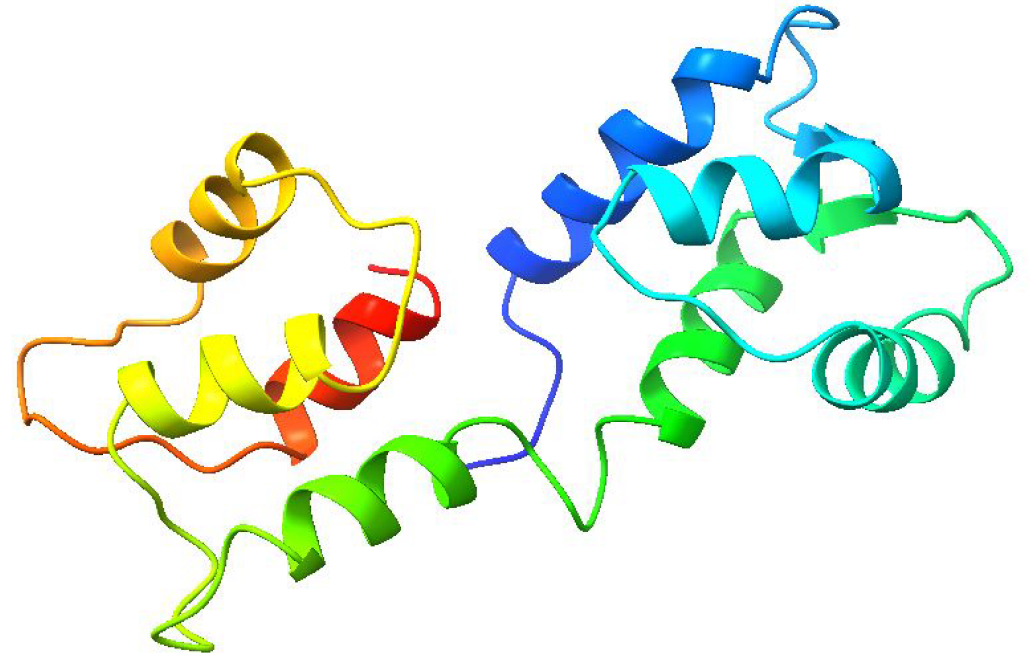
CONFORMAZIONE ESTESA A MANUBRIO



Calmodulina legata al Ca²⁺
ottenuta per cristallografia

PDB ID: 1CLL

