



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

**Tecnologie ricombinanti per la produzione della chemochina
umana CXCL12 in *E. coli***

**Recombinant technologies for human chemokine CXCL12
production in *E. coli***

Tesi di Laurea Magistrale:

Alessia Di Matteo

Relatore:

Prof.ssa Tiziana Cacciamani

Correlatore:

Dott.ssa Chiara Ardiccioni

Sessione Straordinaria

Anno Accademico, 2018-2019

Sommario

UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE.....	1
Corso di Laurea Magistrale.....	1
1. Introduzione	5
1.1. Le Chemochine.....	5
1.2. CXCL12	8
1.3. Interazione di CXCL12 con i recettori.....	10
1.4. Le isoforme di CXCL12.....	13
1.5. Patologie correlate all'asse CXCL12/CXCR4/ACKR3	16
1.6. Strategie terapeutiche che interessano l'asse CXCL12/CXCR4/ACKR3	20
1.7. Produzione di proteine ricombinanti e scelta del sistema ospite	21
1.8. Espressione in Escherichia coli.....	24
1.9. Sistema di espressione	26
2. Scopo della tesi	30
3. Materiali e Metodi	32
3.1. Ceppi batterici.....	32
3.2. Vettori di espressione: pMCSG7 – pMCSG9.....	34
3.3. Costruzione del plasmide ricombinante.....	41
3.4. Terreni di coltura	46
3.5. Amplificazione dei geni sintetici	47
3.6. Elettroforesi	48
3.7. LIC – Ligation Independent Cloning	48
3.8. Estrazione DNA da gel di agarosio e da prodotti di PCR	52
3.9. Trasformazione batterica	52
3.10. Colony PCR	53
3.11. Minipreparazione di DNA plasmidico	55
3.12. Test di espressione con induzione da IPTG.....	56
3.13. Purificazione della proteina ricombinante – Cromatografia di affinità Ni-NTA (IMAC)	58
3.14. Purificazione in piccola scala su Filter Plate.....	63
3.15. Concentrazione della frazione proteica mediante ultrafiltrazione	64
3.16 Dialisi.....	65
3.17. Metodo Bradford per dosaggio delle proteine	66
4. Risultati sperimentali	68
4.1. Amplificazione delle isoforme del gene CXCL12.....	68

4.2.	<i>Estrazione DNA (Nucleospin Clean-up)</i>	70
4.3.	<i>Clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning) in pMCSG7-EK</i>	72
4.3.1.	Preparazione del vettore:	72
4.3.2.	Preparazione dell'inserto:	74
4.3.3.	Fase di Annealing:	75
4.4.	<i>Trasformazione E. coli GC-5 competenti per l'acquisizione del plasmide ricombinante.</i> ..	75
4.5.	<i>PCR Colony</i>	76
4.6.	<i>Estrazione DNA plasmidico con kit QIAprep Miniprep e quantizzazione con spettrofotometro Nanodrop</i>	77
4.7.	<i>Sequenziamento BMR Genomics</i>	78
4.8.	<i>Trasformazione E. coli BL-21 (DE3) pLysS competenti per acquisizione del plasmide ricombinante p7-EK e test di espressione mediante induzione con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside)</i>	81
4.8.1.	Trasformazione ceppo <i>E. coli BL-21 (DE3) pLysS</i> e preparazione colture per test di induzione	81
4.8.2.	Induzione dei campioni con IPTG (0.2mM)	82
4.9.	<i>Purificazione clone γ_3 (p7-EK) mediante Cromatografia di affinità (Ni-IDA)</i>	84
4.10.	<i>Clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning) in p9-EK</i>	86
4.10.1.	Preparazione del vettore:	87
4.10.2.	Preparazione dell'inserto:	89
4.10.3.	Fase di Annealing:	90
4.11.	<i>Trasformazione E. coli GC-5 competenti per l'acquisizione del plasmide ricombinante p9-EK</i>	90
4.12.	<i>PCR Colony</i>	91
4.13.	<i>Estrazione DNA plasmidico con kit QIAprep Miniprep</i>	92
4.14.	<i>Sequenziamento BMR Genomics</i>	93
4.15.	<i>Test di espressione in BL21 (DE3) pLysS</i>	93
4.16.	<i>Trasformazione E. coli BL-21 (DE3) pLysS competenti per acquisizione del plasmide ricombinante p9-EK e Test di espressione per Induzione con IPTG</i>	95
4.16.1.	Trasformazione <i>E.coli BL-21 (DE3) pLysS</i> e preparazione colture per Test di induzione con IPTG	95
4.16.2.	Induzione con IPTG (0,2mM) in MIDI-scale	96
4.17.	<i>Prova preliminare di espressione in 3 ceppi E. coli diversi: BL21(DE3) pLysS, C41(DE3) e Rosetta (DE3)</i>	97
4.18.	<i>Trasformazione in E. coli C41 (DE3) competenti per acquisizione del plasmide ricombinante, di CXCL12-Isoform 7 e CXCL12-Isoform α, e test di espressione per induzione con IPTG</i>	99

4.18.1. Trasformazione <i>E. coli</i> C41 (DE3) e preparazione colture per Test di induzione con IPTG	99
4.18.2. Induzione con IPTG (0,2mM)	100
4.18.3. Trasformazione <i>E. coli</i> C41 (DE3) e preparazione colture per Test di induzione con IPTG	101
4.18.4. Induzione con IPTG (0,2mM)	102
4.19. Purificazione cloni Iso7_{#1} e α_{#1} (pMSCG9-EK) in <i>E. coli</i> C41 (DE3) mediante Cromatografia di affinità (Ni-IDA)	103
4.19.1. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution	107
4.19.2. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution	110
4.20. Trasformazione ed espressione in <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) competenti per acquisizione del plasmide ricombinante, di CXCL12-Isoform 7 e CXCL12- Isoform α, per test di espressione per induzione con IPTG	112
4.20.1. Trasformazione <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) per test di espressione con induzione da IPTG (0,2 mM)	112
4.21. Purificazione cloni Iso7 e α (p9-EK) in <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) mediante Cromatografia di affinità (Ni-IDA)	113
4.21.1. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution	115
4.21.1. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution	118
4.21.2. Trattamento del Flow-through derivante dalla cromatografia di affinità in Ni-IDA per α in Rosetta (DE3)	119
4.22. Dosaggio proteico con metodo Bradford	121
4.23. Rimozione del TAG con proteasi specifica (Enterochinasi) e recupero di CXCL12	122
5. Conclusione	128
BIBLIOGRAFIA	139

1. Introduzione

1.1. Le Chemochine

Le chemochine costituiscono una famiglia di citochine chemioattrattive a basso peso molecolare (8-14 kDa), strutturalmente omologhe, che si dividono in quattro subfamiglie, le due principali si differenziano in base alla posizione dei primi due dei quattro residui di cisteina (Cys) al N-terminale che determinano la formazione di due ponti disolfuro stabilizzanti.

Nello specifico si tratta di: CXC, dove i due residui di Cys sono separati da un aminoacido qualsiasi, non conservato, e che possiede quale principale esponente l'interleuchina 8 (IL-8 anche detta CXCL8), e CC, dove i due residui di Cys si trovano adiacenti l'uno all'altro e che include RANTES, MCP-1 e MIP-1 β .

Sulla base della loro funzione possono essere ulteriormente classificate in:

- chemochine infiammatorie ed inducibili, regolate da stimoli proinfiammatori (TNF, LPS, IL-1) e coinvolte nel reclutamento dei leucociti nei siti di infezione, infiammazione e danno tissutale (IL-8, NAP-2, Mig, RANTES, MCP-1/3)
- chemochine omeostatiche e costitutive, espresse costitutivamente e coinvolte nel controllo della migrazione dei leucociti durante

l'emopoiesi, nel midollo osseo e nel timo, durante la risposta immunitaria adattativa, nella milza e nei linfonodi, ed inoltre risultano fondamentali per la corretta organogenesi (SDF-1 o CXCL12, BCA-1, TARC, ELC, SLC)

La loro attività fisiologica è mediata dal riconoscimento selettivo e dall'attivazione di recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori di membrana associati a proteine G (GPCR) anche detti recettori a sette domini trans-membrana, strutturalmente formati da una regione extracellulare che lega la chemochina, da sette α -eliche transmembrana ed associati sul versante citoplasmatico ad una proteina G. Legano inoltre, attraverso un sito di legame diverso da quello per GPCR, i glicosaminoglicani (GAGs, lunghi polimeri di unità di disaccaridi), come l'eparina e l'eparansolfato. Per via della loro carica negativa, i GAGs formano una matrice extracellulare che attrae le chemochine, cariche positivamente, e ciò risulta essere fondamentale per la formazione di un gradiente di concentrazione delle chemochine stesse che controlla la chemiotassi e guida la loro corretta presentazione ai leucociti, permettendo a questi ultimi di superare la barriera endoteliale e di migrare verso il tessuto target. Inoltre nel caso di CXCL12 il legame con GAG protegge il terminale aminico della chemochina dal troncamento e dall'inattivazione.

La struttura delle chemochine è stata caratterizzata a fondo e consiste di un N-terminale flessibile, implicato nell'interazione con uno specifico recettore, seguito da tre β -sheet antiparalleli e da una α -elica al C-terminale; come accennato sopra i residui di cisteina presenti formano due ponti disolfuro che stabilizzano la struttura secondaria. Le strutture terziaria e quaternaria invece possono essere diverse, infatti alcune chemochine si presentano come costitutivamente monomeriche mentre altre si associano a formare omodimeri, attraverso i residui del terminale aminico per le chemochine CC e attraverso il primo β -strand per le chemochine CXC, ma possono formare anche eterodimeri. Inizialmente si riteneva che la dimerizzazione fosse un artefatto dovuto alle alte concentrazioni di chemochine necessarie per gli studi strutturali e, successivamente, mediante esperimenti di mutagenesi, si è visto che impedendo la formazione del dimero nella chemochina CXCL8 non si andava ad alterare la capacità di legame al recettore *in vitro*. Di contro, studi più recenti hanno dimostrato che la dimerizzazione risulta essere fondamentale per alcune chemochine per l'attività di reclutamento *in vivo* dei leucociti, in particolare si è visto che è presente un equilibrio tra forma monomerica e dimerica nella chemochina CXCL12 in cui sia il pH della soluzione che la presenza di controioni stabilizzanti influenzano fortemente la dissociazione del dimero.

1.2. CXCL12

Tra le chemochine omeostatiche e costitutive vi è CXCL12. Come detto sopra le chemochine costitutivamente espresse svolgono un ruolo chiave nei processi di organogenesi a livello embrionale e nella regolazione omeostatica di diversi processi. Inizialmente scoperta e descritta come PBGF (pre-B cell growth factor), indispensabile per processi omeostatici, quali la linfopoiesi e l'embriogenesi, è stata vista poi essere costitutivamente espressa a livello delle cellule stromali del midollo osseo e quindi identificata con il nome di SDF-1 (stromal cell-derived factor-1); nel midollo osseo è responsabile della ritenzione e del mantenimento della riserva di cellule staminali ematopoietiche, in particolare l'interazione tra CXCL12 (prodotto dalle cellule stromali) e il recettore CXCR4 (espresso dai progenitori ematopoietici) ha dimostrato di svolgere un ruolo fondamentale nel promuovere la ritenzione delle cellule staminali ematopoietiche a livello midollare. È inoltre importante precisare che CXCL12 ha la capacità di stimolare diverse risposte cellulari in base alla sua concentrazione, nello specifico alte concentrazioni della chemochina inducono la desensibilizzazione e la successiva internalizzazione del recettore con conseguente stimolo della cascata del segnale, garantendo la sopravvivenza cellulare e la quiescenza. In maniera opposta, basse concentrazioni di CXCL12 stimolano la migrazione cellulare, la proliferazione e fenomeni di

differenziamento, in sinergia con altre citochine. Si può pertanto affermare che l'asse CXCL12/CXCR4 è tra i principali mediatori del reclutamento in circolo e della mobilitazione dei progenitori ematopoietici.

CXCL12 è fondamentale per il corretto sviluppo di cuore, sistema nervoso, gonadi e dei vasi sanguigni e una dimostrazione della sua importanza è rappresentata da esperimenti di knock-out e delezione del gene *Cxcl12* in topi, i quali vanno incontro a morte perinatale.

CXCL12 si distingue dagli altri membri della subfamiglia CXC in quanto la maggior parte dei geni codificanti per chemochine sono collocati sul cromosoma 4q21, mentre il gene codificante per CXCL12 si localizza sul cromosoma 10q11; è inoltre l'unica chemochina con splicing differenziale del mRNA: da analisi dello splicing alternativo sono state infatti identificate sette varianti nell'uomo (α , β , γ , δ , ϵ , θ e iso7) e tre (α , β , γ) sono state identificate nel topo; tali isoforme derivano appunto da eventi di splicing alternativo in cui esoni differenti vengono aggiunti ai primi tre esoni, pertanto le isoforme di CXCL12 risultano essere identiche nei primi 88 residui aminoacidici del terminale aminico. Per di più è stato dimostrato che CXCL12 umana presenta una percentuale di omologia del 90% con il corrispettivo nel topo, sia a livello genomico che proteico (la chemochina umana e la corrispondente murina sono in grado di cross-reagire). Si è visto anche che gli ortologhi, sia di CXCL12 che di CXCR4, con sequenza aminoacidica molto simile, si

ritrovano in organismi meno evoluti, quali la rana (*X. tropicalis*) e il pesce zebra (*D. rerio*), suggerendo una comune origine ancestrale per CXCL12 che testimonia l'importantissimo ruolo biologico e il fatto che vi sia stata una certa pressione evolutiva, tale che la proteina venisse mantenuta e fossero evitate le mutazioni.

1.3. Interazione di CXCL12 con i recettori

È stato dimostrato che CXCL12 non interagisce esclusivamente con CXCR4 ma anche con CXCR7, anche detto ACKR3 (recettore atipico per le chemochine 3), entrambi i recettori sono ampiamente espressi nelle cellule dei mammiferi, comprese le cellule tumorali, ma non è stato ancora appurato del tutto quale sia il loro livello di cooperazione nella risposta a CXCL12.

La chemochina viene inizialmente secreta come propeptide che sarà processato proteoliticamente con rimozione di 21 aminoacidi presenti all'estremità N-terminale, tale forma (monomeric) è instabile a livello ematico, per cui, come detto sopra, è fondamentale il legame con GAG che evita la possibile degradazione proteolitica e partecipa alla stabilizzazione del legame ligando-recettore. Nella forma matura di CXCL12, i primi 8 aminoacidi presenti all'estremità aminica ricoprono un ruolo cardine nell'interazione con i recettori, nello specifico i primi due aminoacidi (cioè

Lys-1 e Pro-2) attivano CXCR4 mentre gli altri sei permettono il corretto legame con il recettore. È stata inoltre identificata un'altra sequenza fondamentale per l'interazione con il recettore, la sequenza RFFESH, questa si è dimostrata essere coinvolta nel legame di CXCL12 con CXCR4 permettendo, attraverso cambiamenti conformazionali, l'attivazione del recettore stesso.