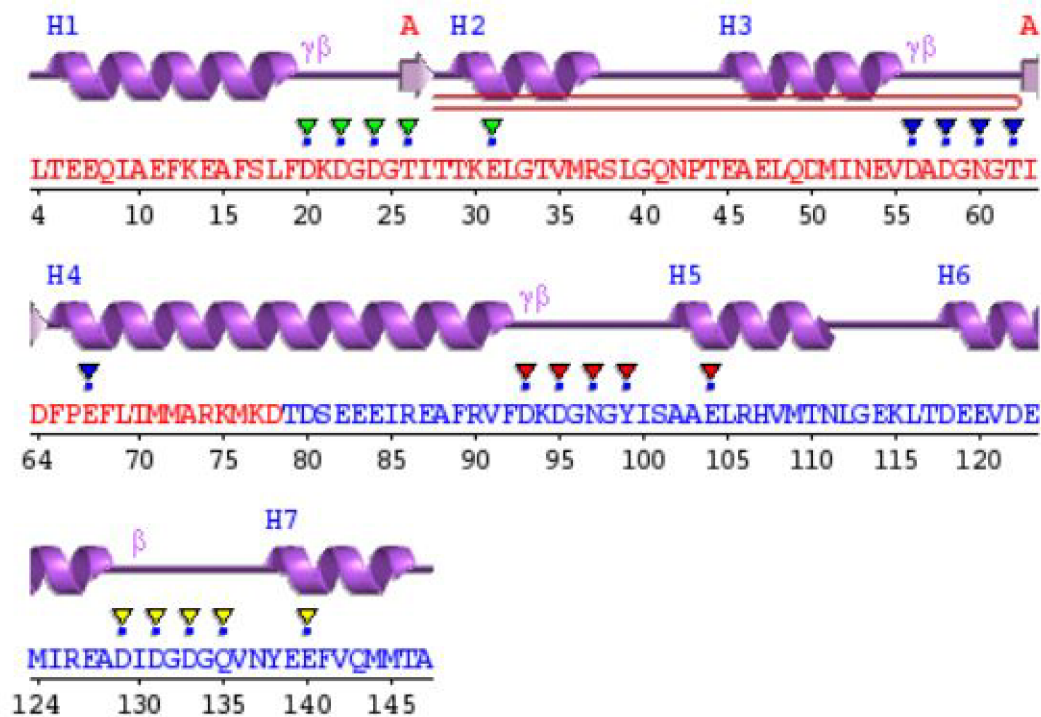
CONFORMAZIONE CHIUSA



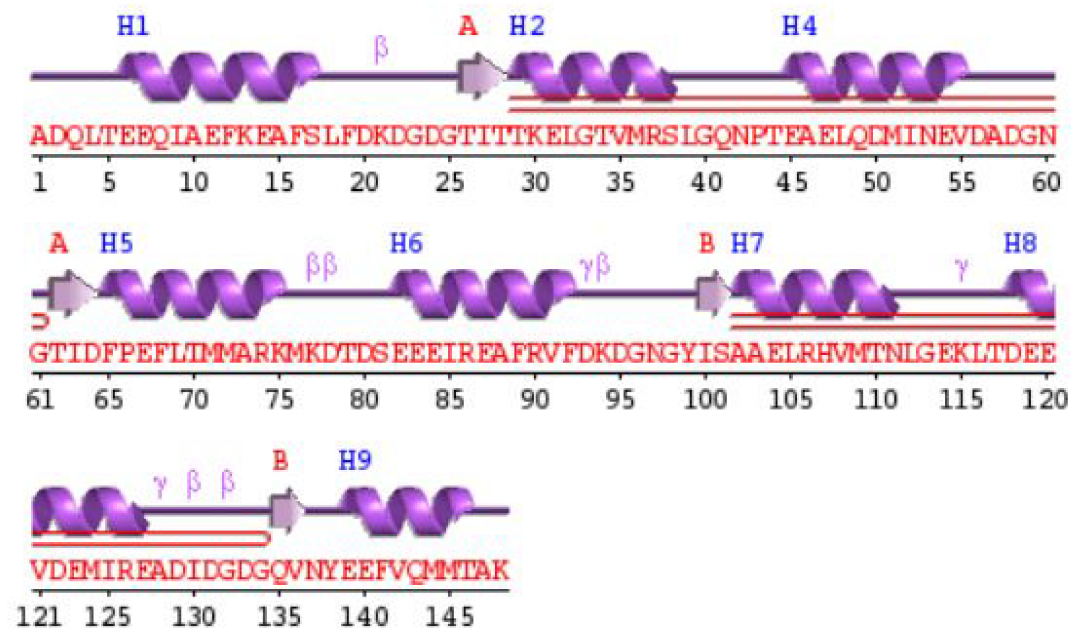
Calmodulina non legata al Ca²⁺
ottenuta per NMR

PDB ID: 1CFC

Topologia CaM ottenuta per cristallografia

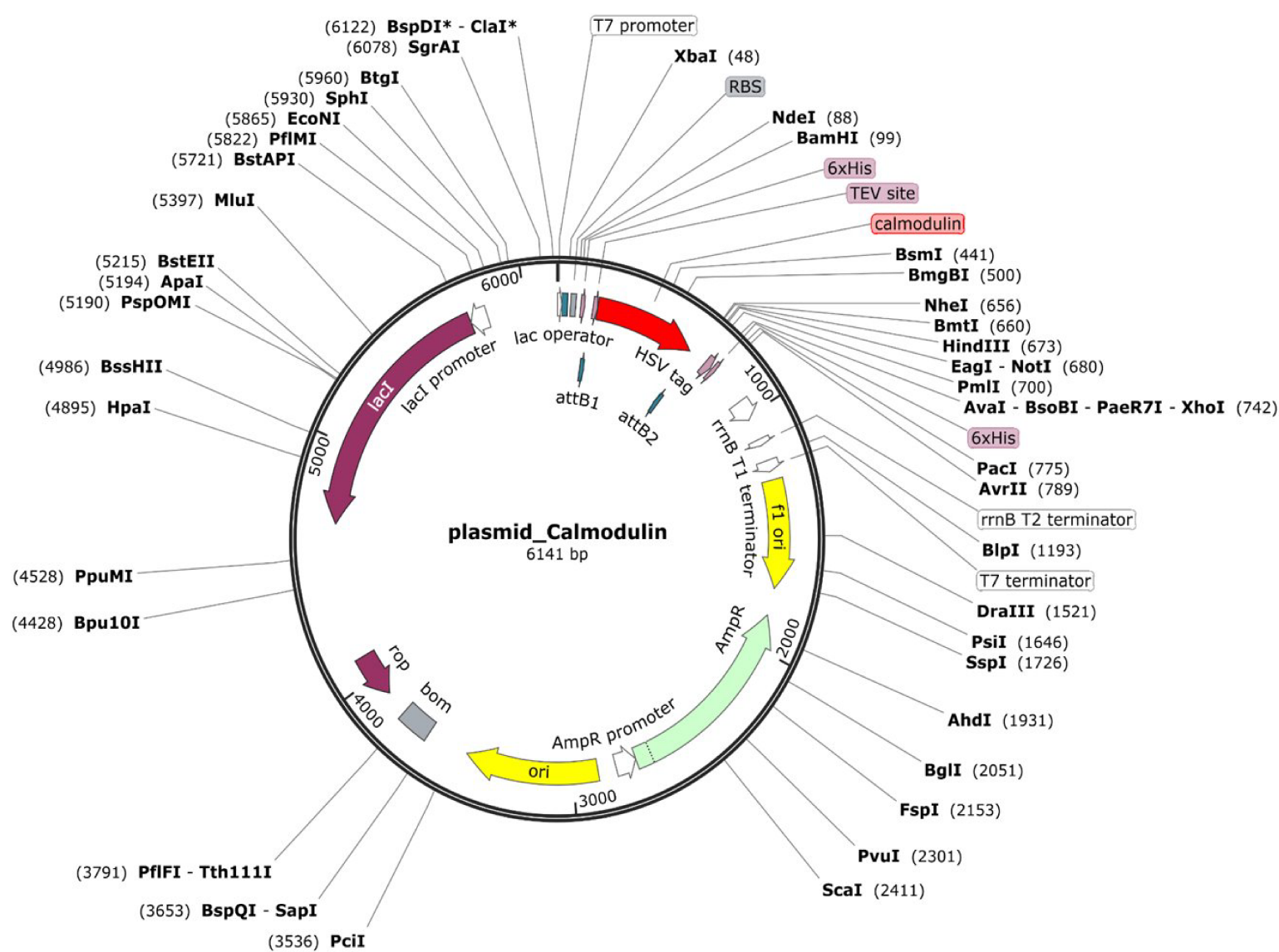


Topologia CaM ottenuta per NMR



Vettore pDest-527

- Vettore di espressione procariotico
- Conferisce resistenza all'ampicillina
- Viene acquisito e espresso da cellule competenti di *E.coli* DH5
- dimensioni: 6000bp
- Tag: His6TEV (N-terminale)
- all plasmide una volta propagato in LB+ ampicillina e fatto crescere O/N e preparato un inoculo di 5 ml viene estratto.