Come già accennato CXCR4 è un GPCR, per cui il legame con CXCL12 porta all'attivazione della proteina G α , β , γ eterotrimerica, nello specifico: allo stato inattivo la subunità α , della proteina G, lega GDP e si trova saldamente legata al complesso β/γ , ma, il legame con uno specifico ligando, provoca una alterazione conformazionale del recettore tale che vi sia un cambio conformazionale anche a livello della subunità α , la quale si dissocia dal complesso β/γ con successiva sostituzione del GDP legato con GTP che permette al recettore di assumere lo stato attivo. Di conseguenza le unità α e β/γ dissociate andranno ad interagire con diverse proteine bersaglio mediando la cosiddetta cascata del segnale attraverso diversi pathway di segnalazione, come ad esempio PI3K/akt, IP3 e MAPK, i quali promuovono la sopravvivenza cellulare, la proliferazione e la chemiotassi.

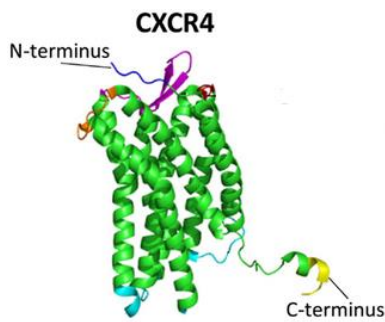


Figura 1. *Struttura del recettore CXCR4.*

Anche CXCR7 è un GPCR; in particolare è stato recentemente dimostrato che CXCR4 e CXCR7 possono formare omodimeri od eterodimeri e, nel caso di eterodimeri CXCR4/CXCR7, quest'ultimo provoca un cambiamento conformazionale di CXCR4 complessata alla proteina G arrestando la segnalazione. Inoltre, nel caso di interazione CXCL12/CXCR7, si può avere l'attivazione del pathway della β -arrestina, noto regolatore negativo per le proteine G, attraverso la chinasi GRK, con successiva internalizzazione del recettore CXCR4; infatti CXCR4 viene internalizzato e successivamente degradato soltanto dopo il legame con CXCL12, al contrario CXCR7 viene continuamente internalizzato, indipendentemente dall'interazione con il ligando, ma non è degradato. Si è visto anche che, quando CXCL12 lega CXCR7 monomericamente, non si ha l'aumento di concentrazione del Ca^{2+} intracellulare e l'attivazione della β -arrestina conduce allo scavenging di CXCL12; in aggiunta, nelle cellule tumorali, CXCR7 può anche attivare il pathway PLC/MAPK e ERK 1/2 con conseguente aumento della sopravvivenza cellulare. Risulta quindi evidente l'importanza di una

caratterizzazione approfondita dell'interazione di CXCL12 con i propri recettori, soprattutto per quel che riguarda il loro coinvolgimento nei processi patologici.

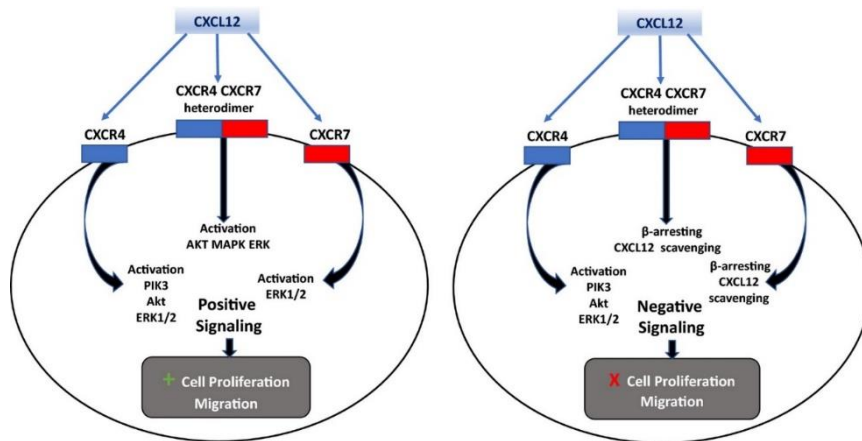


Figura 2. Asse

CXCL12/CXCR4/CXCR7-ACKR3.

1.4. Le isoforme di CXCL12

Come detto sopra, dal mRNA di CXCL12 derivano sette isoforme risultanti da eventi di splicing alternativo: α , β , γ , δ , ϵ , θ e l'isoforma 7, quest'ultima è stata esclusivamente predetta.

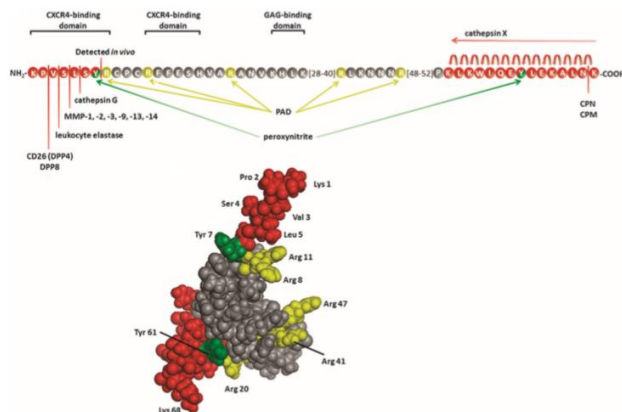


Figura 3. Modifiche post-traduzionali (sopra) e rappresentazione globale dell'isoforma- α (sotto).

Le isoforme presentano un pattern di espressione abbastanza specifico, in particolare:

- α : è l'isoforma maggiormente caratterizzata, a livello ematico viene degradata proteoliticamente, ed è stata trovata altamente espressa in vari organi quali midollo osseo, fegato, pancreas, polmoni, milza, cuore, linfonodi e timo, e recentemente rinvenuta a livello della pelle, dell'intestino e dei neuroni. In diverse forme di cancro si è visto che una sua bassa espressione si traduce in una minore possibilità di formazione di metastasi.
- β : diversamente da α , si trova maggiormente espressa a livello dei tessuti fetali (α è presente nei tessuti adulti). β ed α presentano un altissimo grado di similarità ma la presenza di cinque residui aggiuntivi in β al C-terminale la rendono più affine all'eparansolfato (HS) e ciò comporta una maggior protezione verso l'inattivazione enzimatica da parte di carbossipeptidasi N presenti nel sangue. È stata pertanto vista essere espressa maggiormente a livello degli organi più vascolarizzati; esperimenti di Endothelial Tube Formation hanno infatti dimostrato la sua capacità di promuovere l'angiogenesi. Come per α , bassi livelli di β inducono una minore sopravvivenza di metastasi libere.

- γ : il C-terminale più lungo rispetto alle isoforme α e β , con un motivo aminoacidico specifico, la rende ancora più affine ai GAG con una conseguente maggiore resistenza all'inattivazione proteolitica; una volta secreta, infatti, lega subito e con alta affinità il recettore sulla superficie cellulare e, per via della grande stabilità di tale legame, si è visto che possiede un effetto a lungo termine maggiore rispetto alle altre due isoforme (costante di dissociazione minore rispetto alle altre). Come per β , sono stati eseguiti saggi di Endothelial Tube Formation ed è stato dimostrato che anche γ promuove e guida l'angiogenesi. Per quanto riguarda invece l'attività chemiotattica, i dati ottenuti *in vitro* ed *in vivo* sono risultati discordanti, infatti nel primo caso stimola molto debolmente la chemiotassi, al contrario, in vivo, è risultata essere l'isoforma con funzionalità di chemiotattica maggiore; per cui è evidente l'importanza di ulteriori studi di approfondimento sulle sue funzioni.
- δ , ϵ , θ ed iso7: escludendo iso7, queste isoforme presentano pattern di espressione simili alle isoforme sopra descritte ma le loro funzioni non sono state ancora determinate. Per quanto riguarda iso7, ad oggi soltanto predetta, non è stato ancora definito un pattern di espressione, tantomeno sono state definite le sue funzioni mediante esperimenti *in vitro* o *in vivo*, per cui non si conosce tuttora il suo possibile

coinvolgimento con i vari processi patologici di cui invece le altre isoforme sono partecipi. Per questo motivo risulterebbe molto interessante una caratterizzazione approfondita di tale isoforma, principalmente per quel che concerne i meccanismi di interazione con il recettore, il pattern di espressione nei vari tessuti adulti e/o fetali e la sua potenziale implicazione in diversi processi patologici: l'isoforma 7 possiede un C-terminale completamente diverso rispetto alle altre isoforme, per cui sarebbe interessante effettuare uno studio approfondito per quel che riguarda le sue caratteristiche strutturali e come queste influenzano la sua attività in processi *in vivo*.

1.5. Patologie correlate all'asse CXCL12/CXCR4/ACKR3

Nell'ambito delle implicazioni patologiche risultanti dall'interazione di CXCL12 con i propri recettori, si è visto che il gradiente di CXCL12 può facilitare la migrazione delle cellule tumorali dalla sede primaria del tumore, momento chiave del processo metastatico.

È stato recentemente dimostrato che l'asse CXCL12/CXCR4/CXCR7-ACKR3 è associato con lo sviluppo di diversi tipi di cancro: è presente una up-regolazione della produzione di CXCL12 in cellule tumorali, mediata da HIF-1, e l'attività sinergica di CXCL12 con VEGF (vascular endothelial growth factor) promuove l'angiogenesi nei tumori stessi.

Si è visto, in una rara forma di linfoma cutaneo a cellule T (sindrome di Sézary), che vi è un anomalo reclutamento di cellule T CD4+ maligne, guidato proprio dall'interazione di CXCL12 con CXCR4, e che quest'ultimo è ampiamente espresso a livello delle cellule T CD4+ dei pazienti con tale sindrome; in tali pazienti infatti vi è una bassa attività plasmatica della proteasi CD26 che si traduce in una attività prolungata di CXCL12, il quale non viene inattivato proteoliticamente, causando la migrazione delle cellule T CXCR4+ verso l'epitelio. Inoltre, l'inibizione di CD26 aumenta la metastatizzazione di cellule tumorali nei casi di cancro alla prostata sostenendo ulteriormente che CD26 ha importanti funzioni immunomodulanti nel cancro che possono essere spiegate, almeno in parte, dalla sua attività su CXCL12.

Anche gli effetti di ACKR3 sono consistenti nell'ambito della crescita dei tumori e nei processi metastatici, infatti l'attivazione di ACKR3 mediata da CXCL12 risulta in un incremento nella espressione di fattori angiogenici (VEGF), con conseguente crescita del tumore, e in una riduzione dei processi apoptotici con maggiore sopravvivenza delle metastasi: è stata dimostrata una riduzione nelle dimensioni dei tumori in modelli animali (xenotrapianto) quando si induceva l'inattivazione di ACKR3 mediante silenziamento genico con siRNA.

L'asse CXCL12/CXCR4/ACKR3 è stato visto essere coinvolto anche nelle infezioni virali: CXCR4 è un co-recettore per HIV-1, il quale internalizza nelle cellule mediante interazione delle proteine dell'envelope (gp120) con CD4 sulle cellule T; CXCL12 si comporta quindi da competitore naturale di gp120 per il legame con il recettore, bloccando l'attacco e l'internalizzazione del virus.

Sempre nell'ambito delle infezioni virali si è visto che HHV-8 possiede un gene chemokine-like che codifica per vMIP-II, un potente antagonista di CXCR4 e che si ha una up-regolazione di CXCR7 indotta dai virus che inducono la formazione di tumori (HTLV-1, HHV-8, HPV e EBV). Date queste informazioni risulta fondamentale approfondire il coinvolgimento dell'asse CXCL12/CXCR4/ACKR3 nelle infezioni virali, soprattutto per quel che riguarda un possibile approccio terapeutico.

Come precisato sopra, CXCL12 è di fondamentale importanza nell'organogenesi, in particolare nello sviluppo del sistema nervoso (SN), di conseguenza mostra un ruolo chiave anche nei processi patologici che interessano proprio il SN; in particolare si è visto che: in modelli animali, la deficienza sia di CXCL12 che di CXCR4 conduce ad uno sviluppo cerebellare anormale e che CXCR7/ACKR3 è fondamentale per il mantenimento del gradiente di CXCL12 lungo la barriera ematoencefalica.

Inoltre, la chemioattrazione delle cellule della microglia mediata da CXCL12 nelle malattie neurodegenerative ha diversi risultati: nella SLA (sclerosi laterale amiotrofica), la microglia produce citochine pro infiammatorie e ROS e si è visto che la somministrazione di inibitori di CXCR4 conduce all'abbassamento nella concentrazione di marker infiammatori; nell'Alzheimer si hanno livelli plasmatici di CXCL12 ridotti con conseguenti problemi nei meccanismi omeostatici, reputati i responsabili dell'inizio della malattia ed è stato dimostrato che iniezioni intra cerebroventricolari di CXCL12 diminuiscono la quantità di aggregati β -amiloidi.

CXCL12/CXCR4 è coinvolto anche nelle malattie dell'intestino: colite ulcerosa e Morbo di Crohn sono patologie caratterizzate dall'infiltrazione massiccia di leucociti attivati a livello della mucosa intestinale e CXCL12 è over espressa nella mucosa infiammata, quindi l'aumentato afflusso di cellule T CXCR4⁺ aumenta l'infiammazione della parete intestinale; in particolare si è visto che la trascrizione del mRNA CXCL12- β aumenta nel Morbo di Crohn.

L'asse è implicato in numerosi altri processi patologici, come malattie reumatiche, sistemiche e altre, tutte comunque caratterizzate da una risposta infiammatoria autoimmune che determina l'infiltrazione massiccia di leucociti nei tessuti interessati.

1.6. Strategie terapeutiche che interessano l'asse

CXCL12/CXCR4/ACKR3

In generale l'asse CXCL12/CXCR4/CXCR7 è visto come un buon target per lo sviluppo di terapie contro il cancro. I processi metastatici in varie tipologie di tumore sono stati collegati con l'espressione di CXCR4 sulla superficie delle cellule tumorali, infatti mediante up-regolazione di CXCR4, le cellule tumorali possono metastatizzare agli organi che esprimono fortemente CXCL12 (polmoni, fegato, midollo osseo e linfonodi). Inoltre, l'homing di cellule CXCR4⁺ a livello del midollo osseo garantisce loro un microambiente protettivo e CXCL12 può promuovere l'adesione delle cellule tumorali: bloccando l'interazione CXCL12/CXCR4 si è visto che le cellule tumorali risultano essere più suscettibili (non più nel microambiente sopracitato) all'azione di chemioterapici. Anche altre terapie antitumorali hanno come scopo il blocco dell'azione angiogenica di CXCL12, solitamente mediante l'utilizzo di piccoli peptidi inibitori: è stato dimostrato che l'aptamero L-ribonucleico (RNA-like) NOX-A12 lega in modo specifico CXCL12 impedendo il suo legame con i GAG e andando quindi ad alterarne il gradiente, rendendolo conseguentemente più vulnerabile all'azione delle proteasi. Anche il trattamento del tumore mediante silenziamento genico di CXCR4 si è dimostrato promettente, infatti si è visto, in modello animale (topo), che il siRNA CXCR4 riduce la possibilità di avvio di un eventuale

processo metastatico. Quindi l'utilizzo di molecole dirette specificatamente verso cellule che esprimono CXCR4 (CXCL12-like o antagonisti, come AMD3100), comprese le tumorali, nelle quali il più delle volte risulta over espresso, rappresenta una buona strategia terapeutica per il trattamento dei tumori. Naturalmente devono essere effettuati altri studi, soprattutto per quanto riguarda il diverso coinvolgimento dell'asse CXCL12/CXCR4/CXCR7 nelle varie tipologie di tumore. Avendo appurato il ruolo fondamentale nei processi infiammatori, tanto quanto nella regolazione dei processi omeostatici, è coerente la collocazione di CXCL12 tra le chemochine infiammatorie ed inducibili.

1.7. Produzione di proteine ricombinanti e scelta del sistema ospite

Una proteina ricombinante è una particolare proteina che non viene espressa dall'organismo che la produce normalmente bensì viene fatta esprimere da un altro organismo detto ospite. A questo scopo sono utilizzate delle molecole di DNA circolare, dette vettori, all'interno delle quali vengono inseriti dei frammenti di DNA specifici, codificanti per particolari proteine di interesse, al fine di ottenere una molecola di DNA ricombinante. Alcuni batteri possiedono naturalmente delle molecole di DNA circolare, i plasmidi, capaci di duplicare in modo autonomo rispetto al DNA cromosomico, utilizzando gli stessi sistemi di biosintesi. I plasmidi, ingegnerizzati in modo specifico,

possono essere utilizzati come vettori all'interno dei quali inserire la sequenza di uno specifico gene codificante la proteina di interesse. È quindi necessario conoscere la sequenza nucleotidica del gene e bisogna manipolare il vettore in modo da renderlo idoneo all'acquisizione dell'inserito, ottenendo in tal modo la molecola di DNA ricombinante. La molecola di DNA ricombinante viene poi acquisita da un sistema ospite (sistema eterologo, generalmente batteri), in grado di riprodursi velocemente e quindi di produrre una grande quantità della proteina di interesse.

Dopo questa premessa sono evidenti le potenzialità che risiedono nelle tecnologie ricombinanti; possono essere infatti utilizzate per svariati scopi, principalmente: produzione di proteine di interesse terapeutico o commerciale (enzimi). Sono state quindi messe a punto delle efficienti strategie allo scopo di soddisfare la sempre più crescente richiesta di mercato, attraverso la produzione di grandi quantità di proteine ricombinanti, di qualità (con un'elevata purezza) e ad un costo estremamente ridotto. La quantità e la qualità del prodotto finito è fortemente vincolata dalla scelta sia dell'ospite che del vettore.

I sistemi eterologhi utilizzati per esprimere il gene di interesse sono molteplici, i più diffusi sono:

- sistemi procarioti: batteri (*Escherichia coli*)

- sistemi eucarioti: Lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), funghi (come *Aspergillus niger*), cellule di insetto (soprattutto per sistemi virali, *Baculovirus*), cellule vegetali e cellule animali

I sistemi procarioti presentano diversi vantaggi rispetto agli eucarioti, estremamente fragili, sono infatti molto più economici e manipolabili con facilità, consentendo una produzione veloce ed una resa molto alta. Vi sono poi numerosi vettori di espressione molto efficaci (presenza di promotori molto forti, anche inducibili) che garantiscono l'espressione della proteina target. Naturalmente i sistemi procarioti possiedono anche degli svantaggi, infatti, nel caso ad esempio di produzione di proteine eucariote, non sono in grado di effettuare modifiche post-traduzionali, come la fosforilazione, la glicosilazione e l'acetilazione, necessarie alla proteina per l'assunzione della forma matura e funzionale. Nello specifico le modifiche post-traduzionali garantiscono il corretto ripiegamento (folding) proteico e quindi conferiscono alla proteina la funzionalità e la capacità di interagire con determinate biomolecole, come i recettori. Per questo motivo è necessario scegliere il sistema di espressione più adatto. Un altro svantaggio è invece legato alla sovra-espressione; con elevatissime quantità di proteina si possono infatti formare degli aggregati (detti corpi di inclusione) che possono rendere molto complicata la procedura di purificazione. In ultimo bisogna prestare attenzione anche alla presenza di enzimi Proteasi che potrebbero portare alla

degradazione della proteina in fase di purificazione. L'inserimento della molecola di DNA ricombinante nel batterio avviene mediante Trasformazione, cioè acquisizione di materiale genetico dall'ambiente esterno. La Trasformazione può essere indotta artificialmente sia attraverso uno specifico trattamento delle cellule che le rende "competenti" (cioè capaci di acquisire materiale genetico dall'esterno) sia mediante l'utilizzo di un campo elettrico che favorisce la penetrazione del DNA nelle cellule attraverso la formazione, indotta, di pori a livello della membrana cellulare (elettroporazione).

1.8. Espressione in Escherichia coli

L'espressione in *Escherichia coli* è la più utilizzata, questo microrganismo è stato caratterizzato a fondo ed è quello di più semplice utilizzo per cui può essere identificato come prototipo di espressione genica in sistemi eterologhi: presenta una struttura semplice, cresce rapidamente in coltura necessitando di brevi periodi di incubazione e permettendo quindi anche una buona resa nella produzione di proteine ricombinanti, ed il background genetico è stato studiato a fondo. Negli ultimi decenni tale sistema di espressione è stato

continuamente migliorato permettendo la produzione di proteine ricombinanti non solo per studi di ricerca ma anche a scopi industriali.

La tossicità della proteina ricombinante può essere un problema serio anche in un sistema tanto studiato: la tossicità ci può essere nel momento in cui la proteina ricombinante possiede un'attività non necessaria o addirittura dannosa per il microorganismo, il suo aumento di concentrazione nel batterio potrebbe infatti interferire con la normale proliferazione e con i meccanismi omeostatici del microorganismo stesso. In coltura questo fenomeno porta ad un rallentamento del tasso di crescita con conseguente morte.

La formazione di ponti disolfuro è fondamentale per molte proteine ricombinanti in quanto consentono a quest'ultima il corretto ripiegamento che conduce all'assunzione della corretta struttura tridimensionale, fondamentale per l'attività; in questo contesto, la formazione di legami disolfuro erronei può portare ad uno scorretto ripiegamento della proteina e a sua aggregazione nei corpi di inclusione. Questa situazione ha un impatto importante nella produzione di proteine ricombinanti con ponti disolfuro, una soluzione potrebbe essere quella di dirigere la proteina, mediante partner di fusione che si comportano da carrier, verso il periplasma batterico, ambiente con potenziale redox ossidante che permette la formazione di ponti disolfuro, o in alternativa utilizzare ceppi di *E. coli* ingegnerizzati che possiedono citoplasma con potenziale redox ossidante (esempi Origami-Novagen, Shuffle-NEB,

BL21(DE3) lacY-Tuner™, Novagen, Rosetta-gami™ B-Novagen, SHuffle T7 Express BL21(DE3)-NEB).

1.9. Sistema di espressione

Un vettore di espressione ideale per la produzione di proteine ricombinanti all'interno di procarioti deve contenere determinati elementi genetici.

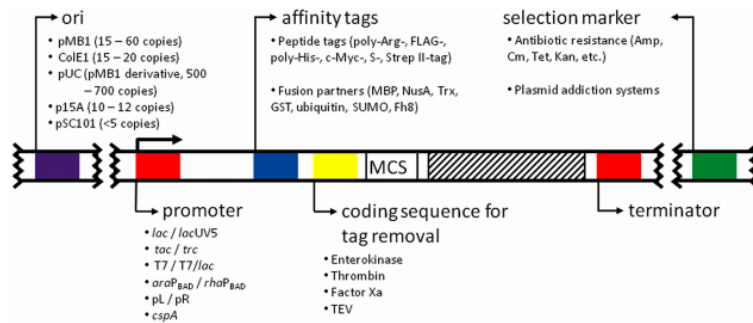


Figura 4. Struttura di base di un vettore di espressione.

Le componenti essenziali del vettore, che ottimizzano la produzione di proteine nei batteri, sono:

- Origine di replicazione (ori), sequenza che dà il via alla replicazione del DNA; in *E. coli* ha una lunghezza di 245bp e contiene tre sequenze uguali di 13 nucleotidi in tandem, con quattro siti di legame per la proteina iniziatrice DnaA (promuove la denaturazione del DNA a livello dell'ori).

- Promotore, regione che lega la RNA polimerasi e che dà inizio alla trascrizione del mRNA, posizionata a monte della sequenza genica codificante per la proteina di interesse. In genere il promotore, nei sistemi di espressione, è inducibile, quindi la trascrizione inizia una volta aggiunto uno specifico induttore, infatti fino a quel momento viene mantenuto un livello di espressione basale basso tale che si riesca a controllare l'espressione stessa; tra i promotori inducibili maggiormente utilizzati vi sono: il promotore dell'operone Lattosio (pLac), il promotore dell'operone Arabinosio (pBAD) o promotori fagici molto forti (promotore per la RNA polimerasi fagica T7).
- cDNA, cioè la sequenza codificante la proteina priva di introni (caratteristici del DNA genomico), sintetizzata a partire dalla sequenza del mRNA maturo e quindi complementare ad esso.
- Sequenza di Shine-Dalgarno, sequenza che segna l'inizio della traduzione (cioè la regione del mRNA procariotico alla quale si lega il ribosoma per dare inizio alla traduzione) a cui si lega il 3' del rRNA 16S batterico. Generalmente il codone di inizio è AUG ma alcuni organismi possono utilizzare anche dei codoni alternativi (GUG, UUG, CUG).
- Codoni sinonimi, diversi codoni possono codificare per il medesimo aminoacido e l'inserimento dell'aminoacido dipende dalla presenza

nella cellula del tRNA specifico per ciascun codone, per cui vengono utilizzati per migliorare la resa di espressione ed evitare la terminazione prematura della traduzione.

- Terminatore di trascrizione, posto a valle della sequenza genica codificante la proteina di interesse, che determina il blocco della trascrizione.
- Marker di selezione, di solito un gene codificante la resistenza verso uno specifico antibiotico (i più usati sono quelli per l'Ampicillina, il Cloramfenicolo e la Tetraciclina), che permette di discriminare i cloni che hanno acquisito il DNA ricombinante dagli altri.
- Tag di affinità, può essere un tag peptidico (His-tag) o un partner di fusione proteici (MBP proteina legante il maltosio, GST glutatione-S-trasferasi, Trx tioredossina, ecc.), utilizzato in fase di purificazione della proteina ricombinante, in particolare attraverso procedure cromatografiche; i partner di fusione, come ad esempio la proteina legante il maltosio (MBP), permettono, oltre alla purificazione del prodotto di fusione, di aumentare la solubilità della proteina ricombinante nel sistema ospite, consentendo l'utilizzo di protocolli di purificazione semplici, alternativi quindi a quelli di purificazione dai corpi di inclusione, sopra citati.

- Sito di taglio per una Proteasi, nella fase finale è necessario rimuovere il tag di affinità o il partner di fusione e ciò è reso possibile grazie all'inserimento di siti di taglio per Proteasi nella sequenza linker tra tag e proteina.

2. Scopo della tesi

La produzione di proteine ricombinanti in organismi procarioti è un campo in continuo sviluppo, soggetto a numerosi tentativi di miglioramento. A partire da studi di laboratorio, il processo deve essere esteso su scala industriale per ottenere grandi quantità di una proteina di interesse.

La chemochina CXCL12 è oggetto di studio, soprattutto in campo medico e farmaceutico, per via delle sue importanti funzioni in vari processi biologici e per le sue implicazioni in diverse patologie, di conseguenza per la sua produzione risulta essere interessante approcciare un protocollo di espressione e purificazione semplice e poco costoso, da implementare poi per una ipotetica applicazione industriale.

Una delle variabili che influenza l'esito della produzione, è la scelta della combinazione vettore-ospite adatta: in base a questa e alle condizioni di crescita utilizzate, la quantità di proteina espressa può variare in modo considerevole. Molto utilizzato come ospite per la produzione di proteine ricombinanti è *Escherichia coli*.

Lo scopo del seguente lavoro è stata la messa a punto di un protocollo di produzione eterologa delle sette isoforme di CXCL12 in *E. coli*; il progetto di tesi è stato svolto nell'ambito di una collaborazione tra il New York – Marche

Structural Biology Center (NY-MaSBiC) ed il Prof. Francesco Piva, con l'intento di effettuare studi di funzionali.

Il seguente progetto prevede una prima fase di clonaggio delle isoforme nei vettori di espressione da utilizzare in *E. coli*; in questo contesto sono stati utilizzati due vettori di clonaggio, il secondo, in particolare, permette l'espressione della proteina ricombinante come proteina di fusione con partner solubile, localizzandola a livello citoplasmatico, fornendo una alternativa alla procedura di purificazione dai corpi di inclusione riportata in letteratura.

Per l'espressione in *E. coli* sono stati presi in considerazione tre ceppi diversi: *BL21 (DE3) pLysS*, *C41 (DE3)* e *Rosetta (DE3)*, al fine di valutare l'efficienza dell'espressione.

In questo lavoro vengono presentati i protocolli di produzione per l'isoforma α e l'isoforma 7, non ancora caratterizzata, che hanno come scopo ultimo l'ottenimento di un buon rendimento in termini di quantità e di purezza del prodotto.

3. *Materiali e Metodi*

3.1. *Ceppi batterici*

I ceppi batterici di *Escherichia coli* utilizzati nel lavoro presentato sono:

- 1) ***BL21 (DE3) pLysS***, ceppo di *E. coli* che permette l'espressione inducibile di proteine ricombinanti: il cromosoma batterico porta integrato il fago λ DE3 che possiede la sequenza codificante per la RNA polimerasi del fago T7 sotto controllo del promotore *lac*; questo sistema permette la produzione della RNA polimerasi T7 per mezzo dell'induzione da parte del lattosio o di un suo analogo (IPTG). Il vettore di espressione, con cui il ceppo viene trasformato, deve essere un "pET-based expression vector", deve cioè possedere come promotore per la sequenza genica codificante la proteina ricombinante il promotore del fago T7. La RNA polimerasi T7, essendo estremamente specifica nel riconoscimento di tale promotore, va a trascrivere preferenzialmente il gene a valle di tale promotore, vale a dire il gene codificante per la proteina di interesse che viene espressa ad alti livelli. Inoltre, per evitare l'espressione costitutiva del gene di interesse, il ceppo è stato dotato del plasmide *pLys*: questo plasmide codifica per il Lisozima T7, naturale inibitore della RNA polimerasi T7 che riduce la sua attività basale permettendo quindi l'espressione di

proteine ricombinanti, che potrebbero risultare tossiche ad elevate concentrazioni, soltanto tramite l'induzione con lattosio od analoghi.

- **Genoma:** $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda$ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB^+*]_{K-12}(λ^S) pLysS [*T7p20 ori_{p15A}*] (Cm^R)

2) **C41 (DE3)**, ceppo di *E. coli* derivato direttamente da BL21 (DE3): fenotipo con mutazioni particolare che conferiscono una migliore tolleranza nei confronti di alte concentrazioni di proteine ricombinanti, potenzialmente tossiche. Non possiede il *pLys* ma il promotore è *PlacWeak*, promotore più debole rispetto a quello posseduto da *BL21 (DE3)*, che non è particolarmente attivo costitutivamente.