6xHis tag	Calmodulina
-----------	-------------

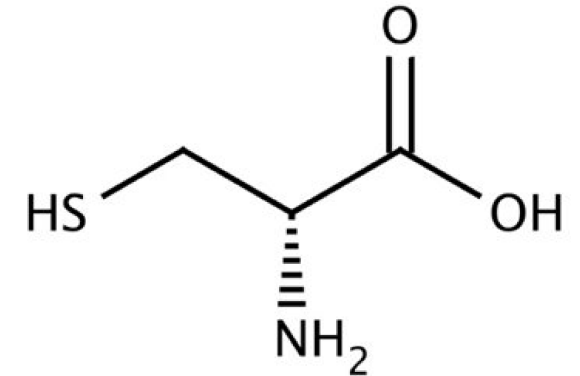
N-terminale

MUTAGENESI: INSERZIONE CISTEINA AL C-terminale

6xHis tag	Calmodulina	+ Cys
-----------	-------------	-------

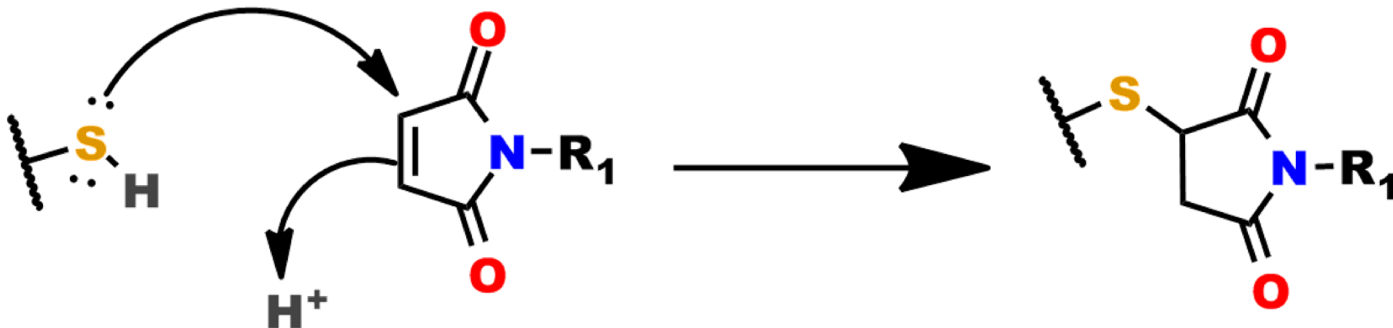
N-terminale

C-terminale



Struttura Cisteina

PERCHE' USARE LA CISTEINA COME TARGET?

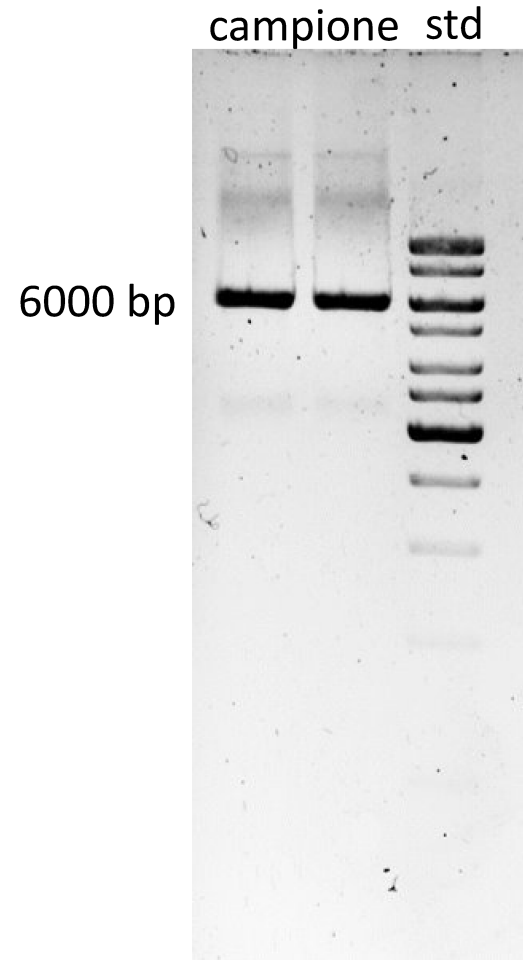


Il Gruppo tiolo (SH) della cisteina forma un legame tioestere con il maleimide presente nell'oligo disegnato per migliorare l'orientamento della calmodulina spontaneamente, passaggio fondamentale per applicazione al biosensore.