- **Genoma:** $F^- ompT gal dcm hsdS_B (r_B^- m_B^-) (DE3)$

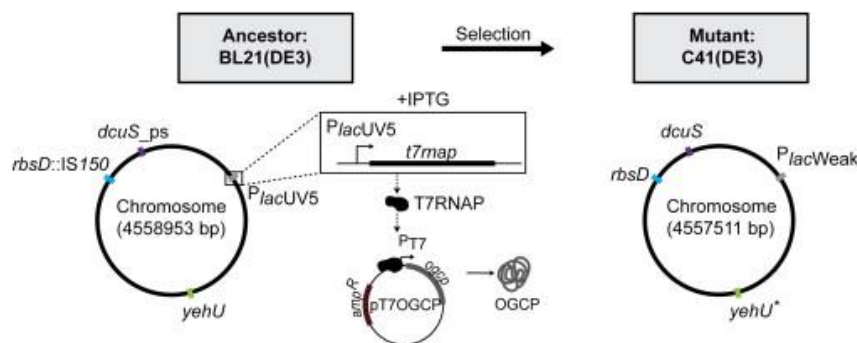


Figura 1. Dettaglio selezione del ceppo mutante *E. coli* C41 (DE3) da BL21 (DE3).

- 3) **Rosetta (DE3) pLysS**, ceppo di *E. coli* con integrato il profago DE3 λ , stesse caratteristiche di *BL21 (DE3)*. Possiede un plasmide *pLys* particolare, *pLysSRARE* con i geni per tRNA argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL, metT, thrT, tyrU, e thrU. Porta inoltre anche codoni rari per *E. coli* come AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, e GGA.
- **Genoma:** $F^- ompT gal dcm lon? hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB^+]_{K-12}(\lambda^S) pLysS RARE [T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori_{p15A}] (Cm^R)$

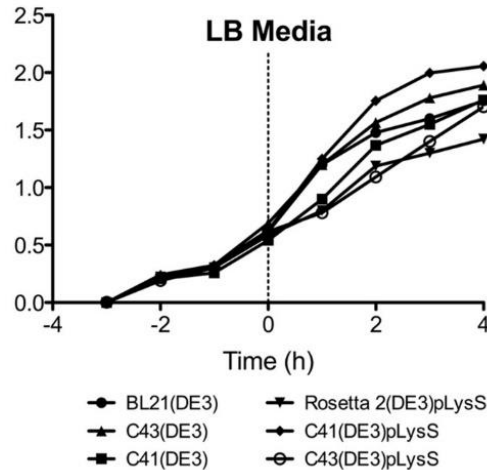


Figura 2. Dettaglio delle differenti curve di crescita per i ceppi batterici DE3.

3.2. Vettori di espressione: *pMCSG7 – pMCSG9*

I vettori di espressione, utilizzati nel seguente lavoro, sono stati progettati per permettere l'efficace clonaggio e purificazione di proteine ricombinanti: sono stati scelti quelli della serie pMCSG, originariamente prodotti dal *Midwest Center for Structural Genomics (MCSG)*, modificati all'*NYCOMPS* con l'aggiunta di 4 istidine per un totale di 10x(His) all'estremità N-terminale.

Questi possiedono la sequenza corrispondente al sito di taglio per la proteasi TEV (Tobacco Etch Virus) a monte di un sito di restrizione per l'enzima *SspI*, utilizzato per la fase di clonaggio LIC.

Il vettore base della linea pMCSG, pMCSG-7, possiede quindi un tag di 10 istidine al N-terminale seguito dal sito di riconoscimento per una proteasi; il derivato di questo vettore (in uso nel lavoro presente, pMCSG-9) possiede in più la sequenza codificante per la MBP (Maltose Binding Protein, cioè la proteina legante il maltosio).

L'espressione è guidata dalla RNA polimerasi T7, sotto controllo del Promotore *lac*, in determinati ceppi batterici ospiti. Per introdurre il gene codificante per la proteina voluta nel vettore, vengono aggiunte delle estensioni compatibili con il sito LIC attraverso l'utilizzo di primers specifici durante una reazione di amplificazione PCR. Per mezzo di trattamenti appropriati, il prodotto di PCR, che quindi ha assunto le

adeguate estensioni LIC, può essere introdotto all'interno di uno di questi vettori semplicemente seguendo un protocollo LIC standard.

pMCSG-7

Descrizione: vettore di espressione batterico con promotore T7, 10xHis tag N-terminale e sito di taglio per proteasi TEV; AmpR; sito LIC (Ligation Independent Cloning).

Tipologia: vettore plasmidico batterico; dsDNA. Derivato da pET21; specifico per HTPP.

Tipologia	Nome	Descrizione
MCS	LIC	Ligation-Independent Cloning (LIC) region
Tag	N-His	N-terminal His tag
Bacterial origin	ori	ColE1 pBR322-type bacterial origin of replication
Selectable marker	AmpR	Ampicillin resistance gene
Protease Cleavage site	TEV	TEV cleavage site
Ribosome binding site	RBS	Ribosome binding site
Promoter	T7	T7 promoter
Termination sequence	T7 term	T7 terminator sequence

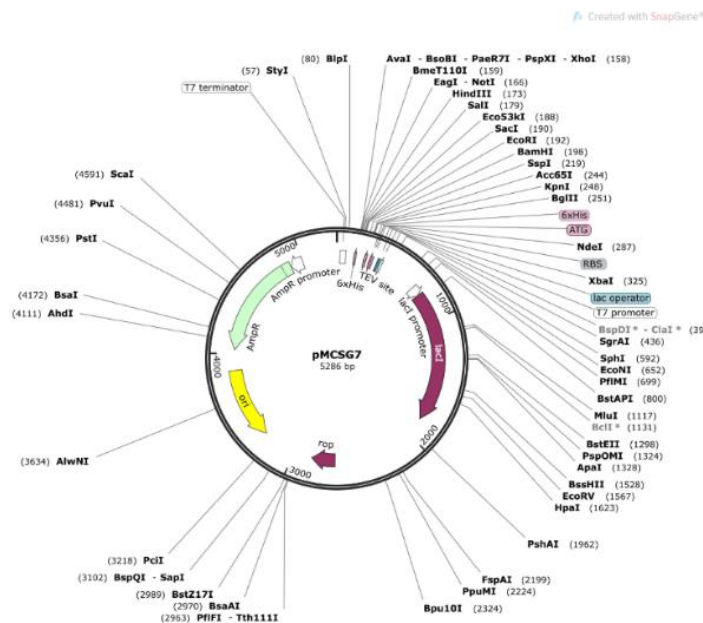


Figura 3. Mappa di sequenza pMCSG7.

pMCSG9

Descrizione: vettore provvisto di “solubility enhancer” tag MBP (Maltose Binding Protein), per l’inserto; promotore T7, 10xHis tag N-terminale, sito di riconoscimento per proteasi TEV; Amp^R; sito LIC (Ligation Independent Cloning).

Tipologia: vettore plasmidico batterico; dsDNA. Derivato direttamente da pMCSG7.

Tipologia	Nome	Descrizione
MCS	LIC	Ligation-Indipendet Cloning (LIC) region
Tag	N-His	N-terminal His tag
Bacterial origin	ori	ColE1 pBR322-type bacterial origin of replication

Selectable marker	AmpR	Ampicillin resistance gene
Protease Cleavage site	TEV	TEV cleavage site
Ribosome binding site	RBS	Ribosome binding site
Promoter	T7	T7 promoter
Termination sequence	T7 term	T7 terminator sequence
Tag	MBP	Maltose Binding Protein

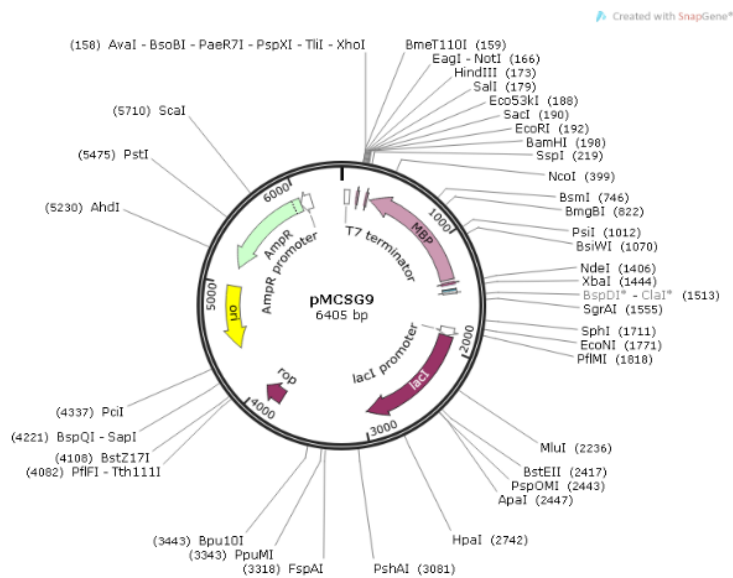


Figura 4. Mappa di sequenza pMCSG9.

Entrambi i vettori sono stati modificati mediante rimozione del sito di riconoscimento per la proteasi TEV e sua sostituzione con sito di riconoscimento per l'enzima **Enterochinasi (EK)**: come si può vedere dalle immagini sottostanti, il sito TEV, e quindi anche il corrispettivo per l'EK, si trova parzialmente sovrapposto alla regione LIC, la quale, per questo motivo, è stata ricostituita. Nella ricomposizione del sito LIC è stato modificato anche il sito di restrizione per l'enzima di restrizione *SspI*, nello specifico questo è

stato sostituito con il sito di restrizione per un'altra endonucleasi, *BseRI*, utilizzata per la linearizzazione del vettore stesso.

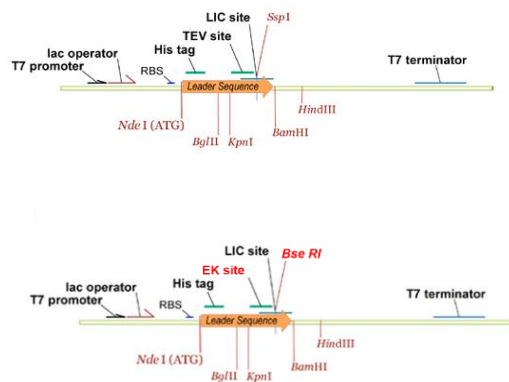


Figura 4. *pMCSG7*
modificato pMCSG7-EK

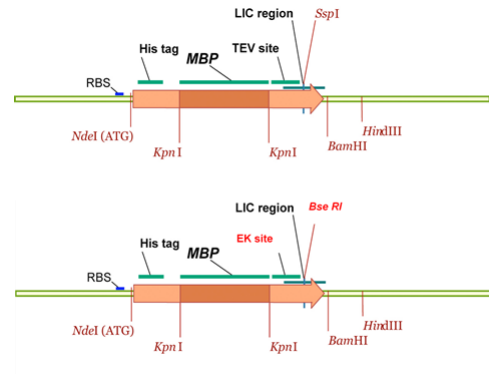


Figura 5. *pMCSG9*
modificato pMCSG9-EK

L'utilizzo della proteasi **Enterochinasi** permette la creazione di un prodotto proteico con il 100% di identità con la struttura nativa, essa infatti a differenza della proteasi TEV che lascia tre residui aminoacidici (sequenza SNA) dopo la reazione di taglio, crea delle estremità di taglio nette (**Fig. 6**).

Per affrontare la produzione delle citochine CXCL12 che richiedono l'N-terminale naturale per la loro funzione, i vettori pMCSG7 e 9 sono stati modificati introducendo il sito di taglio per l'enterochinasi al posto della TEV che ha richiesto anche la modifica del sito per la linearizzazione *BseRI* al posto di *SspI*.

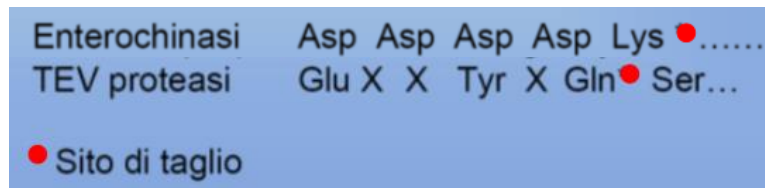


Figura 6. Confronto sito di taglio dell'Enterochinasi e della proteasi

TEV.

Enzima di restrizione: *BseRI*, sito di restrizione:

Name	Direction	Recognition Site	Restriction Site
BseRI	←	5'-CTCCTC-3' 3'-GAGGAG-5'	$N_8 \dots - 3'$ $N_{10}N_9N_8 \dots - 5'$

- **Restriction enzyme reaction conditions:** 37°C
- **Heat Denaturation (inattivazione):** *BseRI* può essere denaturato, e quindi inattivato, mediante riscaldamento a 72°C per 20 minuti.

La scelta dell'utilizzo di due vettori differenti, di cui uno provvisto del gene per MBP, risiede nel fatto che elevati livelli di espressione di proteine ricombinanti in *E. coli* molto spesso determinano la formazione di granuli citoplasmatici costituiti da aggregati insolubili della proteina stessa, i corpi di inclusione.

La procedura di purificazione di proteine ricombinanti dai corpi di inclusione prevede, operativamente, la loro solubilizzazione mediante uso di agenti caotropici (urea o cloruro di guanidinio, denaturanti) ed il re-folding in vitro della proteina ricombinante stessa, tuttavia questo approccio è molto lungo e

necessita di essere ottimizzato per ogni prodotto proteico; inoltre la resa finale di purificazione del prodotto dai corpi di inclusione può essere bassa, per cui si è deciso di bypassare questo procedimento permettendo l'espressione della proteina ricombinante come prodotto di fusione con la MBP, la quale aumenta la solubilità del prodotto.

La proteina legante il maltosio, o maltose binding protein (MBP) è una proteina periplasmatica codificata dal gene *mal E* di *E.coli*. Si tratta di un componente del sistema batterico di trasporto del maltosio ed è stato dimostrato che la fusione di una proteina ricombinante alla MBP determina un incremento della solubilità del prodotto chimerico durante la fase di iperespressione, evitandone l'aggregazione e dunque la formazione dei corpi d'inclusione.

3.3. Costruzione del plasmide ricombinante

L'amplificazione è stata condotta su 7 costrutti sintetici prodotti dalla GeneScript utilizzando i primer Forward e Reverse appositamente progettati per la successiva fase di clonaggio LIC.