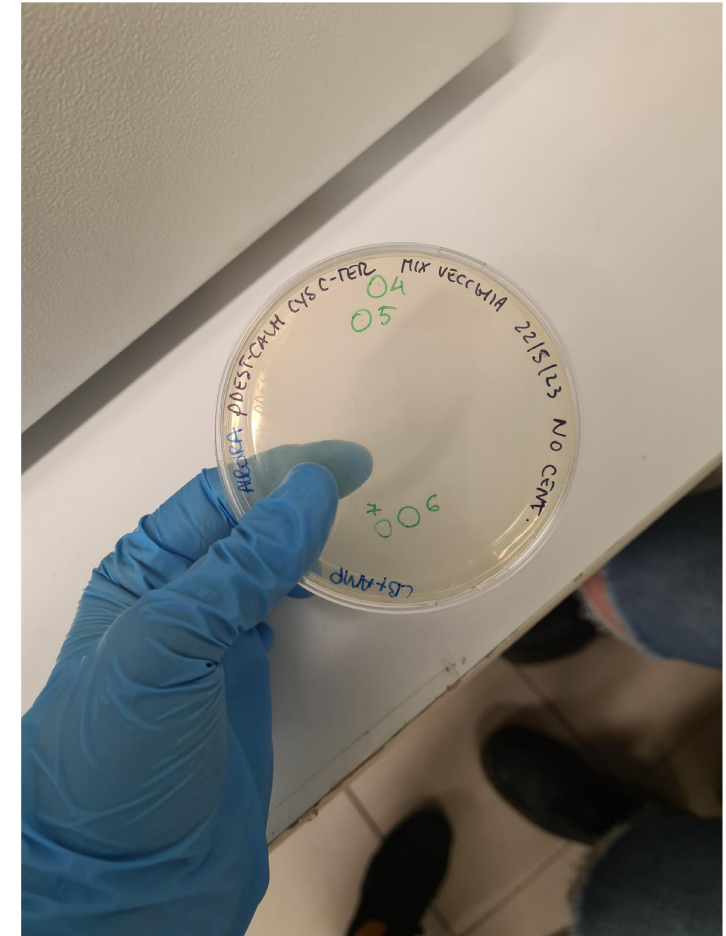
INSERZIONE DELLA CISTEINA

Prevede:

- 1) Amplificazione del plasmide con la polimerasi KOD attraverso la PCR
- 2) Trattamento del plasmide con DpnI
- 3) Estrazione DNA dopo amplificazione dal gel di agarosio 1 %
- 4) Trattamento con T4 PNK
- 5) Trattamento con ligasi T4 per chiudere il plasmide
- 6) Trasformazione in cellule *E.coli* GC5 competenti della mix di reazione
- 7) sequenziamento del plasmide



Gel di agarosio 1 %



Crescita in LB+ agar+ Amp delle cellule trasformate

Risultati del sequenziamento



CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

CALMODULINE      ADQLTTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQDMINEVDADGN      60
CALMODULINE_C2   ADQLTTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQDMINEVDADGN      60
CALMODULINE_C5   ADQLTTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQDMINEVDADGN      60
CALMODULINE_C7   ADQLTTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQDMINEVDADGN      60
CALMODULINE_C1   ADQLTTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQDMINEVDADGN      60
CALMODULINE_C3   ADQLTTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQDMINEVDADGN      60
CALMODULINE_C6   ADQLTTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQDMINEVDADGN      60
*****

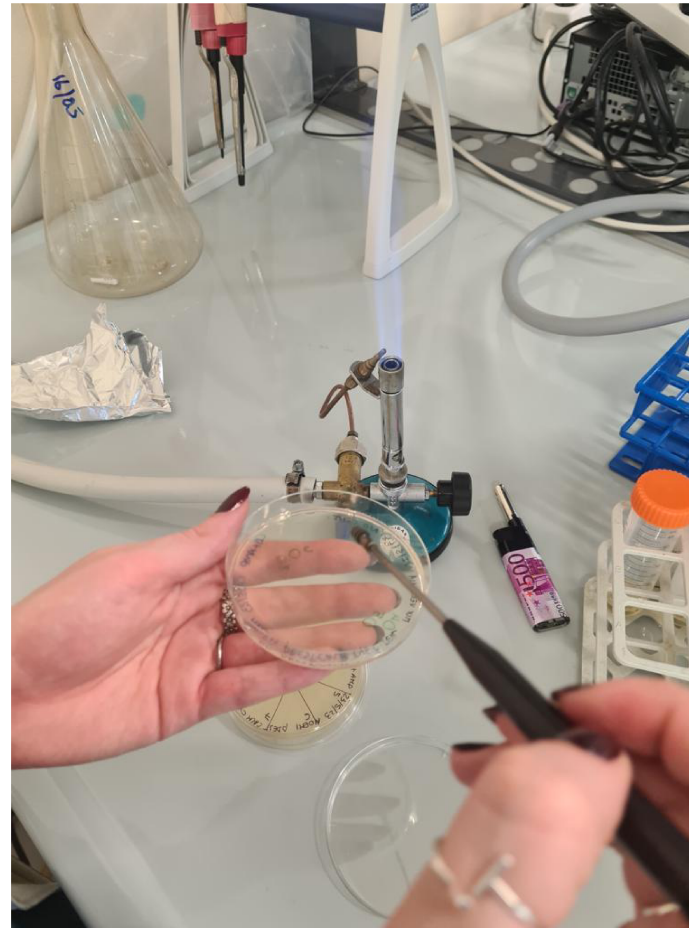
CALMODULINE      GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIIEAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEE      120
CALMODULINE_C2   GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIIEAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEE      120
CALMODULINE_C5   GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIIEAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEE      120
CALMODULINE_C7   GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIIEAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEE      120
CALMODULINE_C1   GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIIEAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEE      120
CALMODULINE_C3   GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIIEAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEE      120
CALMODULINE_C6   GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIIEAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEE      120
*****