Le sequenze nucleotidiche sono riportate nell'elenco sottostante insieme alle sequenze aminoacidiche:

Isoforma α

Nucleotide Sequence (270 nt):

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTTCGTGCTGGTCCCTCGTGCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGG**AAG**CCCG
TCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCT
CAAAATTCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTG
TGCATTGACCCGAAG**CTA**AAGTGGATTTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGTAA

Translation (89 aa):

MNAKVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNK

Isoforma β

Nucleotide Sequence (282 nt):

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTTCGTGCTGGTCCCTCGTGCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGG**AAG**CCCG
TCAGCCTGAGCTACAGATGCgCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCT
CAAAATTCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTG
TGCATTGACCCGAAGCTA**AAG**TGGATTTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGAGGTTCAAGATGT
GA

Translation (93 aa):

MNAKVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNKRFKM

Isoforma γ

Nucleotide Sequence (360 nt):

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTTCGTGCTGGTCCCTCGTGCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGG**AAG**CCCG
TCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCT
CAAAATTCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTA**GCC**CGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTG
TGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGGGGCGCAGAGAAG
AAAAAGTGGGGAAAAAAGAAAAAGATAGGAAAAAAGAAGCGACAGAAGAAGAGAAAGGCTGCCCAGAAAAG
GAAAAACTAG

Translation (119 aa):

MNAKVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNKGRRREEKVGKKEKIGKKRQKKRCAAQKRKN

Isoforma δ

Nucleotide Sequence (423 nt):

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGGAAGCCCG
TCAGCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCCTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCT
CAAAATCTCAACACTCCAACTGTGCCCTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAAACAGACAAGTG
TGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAACCTGATCAGCGCCG
CACCAGCCGGGAAGAGGGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCCTGCATCCCTCTCCTCCCAGGGCCTGCCCCAC
AGCTCGGGCCCTCTGTGAGATCCGTCTTTGGCCTCCTCCAGAATGGAGCTGGCCCTCTCCTGGGGATGTG
TAA

Translation (140 aa):

MNAKVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNNLISAAPAGKRVIAGARALHPSPPRACPTARALCEIRLWPPPEWSWPSPGDV

Derivate mediante metodi bioinformatici; riportate di seguito solo le sequenze
aminoacidiche:

Isoforma ϵ

MNAKVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQ
EYLEKALNNC

Isoforma θ

MNAKVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYL
EKALNKIWLYGNAETSR

Isoforma 7

Nucleotide Sequence (301 nt):

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGG**AAG**CCCGTCA
 GCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATTATTGTACTTGCCTTATTAGAGTGTCTTTCCA
 CGGAGCCACTCCTCTGACTCAGGGCTCCTGGGTTTTGTATTCTCTGAGCTGTGCAGGTGGGGGAGGGAGCCTG
 GCCCCATGGTCAGCCCTAGGGTGGAGAGCCACCAAGAGGGACGCTGGGGGTGCCAGGACCAGTCAACCTGGG
 CAAAGCCTAG

Translation (103 aa):

MNAKVVVVLVVLVLTALCLSDGKPVLSLYRCPCRFFESHYCTCLIRVSFHGATPLTQGSWVLYLSLSCAGGETGL
 REP~~G~~PMVSPRVESHQEGRLGVPGPVNLGKA

Eseguendo un Allineamento Multiplo (tool *ClustalOmega*) è possibile vedere come le sequenze aminoacidiche siano omologhe al N-terminale.

Figura 6.

Allineamento

multiplo

ClustalOmega.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

IS07	KPVLSYRCP	CRFFESHYCTCLIRVSFHGATPLT-----	QGSWVLY	41		
THETA	KPVLSYRCP	CRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE		60		
GAMMA	KPVLSYRCP	CRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE		60		
ALFA	KPVLSYRCP	CRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE		60		
BETA	KPVLSYRCP	CRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE		60		
DELTA	KPVLSYRCP	CRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE		60		
EPSILON	KPVLSYRCP	CRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE		60		
	*****	. . . :	**	: . * :		
IS07	SLSCAGGET	-----GLREP	GPMVSPRVESHQEGRL	-----GVP	GPVNLG	80
THETA	YLEKALNKI	WLYGNAETSR				79
GAMMA	YLEKALNKG	RREEKVGKKEKIGKKRQKKRKAQKR-KN				98
ALFA	YLEKALNKR	FKM				72
BETA	YLEKALNK					68
DELTA	YLEKALN	LISAAPAGKRVIAGARALHPSPPRACPTARALCEIRLWPPPEW				119
EPSILON	YLEKALN	NNC				69
	*. * . :					
IS07	KA	82				
THETA	--	79				
GAMMA	--	98				
ALFA	--	72				
BETA	--	68				
DELTA	--	119				
EPSILON	--	69				

Nella produzione dei trascritti genici, la sequenza relativa al peptide leader, corrispondente al segnale di secrezione per la proteina matura, collocata al N-terminale, è stata eliminata in quanto l'espressione di tali proteine viene

eseguita in sistema procariotico (*E. coli*) non in grado di riconoscere tale sequenza come segnale di secrezione: come si può osservare sopra, viene evidenziata la tripletta **AAG**, corrispondente all'aminoacido **K**, Lisina, che rappresenta il primo aminoacido tradotto una volta esclusa la sequenza a monte codificante per il segnale di secrezione.

Il terminale aminico è stato modificato come segue:

MHHHHHHHHHSSGVDLGTDLYDDDDK**KPV**SLSYRCPCRFFESH-

Evidenziato in rosso vi è il sito di taglio per l'Enterochinasi.

Sono stati quindi progettati i primers per la successiva fase di clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning), essi presenteranno zone di complementarità sia con il gene da amplificare che con il sito LIC caratteristico del vettore.

I vettori utilizzati sono stati il **pMCSG7-EK modificato** e il **pMCSG9-EK modificato** (riportati al **Par. 2.2.**): è stata per entrambi utilizzata la medesima coppia di primer in quanto il pMCSG9 deriva direttamente dal 7 e possiede la stessa porzione LIC.

Viene riportata la coppia di primer:

- **Forward LIC**: GACGACGACAAGAAGCCTGTCAGCCTGAGCTACAGATGC, utilizzato per tutte e 7 le isoforme in quanto sono perfettamente omologhe all'estremità N-terminale.

- **Reverse LIC**: specifico per ogni isoforma,

1) Rev **α**: GAGGAGAAGCCCGGTTACTTGTTTAAAGCTTTCTCCAGGTAC

2) Rev **β**: GAGGAGAAGCCCGGTTACATCTTGAACCTCTTGTTTAAAGC

3) Rev **γ**: GAGGAGAAGCCCGGTTAGTTTTTTCCTTTTCTGGGCAGCC

4) Rev **δ**: GAGGAGAAGCCCGGTTACACATCCCCAGGAGAGGGC

5) Rev **ε**: GAGGAGAAGCCCGGTTAGCAATTGTTTAAAGCTTTCTCCAGG

6) Rev **θ**: GAGGAGAAGCCCGGTTAGCGTGATGTCTCAGCATTGC

7) Rev **Iso7**: GAGGAGAAGCCCGGTTAGGCTTTGCCAGGTTGACTG

Con l'utilizzo di questi primer l'amplificazione è fatta partire da KPV-.

3.4. Terreni di coltura

I terreni preparati durante il lavoro sono dedicati alla crescita di ceppi di *E. coli* molto comuni, utilizzati per ottenere DNA ricombinante. Questi ceppi non hanno richieste nutrizionali particolari e l'aggiunta di antibiotici è necessaria per la selezione.

Terreni in uso:

LB (Luria-Bertani) - Triptone (1%), estratto di lievito (0.5%) e NaCl (1%);
pH 7,5.

SOC (Super Optimal broth for Catabolyte repression) – Triptone (2%), estratto di lievito (0.5%), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glucosio.

3.5. Amplificazione dei geni sintetici

Mix reazione di PCR

HF Reaction Buffer (2x)

dNTPs (2.5 mM)

Primers F/R (5 µM)

DNA

ACCURA (2U/µL)

H₂O

High-Fidelity Reaction Buffer (2x): buffer, contenente MgCl₂, ottimizzato per la reazione di polimerizzazione con polimerasi HF (high-fidelity) come la polimerasi termostabile *Accura*TM *High-Fidelity Polymerase*.

- 94°C per 1 minuto (denaturazione)
- 94°C per 15 secondi
- 60°C per 15 secondi (annealing con primers)
- 72°C per 1 minuto
- 72°C per 10 minuti (estensione)

Ciclo di PCR ripetuto per 30 volte.

3.6. Elettroforesi

L'esame elettroforetico permette la separazione di molecole di interesse biologico, come amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi ed acidi nucleici, che possiedono gruppi ionizzabili e possono esistere in soluzione come specie elettricamente cariche (sia cationi che anioni).

La tecnica consiste nella migrazione differenziata, di tali molecole elettricamente cariche, in un campo elettrico, in base al loro peso molecolare e alla loro carica.

È stato seguito il manuale operativo riportato dal fornitore *BIO-RAD*.

3.7. LIC – Ligation Independent Cloning

Il metodo si basa sull'utilizzo dell'enzima T4 DNA polimerasi.

Questo enzima possiede sia un'attività polimerasica 5'-3' che un'attività esonucleasica 3'-5', quest'ultima si verifica in condizione di assenza o carenza di specifici dNTP. Infatti, nel caso in cui sia presente un unico dNTP, la polimerasi taglia tutti i dNTP della sequenza nucleotidica, arrestandosi in prossimità del dNTP specificato, portando alla formazione di estremità sfalsate (sticky ends).

La prima operazione è la progettazione dei primer per l'amplificazione del gene target. In base al vettore prescelto che contiene specifiche sequenze LIC si disegnano dei primer forward e reverse che contengono circa 18 nucleotidi specifici per complementare le sequenze LIC presenti nel vettore e altri 16-18 nucleotidi specifici per la regione codificante del gene da clonare (dalla tripletta d'inizio al segnale di terminazione): al termine della PCR il gene possiede alle estremità delle estensioni di circa 18 nucleotidi necessarie per il clonaggio. Al termine dell'amplificazione è necessario valutare se il prodotto dell'amplificazione è ottimale per il successivo clonaggio (quantità adeguate e controllo del peso molecolare).

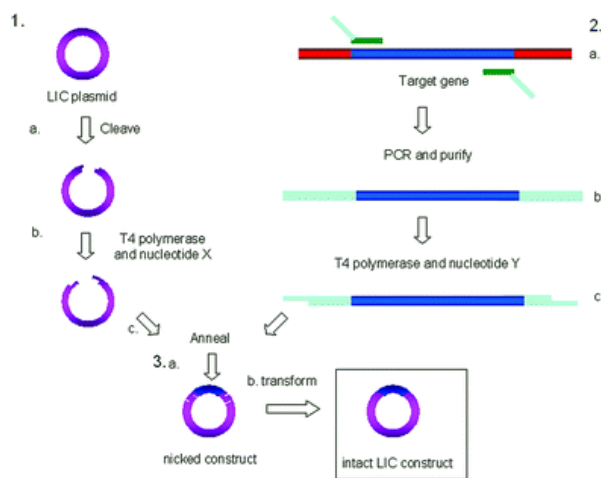


Figura 7. Schematizzazione LIC cloning.

Successivamente si purifica e si tratta il prodotto di PCR (inserto) con la T4 polimerasi, in presenza del nucleotide Y, la polimerasi esplicherà la sua attività esonucleasica fino al primo Y che incontra ed andrà a creare le sticky ends alle

estremità del gene target; la reazione avviene a temperatura ambiente, l'inattivazione della polimerasi invece si ha con alte temperature.

Per quanto riguarda il vettore plasmidico, esso viene linearizzato mediante uso di uno specifico enzima di restrizione, purificato e successivamente trattato con la T4 polimerasi, in presenza del nucleotide X, e, come sopra, la polimerasi taglierà fino al primo X che incontra; questo passaggio crea delle sticky ends appropriate per l'annealing indipendente da enzimi ligasi tra inserto e vettore LIC.

- **Preparazione del vettore (il protocollo operativo seguito è lo stesso per i due vettori pMCSG7-EK e pMCSG9-EK)**

1. Digestione del vettore con *BseRI*

MIX digestione pMCSG7-EK/pMCSG9-EK

<p><i>p7-EK/p9-EK</i> <i>Buffer MultiCore (10x)</i> <i>BSA (10x)</i> <i>BseRI</i> <i>H2O</i></p>

Nella miscela di reazione è presente BSA (Bovine Serum Albumin), utilizzata nelle reazioni di digestione per evitare “star activity”, cioè l'azione dell'enzima di restrizione su siti non canonici e/o aspecifici.

Il Buffer Multicore (10x) è composto di: 250mM Tris-acetato (pH 7.5 a 25°C), 1M acetato di potassio, 100mM acetato di magnesio, 10mM DTT.

2. Reazione del vettore linearizzato con T4 DNA polimerasi

DNA vettore ($\approx 200\text{ng}$)
NEB buffer 5x
dTTP (25mM)
T4 DNAPol NEB (1/8)
H ₂ O

3. Incubazione in **PCR**: 22°C per 1h
4. 75°C per 20 minuti per l'inattivazione della T4 DNA polimerasi

- **Preparazione dell'inserto:**

1. Reazione dei prodotti di amplificazione (*Par. 2.4*) con T4 DNA polimerasi

DNA inserto ($\approx 200\text{ng}$)
NEB buffer 5x
dATP (25mM)
T4 DNAPol NEB (1/8)
H ₂ O

La T4 polimerasi è stata diluita con NEB buffer 1x, ovvero: 1 μL T4 pol+7 μL NEB buffer 1x (2 μL di 5x+8 μL H₂O).

2. Incubazione in **PCR**: 22°C per 1h
3. 75°C per 20 minuti per l'inattivazione della T4 DNA polimerasi

- **Reazione di Annealing:**

1. Terminata l'inattivazione i campioni sono stati centrifugati rapidamente
2. Aliquotate: 2.0 μL di inserto e 2.0 μL di vettore, per ogni campione, per l'annealing

3. **Fase di annealing:** miscela vettore ed inserto a Temperatura ambiente per 30 minuti
4. Aggiunti 2.0 μL di EDTA 25 Mm; a Temperatura ambiente per 5 minuti
5. Aggiunti 4.0 μL H₂O; volume finale 10 μL

3.8. Estrazione DNA da gel di agarosio e da prodotti di PCR

Il kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** permette due applicazioni in un unico kit. Il volume di eluizione è minimizzato (circa 15 μL) determinando l'ottenimento di DNA altamente concentrato. Per l'estrazione viene utilizzata una membrana a scambio anionico, di gel di silice, che espone cariche positive che interagiscono con le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA, legandolo; in sostanza la tecnica usata è quella della cromatografia a scambio ionico attraverso membrane.

Il protocollo è stato ricavato da manuale operativo Macherey-Nagel.

3.9. Trasformazione batterica

Processo mediante il quale si ottiene l'inserimento di materiale genetico estraneo in cellule batteriche per mezzo di vettori plasmidici. Attraverso questa forma di trasferimento di DNA, i batteri possono acquisire caratteristiche fenotipiche diverse (come la resistenza ad un antibiotico).

Lo schema operativo si basa sull'aggiunta del plasmide ricombinante in un volume di cellule *E. coli* competenti: vengono utilizzati 2 μ l di plasmide ricombinante in 50 μ l di cellule.