CALMODULINE      VDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK*- 148
CALMODULINE_C2   VDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK*- 148
CALMODULINE_C5   VDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK*- 148S|
CALMODULINE_C7   VDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK*- 148
CALMODULINE_C1   VDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAKC* 149
CALMODULINE_C3   VDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAKC* 149
CALMODULINE_C6   VDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAKC* 149
*****
    
```

Delle sette colonie cresciute solamente C1,C3 e C6 hanno acquisito la mutazione in C-terminale.

ESPRESSIONE

- Stemperare colonia in 10 ml di LB + ampicillina+ cloramfenicolo dopo trasformazione in cellule competenti di *E.coli* BL21
- crescita O/N a 37° in agitazione a 180 rpm
- Lettura OD fino al raggiungimento di 0.6
- Inoculo in 500 ml di terreno LB+ ampicillina+ cloramfenicolo
- Induzione con Isopropil 0.5 mM per 3 ore a 37° 180 rpm



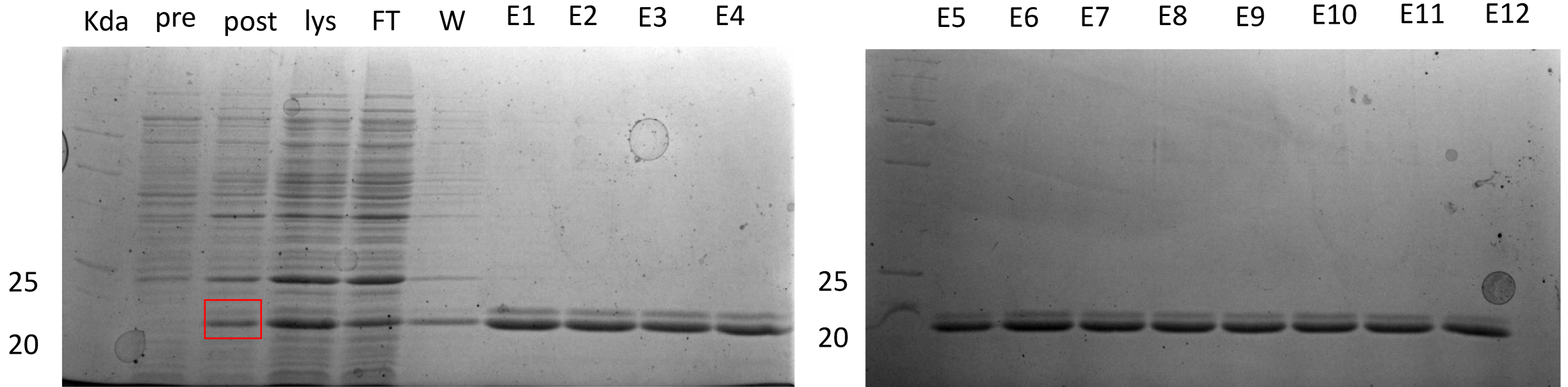
Preparazione dell'inoculo in 10 ml di terreno



Crescita cellule trasformate in agitazione

PURIFICAZIONE

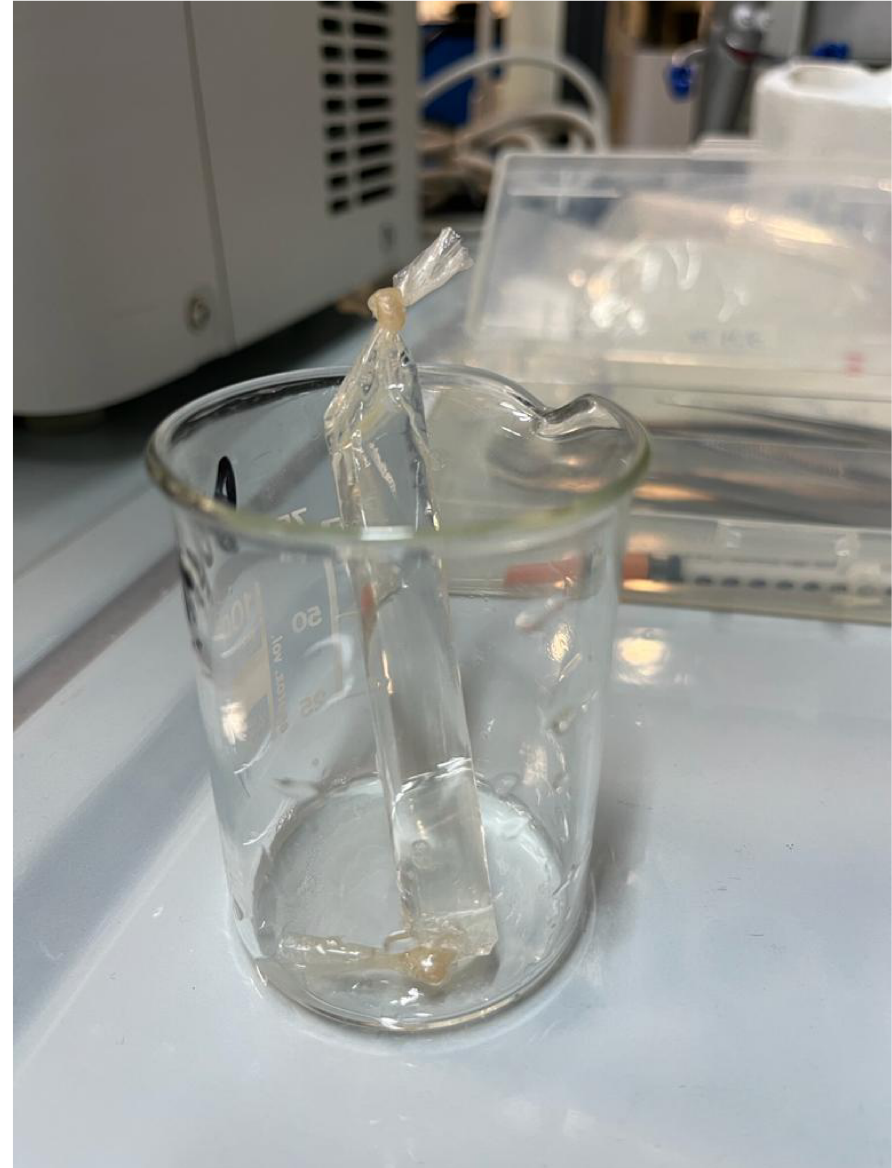
- Risospendere il pellet con il buffer di lisi e sonicare
- Centrifugare a 12000xg per 30'
- Tecnica utilizzata : cromatografia di affinita' tramite la resina NINTA
- Caricare gli eluati nel gel



Nel postindotto è presente la calmodulina come in tutti le frazioni di eluato, quindi si è purificata la proteina.

DIALISI

- **OBIETTIVO:** rimuovere l'imidazolo che si è legato alla resina
- Il protocollo prevede:
- preparazione del buffer di dialisi
- Incubazione O/N a 4 ° degli eluati in agitazione
- **RISULTATI :** La proteina non è precipitata grazie alla sua stabilità



Membrana di nitrocellulosa contenente eluati postdialisi

CONCLUSIONI

La proteina ottenuta può essere utilizzata per diverse applicazioni come il biosensore gFET ,per migliorare il suo orientamento e risalire ai relativi cambiamenti conformazionali.

Prima di utilizzare la proteina purificata e che ha acquisito la mutazione però è necessario rimuovere la coda di istidina con TEV proteasi