La competenza è la capacità di una cellula batterica di acquisire DNA esogeno mediante la trasformazione, ottenuta per mezzo di trattamenti con soluzioni contenenti CaCl_2 . Attraverso un heat shock (42°C per 45 secondi) si favorisce l'ingresso di DNA esogeno nelle cellule, che vengono poi poste in ghiaccio per 20 minuti. La successiva aggiunta del terreno S.O.C. (Super Optimal broth with Catabolyte repression) permette la ripresa delle cellule lasciate in incubazione (37°C) per un'ora.

Nel caso sia necessaria la selezione dei mutanti, dopo la trasformazione e la crescita in SOC, le colture possono essere piastrate su terreno solido e lasciate crescere a 37°C per tutta la notte; le colonie prodotte potranno essere poi utilizzate per la selezione dei cloni positivi per l'inserito (Colony PCR) o per valutare l'efficienza di espressione.

3.10. Colony PCR

È una tecnica utilizzata per verificare rapidamente la presenza del gene target nelle colonie prodotte dopo la trasformazione.

Si basa sulla reazione di PCR in cui il DNA stampo è rappresentato non da DNA purificato ma da poche cellule prelevate da una singola colonia. La colonia verrà preservata su una piastra di replica.

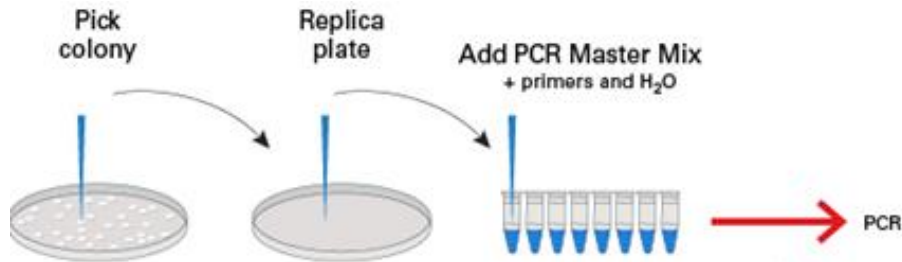


Figura 8. Colony PCR

Operativamente, si prepara un master mix per PCR contenente i primer per il gene target, si raccolgono poi le colonie dalla piastra da esaminare e ciascuna colonia viene stemperata nel mix di PCR suddetto. Si esegue quindi la PCR e mediante elettroforesi su gel d'agarosio si effettua l'analisi dei frammenti amplificati.

Ogni colonia viene stemperata in 50 μ L di acqua e poi piastrata mediante striscio su piastra. Dai 50 μ L di H₂O con colonia sono stati prelevati 20 μ L, messi in 5 mL LB ed Ampicillina (100 μ g/ml), quindi incubate o.n. 37°C; i 30 μ L restanti sono stati congelati (~30 min a -80°C), scongelati e successivamente bolliti per 10 minuti, per permettere la lisi.

PCR: REDTaq[®] ReadyMix[™] PCR Reaction Mix contiene REDTaq[®] DNA Polimerasi, dNTPs, Buffer di reazione ed un colorante inerte rosso (con

questo Mix di reazione non è necessario, nella preparazione dei campioni per elettroforesi in gel d'agarosio, utilizzare il Loading Buffer in quanto il colorante è già presente in soluzione).

REDTaq [®] ReadyMix [™] PCR Reaction Mix
Primers F/R (0.1-0.5 μ M)
DNA (\approx 200ng)
H2O

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

Ciclo di PCR ripetuto per 35 volte.

Il medesimo protocollo è stato seguito con l'utilizzo di DreamTaq[®] Green PCR Master Mix[™], che comprende DreamTaq[®] DNA polimerasi, DreamTaq[®] Green Buffer, dNTPs e 4 mM MgCl₂.

3.11. Minipreparazione di DNA plasmidico

kit **QIAprep Miniprep**: permette la rapida estrazione di DNA plasmidico, subito disponibile all'uso ed eluito in un piccolo volume. Il metodo si basa sulla lisi alcalina delle cellule batteriche seguita dall'assorbimento del DNA su membrana di silice.

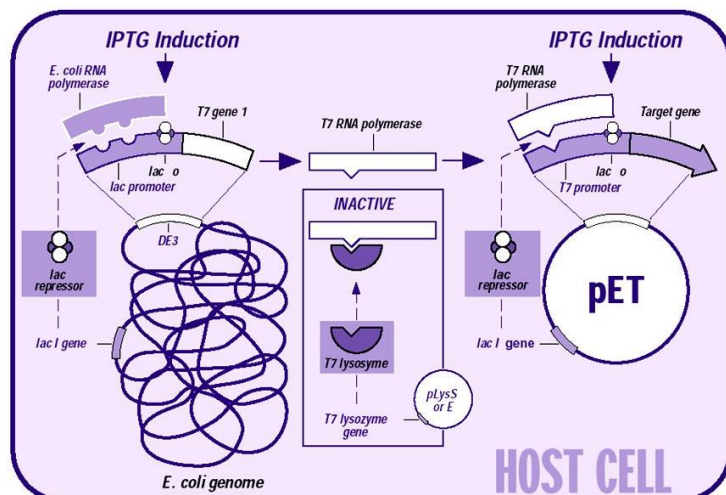
Il protocollo è stato ricavato da manuale operativo *Qiagen*.

3.12. Test di espressione con induzione da IPTG

Clonare un gene in un generico vettore di espressione spesso non è sufficiente per garantire degli alti livelli di espressione della proteina codificata.

Tra i vettori attualmente in commercio uno dei più efficienti è quello che contiene il promotore del batteriofago T7, riconosciuto dalla RNA polimerasi del fago T7 che è specifica per tale promotore. Per servirsi di questo promotore si devono utilizzare delle cellule di *E.coli* che possiedono integrato nel loro cromosoma il gene codificante per la RNA pol T7. Per rendere il sistema inducibile, questo gene è posto sotto il controllo del promotore lac, fisiologicamente indotto dal lattosio, sostituito in vitro dall'IPTG. L'IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside) è un analogo non idrolizzabile del lattosio, in grado di penetrare liberamente nelle cellule.

Figura 9. Sistema di espressione batterico basato sulla RNA polimerasi T7 e sul sistema pET.



L'introduzione di IPTG induce la trascrizione del gene della RNA pol T7 che lega il promotore T7 e permette la trascrizione del gene codificante per la proteina voluta.

Per eliminare l'attivazione non specifica (basale) del promotore lac nel sistema è stato inserito un plasmide, pLysS, contenente il gene codificante per il Lisozima del fago T7 che lega la RNA pol virale inattivandola. Questo plasmide produce piccole quantità di lisozima sufficienti a bloccare RNA polimerasi di T7 prodotta prima dell'induzione.

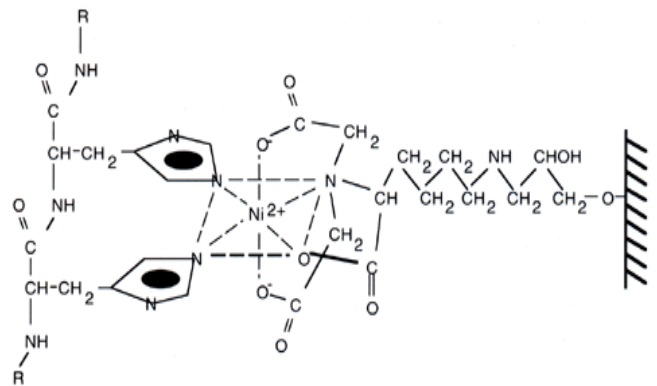
Le colture vengono fatte crescere a 37°C in agitazione e si segue la curva di crescita valutando la torbidità del terreno a 600nm. Quando la densità ottica (O.D.) raggiunge i valori compresi tra 0,4-0,8 si aggiunge l'IPTG (0,2mM). Per l'induzione si lasciano le colture ad incubare per 3-4 ore, trascorse le quali, si effettua una nuova misurazione della O.D. a 600 nm. Il valore di O.D. tra i campioni non indotti ed indotti è rilevante per preparare dei lisati cellulari normalizzati per concentrazione cellulare che verranno analizzati in SDS-PAGE. Mediante test elettroforetico in gel di poliacrilammide è quindi possibile verificare l'avvenuta induzione, confrontando la produzione della proteina in campioni indotti con IPTG con i campioni di controllo non indotti.

3.13. Purificazione della proteina ricombinante – Cromatografia di affinità Ni-NTA (IMAC)

La purificazione di una proteina di interesse da una miscela eterogenea contenente anche altre proteine, oltre a lipidi, polisaccaridi, acidi nucleici ed altre molecole, è un processo complesso condizionato dalle caratteristiche chimico-fisiche della proteina stessa: dimensione, forma, carica, punto isoelettrico, solubilità, capacità di legare metalli o altre molecole, ecc. Le differenze in tali proprietà tra la proteina di interesse e le altre proteine presenti vengono sfruttate per la purificazione.

Per rendere la procedura semplice si può produrre una proteina ricombinante fusa con una coda di istidine al C-terminale o all’N-terminale (nel vettore sono presenti le sequenze codificanti per la coda, detta anche His-tag): questo peptide è capace di legare ioni metallici, in modo particolare il Nichel, e andando a fissare questi ioni su una matrice solida, è possibile il legame della proteina di interesse con la matrice stessa. Il principio utilizzato è quello della cromatografia di affinità: la fase stazionaria è rappresentata dalla resina Ni-NTA (resina di agarosio caricata con nichel) e la fase mobile è la miscela eterogenea contenente la proteina di interesse fusa con l’His-tag.

Figura 10. Interazione della coda di Istidine con la resina Ni-NTA.



Le altre proteine contenute nella miscela (il lisato cellulare) non possedendo l'His-tag non verranno trattenute dalla resina, per cui possono essere rimosse mediante lavaggi.

Dopo i lavaggi deve essere effettuata l'eluizione della proteina di interesse: in una cromatografia di affinità il legame tra l'His-tag e la resina è reversibile, quindi andando ad interferire con tale interazione è possibile distaccare la proteina dalla resina stessa. Per questo possono essere utilizzati ligandi competitivi, aggiunti ai tamponi di lavaggio, tra questi (specificatamente per la resina Ni-NTA) vi è l'imidazolo: è strutturalmente simile al gruppo che nell'istidina è responsabile del legame. Nel caso in cui le molecole possedano la stessa affinità di legame per gli ioni metallici, si può favorire il legame con l'imidazolo semplicemente aumentandone la concentrazione.

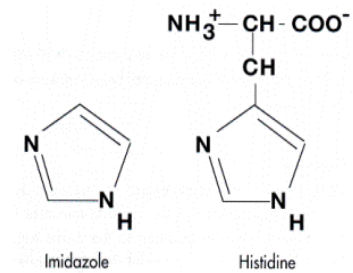


Figura 11. Struttura dell'Imidazolo e dell'Istidina.

Operativamente, si parte con la lisi delle cellule sottoposte ad induzione, precedentemente raccolte per centrifugazione (pellet) mediante uso di una soluzione di lisi (Lysis Buffer), per favorire la risospensione delle cellule e la lisi parziale indotta dallo scongelamento. Dopo aver risospeso le cellule con il vortex, la sospensione stessa viene sonicata per completare la lisi. Nel caso di proteine solubili, si centrifuga e si recupera il sovrantante (lisato chiarificato) che viene mescolato con la resina di affinità, precedentemente equilibrata con un tampone molto simile a quello di lisi (Equilibration Buffer). La sospensione viene lasciata in rotazione a 4°C per almeno 2 ore per far avvenire il legame.

A questo punto si versa la sospensione su una colonna, si fa fluire tutto il volume del materiale non legato, raccolto per successiva analisi, e si procede con le fasi di lavaggio con concentrazioni crescenti di NaCl (fino a 500mM). Le frazioni raccolte si utilizzano per le letture spettrofotometriche dell'assorbanza a 280 nm. Diversi picchi di assorbanza in queste fasi corrispondono ai contaminanti lavati via. Quando il valore dell'assorbanza

arriva a zero, andando avanti con i lavaggi, si aggiunge l'imidazolo a bassa concentrazione per rimuovere proteine batteriche con bassa affinità per il Nichel. Aumentando poi la concentrazione di imidazolo a 250 mM si fa eluire la proteina dalla resina.

Per verificare l'andamento della purificazione occorre analizzare le proteine presenti negli eluati dei vari lavaggi e nelle frazioni eluite con l'imidazolo in SDS-PAGE.

Le frazioni contenenti la proteina d'interesse vengono raccolte, concentrate per ultrafiltrazione e dializzate velocemente per allontanare l'imidazolo, sempre con un apparato di ultrafiltrazione.

Procedura:

- Risospensione del pellet cellulare con Lysis buffer (**1 g di cellule in 10 mL**)

Lysis Buffer:

50 mM Hepes PH 7.8

300 mM NaCl

0.5 mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

0.1x Inibitore di Proteasi

Benzonasi (1/10, 16 uL in 100 mL)

- Aggiunta di 0.2 mg/mL Lisozima (1 ora e mezza in rotazione a 4°C)
- Sonicazione: amp 60%

- Diluizione 1:2 con:

50M Hepes pH 7.8

300 mM NaCl

0.5mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

0.1 mM PMSF (fenilmetilsolfonil fluoruro)

- Centrifugazione a 6800xg per 30 minuti
- Aggiunta di Imidazolo a 10 mM in 50 mL di Lisato chiarificato.
- Binding over-night in 3 mL Ni-NTA equilibrata con:

Equilibration Buffer:

25 mM Hepes pH 7.8

300 mM NaCl

10 mM Imidazolo

0.5 mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

0.1mM PMSF (fenilmetilsolfonil fluoruro)

- Lavaggio della resina dai contaminanti non legati:

Wash buffer 1:

25 mM Hepes pH 7.8

300 mM NaCl

10 mM Imidazolo

0.1 mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

0.1 mM PMSF

Wash buffer 2:

25 mM Hepes pH 7.8

300 mM NaCl

50 mM Imidazolo

0.1 mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

0.1 mM PMSF (fenilmetilsolfonil fluoruro)

Attraverso controllo dell'Assorbanza a 280nm si evince la rimozione di contaminanti; i lavaggi vengono eseguiti fino a quando si raggiunge un valore di Assorbanza prossimo allo zero.

Eluizione:

Elution buffer:

25 mM Hepes pH 7.8

300 mM NaCl

300 mM Imidazolo

0.5 mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

0.1 mM PMSF (fenilmetilsolfonil fluoruro)

3.14. Purificazione in piccola scala su Filter Plate

Dopo la trasformazione, in piccola scala, per test di espressione inducibile con IPTG, la piastra Deep-Well è stata scongelata in ghiaccio ed i pellet risospesi in 500 µl di Lysis buffer (**Par. 3.13**) e successivamente sonicati.

Ai lisati vengono aggiunti 100 µl di resina Ni-IDA equilibrata nell'Equilibration buffer (**Par. 3.13**) ed incubati per tutta la notte a 4°C in agitazione. Per la cromatografia in questo caso è stata usata una piastra filtrante munita di un tappetino (rimovibile) che blocca la fuoriuscita del liquido dal pozzetto quando è necessario.

Le miscele di lisato e la resina vengono quindi versate in sette pozzetti diversi e, dopo l'eluizione del materiale non legato si procede con due lavaggi della resina con 1 ml di tampone di lavaggio. L'eluizione viene fatta con 35 µl di Elution buffer.

Wash buffer per Filter Plate:

25 mM Hepes pH 7.8

300 mM NaCl

75 mM Imidazolo

0.1 mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

0.1 mM PMSF (fenilmetilsolfonil fluoruro)

3.15. Concentrazione della frazione proteica mediante

ultrafiltrazione

Gli apparati di ultrafiltrazione possiedono una membrana selettiva per pesi molecolari diversi che separa due compartimenti. Durante la centrifugazione, il solvente e le sostanze a basso peso molecolare passano dal compartimento superiore a quello inferiore attraverso la membrana, al contrario i soluti con peso molecolare superiore al MWCO (Molecular-Weight Cut Off) della membrana restano intrappolati nel compartimento superiore concentrandosi in funzione del tempo di centrifugazione.

Nel lavoro svolto il cut-off dell'apparato è di 30,000 MWCO (30 kDa).

Una volta ottenuta la concentrazione desiderata lo stesso apparato può essere utilizzato per allontanare l'imidazolo in eccesso, aggiungendo diversi volumi di soluzione tampone senza imidazolo, centrifugando e, ripetendo l'operazione per almeno tre volte, si può assumere che la concentrazione di imidazolo nel campione sia minore di 10 mM.

Buffer di scambio: per l'allontanamento dell'Imidazolo

25 mM Hepes pH 7.8

300 mM NaCl

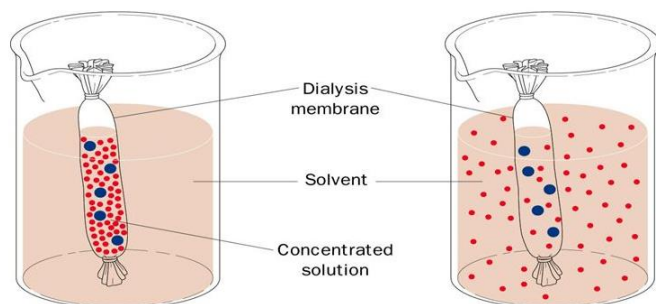
0.5 mM Tcep (tris (2-carbossietil) fosfina)

La proteina purificata conterrà il Tag di fusione e se necessario dovrà subire il taglio con una proteasi specifica. Solitamente ogni Tag presente in un vettore di espressione è seguito da una breve sequenza che codifica per gli amminoacidi riconosciuti da una proteasi.

3.16 Dialisi

La dialisi è una tecnica che consente di separare una o più molecole presenti in una soluzione in base alle dimensioni. A questo scopo si utilizzano delle membrane semipermeabili dotate di pori i quali possiedono un determinato cut-off. Queste membrane permettono il passaggio selettivo di molecole, ciò è reso possibile dalla differenza di concentrazione dei soluti presenti all'interno della membrana e il solvente in cui sono immerse: si raggiunge infatti un

equilibrio dettato dal movimento delle molecole a basso peso molecolare che potranno diffondere da un compartimento all'altro. Il tutto viene eseguito in agitazione e, in questo caso, a 4°C per accelerare il tempo necessario per la dialisi ed evitare l'eventuale precipitazione dei soluti disciolti. La tecnica è stata utilizzata per migliorare la purezza del prodotto finale, allontanando eventuali contaminanti residui e per cambiare eventualmente la concentrazione del buffer in cui sono immerse.



**Figura 12. Schematizzazione
processo di dialisi**

Buffer per dialisi:

150Mm NaCl

5% Glicerolo

25Mm Hapes

3.17. Metodo Bradford per dosaggio delle proteine

È un metodo colorimetrico per la determinazione della concentrazione delle proteine: si basa sulle interazioni non-covalenti tra le proteine e il colorante

Coomassie Brilliant Blue G250 (base del reagente di Bradford); il colorante forma complessi con le proteine mediante interazioni elettrostatiche con aminoacidi basici ed interazioni idrofobiche con aminoacidi aromatici e ciò determina uno shift di assorbanza massima del colorante stesso (la lunghezza d'onda di massimo assorbimento da 465nm, rosso, passa a 595nm, blu). La concentrazione proteica è direttamente proporzionale all'assorbimento rilevato.

Si tratta di un metodo altamente sensibile (fino a 20µg/ml).

Operativamente, volendo determinare la concentrazione di una proteina incognita, si utilizza una proteina standard a concentrazione nota, come BSA (Seroalbumina Bovina).

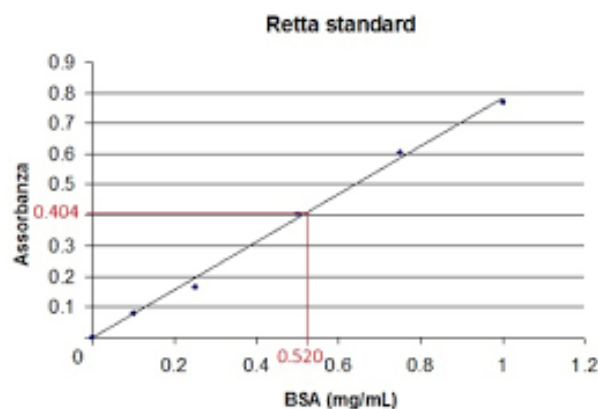


Figura 13. Rappresentazione della retta standard per BSA.

Partendo da una soluzione a concentrazione nota di BSA ed effettuando delle diluizioni, che corrispondono a diverse concentrazioni di BSA, è possibile costruire una retta di taratura che riporta sull'asse x le concentrazioni (mg/ml) e sull'asse y i valori di Assorbanza relativi, misurati a 595nm.

Ad ogni campione viene aggiunto il reagente di Bradford (per permettere la reazione colorimetrica e consentire la misurazione mediante spettrofotometro).

Andando poi a misurare l'assorbanza del campione di interesse, la si può correlare alla concentrazione corrispondente mediante l'utilizzo della retta d'interpolazione dei dati di BSA, ottenendo quindi il valore di concentrazione (mg/ml) della proteina incognita.

4. Risultati sperimentali

4.1. Amplificazione delle isoforme del gene CXCL12

Inizialmente, per ottenere l'amplificazione delle 7 isoforme del gene *CXCL12* umano è stato tentato l'approccio di sintesi del cDNA dall'mRNA di cellule in coltura di origine pancreatica. Le sette isoforme possiedono tutte la stessa sequenza all'N-terminale e differiscono solo per la sequenza al C-terminale, quindi l'amplificazione delle CDS dal cDNA non ha permesso di ottenere del materiale adeguato per la successiva fase di clonaggio.

L'amplificazione è stata condotta su 7 costrutti sintetici prodotti dalla GeneScript utilizzando i primer Forward e Reverse appositamente progettati per la successiva fase di clonaggio LIC:

- Forward LIC:

GACGACGACAAGAAGCCTGTCAGCCTGAGCTACAGATGC, utilizzato per tutte e 7 le isoforme in quanto sono perfettamente omologhe all'estremità N-terminale.

- Reverse LIC: specifico per ogni isoforma,

1) Rev α :

GAGGAGAAGCCCGGTTACTTGTTTAAAGCTTTCTCCAGGTAC

2) Rev β :

GAGGAGAAGCCCGGTTACATCTTGAACCTCTTGTTTAAAGC

3) Rev γ : GAGGAGAAGCCCGGTTAGTTTTTCCTTTTCTGGGCAGCC

4) Rev δ : GAGGAGAAGCCCGGTTACACATCCCCAGGAGAGGGC

5) Rev ϵ :

GAGGAGAAGCCCGGTTAGCAATTGTTTAAAGCTTTCTCCAGG

6) Rev θ : GAGGAGAAGCCCGGTTAGCGTGATGTCTCAGCATTGC

7) Rev **Iso7**: GAGGAGAAGCCCGGTTAGGCTTTGCCAGGTTGACTG

Per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la polimerasi termostabile *Accura™ High-Fidelity Polymerase*. Per produrre abbastanza materiale per il clonaggio l'amplificazione è stata condotta in doppio per ogni campione; le

condizioni di amplificazione seguite sono riportate in Materiali e Metodi (MM.).

Al termine della PCR, 5µl dei prodotti di amplificazione sono stati caricati in un gel d'agarosio all'1,5% per la corsa elettroforetica, al termine della quale è stato possibile verificare la corretta amplificazione mediante confronto con uno Standard di peso molecolare. Il resto del materiale amplificato è stato caricato in un gel di agarosio al 1,5% per la purificazione dei frammenti da gel (**Fig.1**).

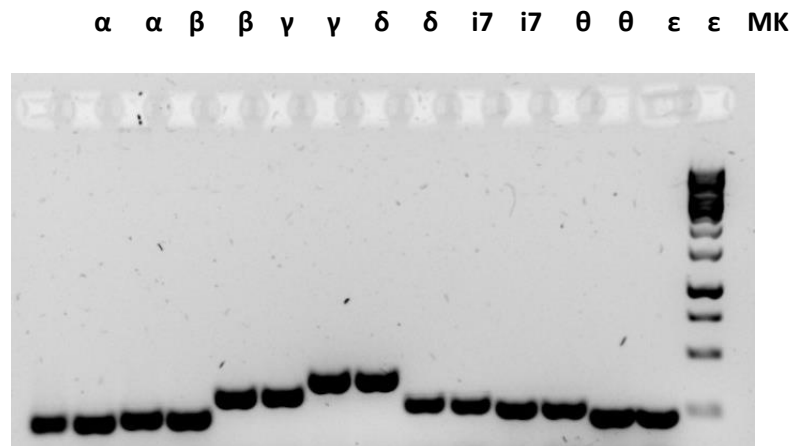


Figura 1. Amplificati delle 7 isoforme di CXCL12. Nel gel di agarosio al 1,5% sono stati caricati 5µl di ciascuna miscela di reazione e 5µl di una soluzione Standard. Nella prima corsia a destra standard di peso molecolare *BlueJuice Gel Loading Buffer (10x) – Thermo Fisher Scientific*.

4.2. Estrazione DNA (Nucleospin Clean-up)

Al termine della corsa elettroforetica i frammenti del gel con le bande corrispondenti agli amplificati sono stati rimossi, mediante l'ausilio di un bisturi, e il DNA relativo è stato estratto utilizzando il kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**: l'estrazione con questo kit permette l'ottenimento di DNA altamente concentrato.

L'eluato viene utilizzato per la procedura di quantizzazione con utilizzo dello spettrofotometro Nanodrop. Nella tabella sottostante vengono riportati i valori di concentrazione (ng/μl) e di rapporto 260/280, questo indica la purezza del campione estratto.

**Concentrazione $A_{260/280}$
(ng/μl)**

δ_{PCR}	177	1,85
γ_{PCR}	180,9	1,85

Tabella 1. *Analisi quantitativa e qualitativa degli amplificati*: vengono riportati in tabella i valori ottenuti per due isoforme, γ e δ .

Generalmente per la ratio 260/280 il valore ottimale, che indica DNA “puro” è di circa 1,80, valori più bassi suggeriscono la presenza di contaminanti come proteine che assorbono a 280nm, in questo caso il rapporto di 1,85 per entrambi indica una buona qualità dei campioni.

4.3. Clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning) in *pMCSG7-EK*

pMCSG7 è un vettore progettato per effettuare il clonaggio indipendente da ligasi (LIC) e la successiva purificazione di proteine ricombinanti. Questo vettore possiede, a monte del gene codificante la proteina di interesse, un tag di Istidine (10xHis-tag), seguito dal sito di restrizione per una proteasi specifica, che permette la purificazione della proteina ricombinante.

Il vettore in oggetto è stato modificato mediante rimozione del sito di taglio per la proteasi TEV (Tobacco Etch Virus) e sua sostituzione con sito di clivaggio per l'enzima EK (Enterochinasi), le caratteristiche del vettore modificato sono riportate nei MM.

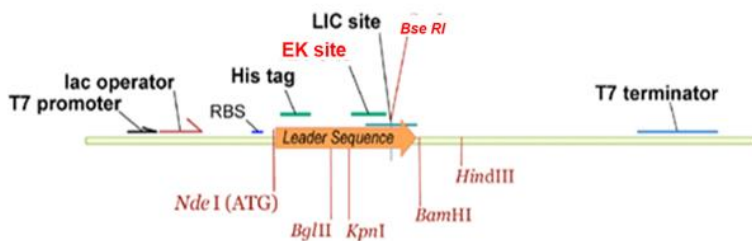


Figura 2. *pMCSG7-modified EK (p7-EK)*.

4.3.1. Preparazione del vettore:

Il vettore *p7-EK* è stato propagato nel ceppo di *E. coli GC-5*, in 100 ml terreno liquido LB con Ampicillina (100µg/ml).

Successivamente, dopo la crescita cellulare, è stato purificato mediante utilizzo del kit QIAprep Miniprep che permette la rapida estrazione di DNA plasmidico, subito disponibile all'uso ed eluito in un piccolo volume; il protocollo è riportato in MM.

Per il clonaggio il vettore è stato digerito con una endonucleasi specifica per essere linearizzato. In questo caso è stata utilizzato l'enzima BseRI.

La reazione ha previsto un periodo di incubazione di 2 ore a 37°C.

Terminata la digestione è stata effettuata una elettroforesi in gel d'agarosio allo 0,8% per confrontare il prodotto di digestione, cioè il vettore linearizzato, e un campione di vettore non digerito. Sono stati caricati 2µl del vettore non digerito e 2µl del prodotto di digestione.

Nella figura sottostante (**Fig. 3**) viene riportato il risultato della corsa elettroforetica.

ND D MK

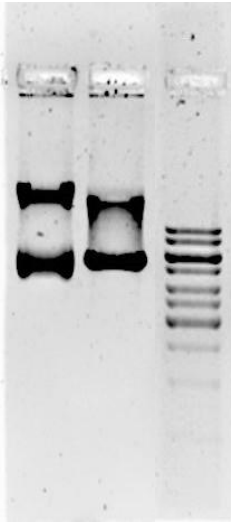


Figura 3. Analisi del prodotto della reazione di digestione di pMCSG7-EK con BseRI.

Nel gel d'agarosio 0,8% sono stati caricati circa 100 ng di plasmide pMCSG7-EK non digerito (ND) e digerito (D) con BseRI per 2 ore a 37°C.

Poiché la digestione non si è rivelata completa al 100% è stato necessario purificare il vettore linearizzato estraendo la banda d'interesse dal gel, mediante il kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Il vettore linearizzato e purificato è stato sottoposto al trattamento con la T4 DNA polimerasi con presenza di solo dTTP. Grazie all'attività esonucleasica 3' -> 5' della polimerasi i dNTPs assenti in soluzione sono stati rimossi fino al raggiungimento del primo residuo di Timidina (T).

4.3.2. Preparazione dell'inserto:

I prodotti di amplificazione ottenuti nella fase precedente (**Par. 1.1**) sono stati a loro volta trattati con l'enzima T4 DNA Polimerasi, in presenza di solo dATPs: l'enzima in questo modo ha tagliato le basi assenti fino al

raggiungimento del primo residuo di Adenina (A). Il trattamento permette la creazione delle estremità adatte alla successiva reazione di annealing con il vettore linearizzato e trattato con la T4 polimerasi; sono state quindi create delle estremità (overhangs) sfalsate lunghe che fungeranno da sticky ends permettendo la reazione di annealing tra vettore ed inserto senza utilizzo di un enzima di ligazione.

4.3.3. Fase di Annealing:

Dopo aver inattivato la T4 DNA polimerasi si è proceduto mettendo a reagire una aliquota di 2 μ l di vettore linearizzato con 2 μ l di inserto, appena ottenuto, per permettere l'annealing.

Il protocollo LIC è riportato in MM.

4.4. Trasformazione E. coli GC-5 competenti per l'acquisizione del plasmide ricombinante

Il ceppo di cellule competenti *E. coli GC-5* è stato trasformato per acquisire il plasmide ricombinante.

È stato seguito il protocollo di Trasformazione riportato in MM.

Sono stati utilizzati 50 μ l di *E. coli GC-5* e 2 μ l della miscela di annealing. Una volta effettuata la trasformazione una aliquota di cellule trasformate è stata

piastrata su terreno solido LB con Ampicillina (100µg/ml) e lasciata in crescita per tutta la notte.

Le colonie prodotte sono state utilizzate per la selezione dei cloni positivi per il plasmide ricombinante.

4.5. PCR Colony

A questo punto è stata effettuata una PCR Colony (descritta in MM.) per verificare l'avvenuta acquisizione da parte delle cellule del plasmide ricombinante. In questa fase sono stati selezionati i mutanti che hanno acquisito il costrutto, cioè il plasmide ricombinante. I cloni voluti dalle piastre sono stati prelevati con ansa (pick colony) ed è stata effettuata una PCR, protocollo REDTaq[®] DNA Polimerasi, utilizzando nuovamente i primers LIC.

I prodotti di PCR sono stati poi caricati su gel di agarosio all'1,5%.

In **Fig. 4** vengono mostrati i prodotti dell'amplificazione dei geni relativi alle isoforme γ e δ , ottenuti dall'analisi di 8 colonie prodotte dopo la trasformazione.

Poiché sono state utilizzate delle Taq Polimerasi differenti, con diverse condizioni di amplificazione, è stato introdotto un controllo positivo che prevede l'utilizzo del template usato per la preparazione degli inserti.

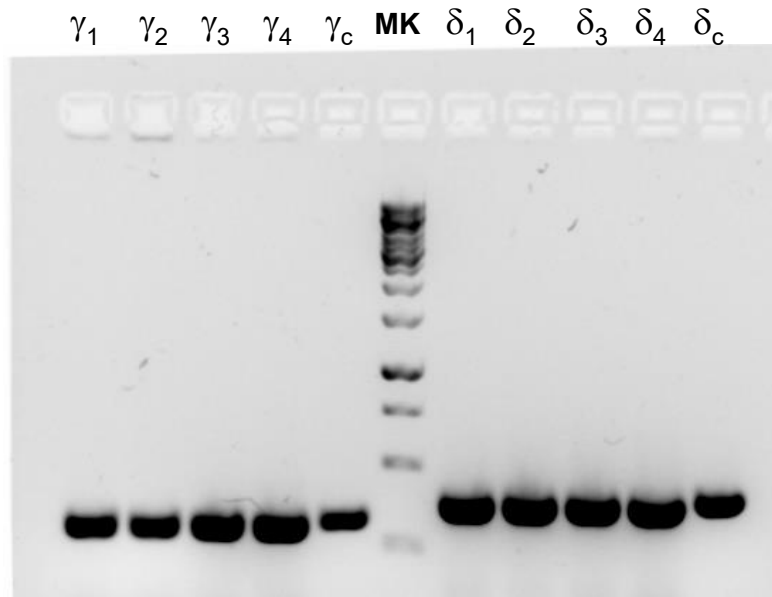


Figura 4. PCR Colony cloni γ e δ . Nel gel d'agarosio al 1,5% sono stati caricati i prodotti dell'amplificazione diretta da colonia: a sinistra i prodotti dell'amplificazione da 4 colonie ottenute dal clonaggio dell'isoforma δ_c , a destra, e a sinistra γ_c indicano l'amplificazione di controllo con i templati originali (gli stessi utilizzati per la produzione dell'inserto). Nella corsia al centro è presente il marker di peso molecolare *BlueEasy Prestained Protein Marker – Nippon*.

4.6. Estrazione DNA plasmidico con kit *QIAprep Miniprep* e quantizzazione con spettrofotometro *Nanodrop*

Valutata quindi l'acquisizione del plasmide ricombinante da tutti i cloni analizzati, dalle piastre di mantenimento, della PCR Colony, sono state

allestite delle colture di 5 ml di terreno LB con Ampicillina (100 μ g/ml) dei cloni per le isoforme γ e δ , fatte crescere per l'ottenimento di DNA necessario per il sequenziamento e la trasformazione del ceppo di *E. coli BL21 (DE3)* *pLysS* per l'espressione della proteina ricombinante.

I plasmidi ricombinanti sono stati purificati dalle colture con kit QIAprep Miniprep, sul DNA ottenuto è stata effettuata una quantizzazione utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop.

Sulla base delle concentrazioni e del grado di purezza ottenuti, sono stati scelti 4 campioni: 2 per δ e 2 per γ . Nella tabella sottostante sono riportate le letture di assorbanza e le concentrazioni relative ai campioni prescelti.

	Concentrazione (ng/μl)	A_{260/280}
δ_1	150,1	1,89
δ_2	132,8	1,87
γ_3	124,2	1,89
γ_4	160,3	1,87

Tabella 2. Quantizzazione con spettrofotmetro Nanodrop.

Nella tabella vengono riportati i valori ottenuti nell'analisi dei cloni positivi per le isoforme γ e δ .

4.7. Sequenziamento BMR Genomics

Per validare la sequenza nucleotidica del costrutto è stato commissionato il sequenziamento alla **BMR Genomics**.

Dopo la purificazione (QIAprep Miniprep), 600ng di ogni plasmide sono stati inviati alla BMR per il sequenziamento, quest'ultimo ha dimostrato, mediante allineamento con la sequenza codificante per CXCL12 senza il leader peptide, una identità del 100% per tutti e quattro i cloni prescelti, come mostrato nella **Fig.5 (a,b)**.

(a)

Homo sapiens C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12), transcript variant 3, mRNA
 Sequence ID: NM_001033886.2 Length: 524 Number of Matches: 1
 Range 1: 149 to 451

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
534 bits(591)	1e-148	300/303(99%)	0/303(0%)	Plus/Plus
Query 121	CGACAAGAAGCCT	GTCAGCCTGAGCTACAGATGC	CCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT	180
Sbjct 149	CGACGGGAAGCCC	CGTCAGCCTGAGCTACAGATGCC	CCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT	208
Query 181	TGCCAGAGCCAAC	GTCAAGCATCTCAAAATTTCTCA	AACTCCAAACTGTGCCCTTCAGAT	240
Sbjct 209	TGCCAGAGCCAAC	GTCAAGCATCTCAAAATTTCTCA	AACTCCAAACTGTGCCCTTCAGAT	268
Query 241	TGTAGCCCGGCT	GAAAGAACAACAACAGACAAGT	GTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGAT	300
Sbjct 269	TGTAGCCCGGCT	GAAAGAACAACAACAGACAAGT	GTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGAT	328
Query 301	TCAGGAGTACCT	GGAGAAAGCTTTAAACAAGGGG	CGCagagaagaaaaagtggggaaaaa	360
Sbjct 329	TCAGGAGTACCT	GGAGAAAGCTTTAAACAAGGGG	CGCAGAGAAGAAAAAGTGGGGAAAAA	388
Query 361	agaaaagatagg	aaaaaagaagcgacagaagaagaa	aggctgcccagaaaaggaaaaa	420
Sbjct 389	AGAAAAGATAG	GAAAAAAGAAGCGACAGAAGA	GAGAAAGGCTGCCCAGAAAAGGAAAAA	448
Query 421	CTA	423		
Sbjct 449	CTA	451		

(b)

Homo sapiens C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12), transcript variant 4, mRNA
 Sequence ID: NM_001178134.1 Length: 1209 Number of Matches: 1
 Range 1: 149 to 515

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
649 bits(719)	0.0	364/367(99%)	0/367(0%)	Plus/Plus

```

Query 95  CGACAAGAAGCCTCTCAGCCTGAGCTACAGATGCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT 154
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 149  CGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT 208

Query 155  TGCCAGAGCCAACGTC AAGCATCTCAAAATTCTCAACTCCAACTGTGCCCTTCAGAT 214
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 209  TGCCAGAGCCAACGTC AAGCATCTCAAAATTCTCAACTCCAACTGTGCCCTTCAGAT 268

Query 215  TGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGAT 274
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 269  TGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGAT 328

Query 275  TCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAACCTGATCAGCGCCGCACCAGCCGGGAAGAG 334
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 329  TCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAACCTGATCAGCGCCGCACCAGCCGGGAAGAG 388

Query 335  GGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCCTGCATCCCTCTCCTCCCAGGGCCTGCCCCACAGCTCG 394
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 389  GGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCCTGCATCCCTCTCCTCCCAGGGCCTGCCCCACAGCTCG 448

Query 395  GGCCTCTGTGAGATCCGTCTTTGGCCTCCTCCAGAATGGAGCTGGCCCTCTCCTGGGGA 454
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 449  GGCCTCTGTGAGATCCGTCTTTGGCCTCCTCCAGAATGGAGCTGGCCCTCTCCTGGGGA 508

Query 455  TGTGTAA 461
          |||||
Sbjct 509  TGTGTAA 515

```

Figura 5. Allineamento delle sequenze dei cloni $\gamma 3$ e $\delta 2$ con le sequenze di riferimento.

In **(a)** è riportato l'allineamento del clone p7-EK $\gamma 3$ e in **(b)** l'allineamento relativo al clone p7-EK $\delta 2$. In giallo è riportata la sequenza corrispondente alla regione codificante senza segnale per l'esportazione.

4.8. Trasformazione *E. coli* BL-21 (DE3) pLysS competenti per acquisizione del plasmide ricombinante p7-EK e test di espressione mediante induzione con IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside)

4.8.1. Trasformazione ceppo *E. coli* BL-21 (DE3) pLysS e preparazione colture per test di induzione

È stata eseguita la trasformazione di cellule *E. coli* BL-21 (DE3) pLysS seguendo la stessa procedura del paragrafo precedente, utilizzando i plasmidi ricombinanti per i cloni γ e δ .

In questo caso, dopo la trasformazione, sono state allestite delle pre-colture in 5ml di terreno liquido LB con Ampicillina (100 μ g/ml) e Cloramfenicolo (34mg/ml) lasciate in crescita over-night (o.n.) a 37°C. Si è successivamente proceduto con la diluizione delle pre-colture sature (passando da circa 4 O.D. a circa 0.04 O.D.) con terreno fresco LB in aggiunta di Ampicillina (100 μ g/ml) e Cloramfenicolo (34mg/ml), queste sono state lasciate in crescita per 1 ora a 37°C in oscillazione a 250rpm.

Trascorsa l'incubazione, sono stati misurati i valori di O.D. allo Spettrofotometro.

Nella tabella (**Tab. 3**) riportata in basso vi sono i valori di Assorbanza misurata a 600nm per le colture di due cloni γ e due cloni δ .

4.8.2. Induzione dei campioni con IPTG (0.2mM)

I campioni sono stati quindi indotti mediante aggiunta di IPTG (0.2 mM) ed incubati a 37°C per 3 ore.

Dopo l'incubazione sono stati nuovamente letti i valori di O.D. a 600nm, riportati in **Tab. 3**.

	<i>Lecture Assorbanza (ABS) a 600nm PRE-induzione</i>	<i>Lecture Assorbanza (ABS) a 600nm POST-induzione</i>
- $\gamma 3$	0,542	1,84
- $\gamma 4$	0,517	1,68
- $\delta 1$	0,559	1,65
- $\delta 2$	0,551	1,60

Tabella 3. Crescita delle colture prima e dopo l'induzione.

Nella tabella sono riportate le letture allo spettrofotometro dell'O.D. a 600nm, prima e dopo induzione con IPTG, delle quattro colture.

Per il confronto tra i campioni non indotti ed indotti è stato preparato un gel SDS-PAGE 12% (in **Fig. 6**).

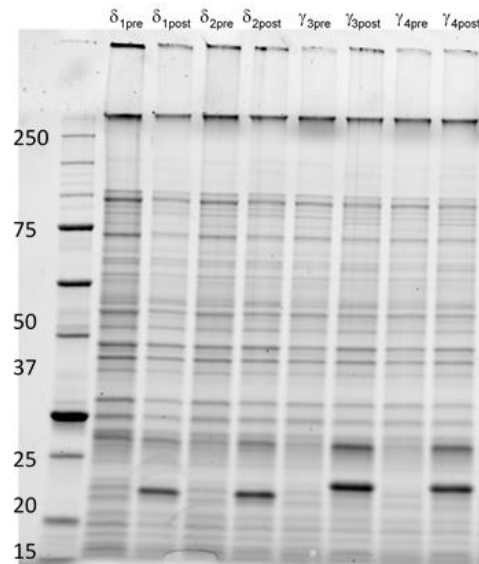


Figura 6. Test di espressione per i cloni $\gamma 3$ e $\delta 2$.

Nel gel SDS-PAGE (Stain Free) al 12% sono stati caricati 5 μ l di lisato totale, ottenuto dal pellet di 1 ml di coltura non indotta ed indotta, normalizzato in base alla densità ottica.

Dalla **Fig. 6** si osserva che le condizioni di induzione standard sono accettabili per l'isoforma γ , mentre per la δ sarà necessario eseguire dei test per ottimizzare l'espressione. Inoltre, nella figura appare evidente che i pesi molecolari non corrispondono a quelli attesi. Sarebbe opportuno analizzare i campioni in un gel al 15% poliacrilammide e non in SDS-PAGE per poter valutare più correttamente il peso molecolare, esistono infatti diversi approcci in letteratura per valutare il peso molecolare di piccole proteine basiche come quelle oggetto nel presente lavoro.

4.9. Purificazione clone γ_3 (p7-EK) mediante Cromatografia di affinità (Ni-IDA)

Un clone γ_3 è stato utilizzato per una prova di purificazione con utilizzo di resina di affinità Ni-IDA.

Il protocollo specifico con le condizioni di purificazione e la composizione dei buffers utilizzati è riportato nei MM.

Il pellet di cellule *E. coli* BL-21 (γ_3 p7-EK), derivante del precedente processo di trasformazione ed induzione, è stato risospeso con Lysis Buffer (1g di cellule in 5ml di Lysis Buffer) e successivamente sonicato per lisi meccanica delle cellule.

Dopo la sonicazione, un'aliquota del campione è stata prelevata come lisato totale (LT) mentre una seconda aliquota è stata centrifugata a 15000 xg per 15 minuti, per ottenere due campioni, LT_S che rappresenta la frazione di surnatante e LT_P che rappresenta la frazione di pellet.

I campioni sono stati quindi caricati sul gel SDS-PAGE 12% (Comassie Gel)

(Fig.7).

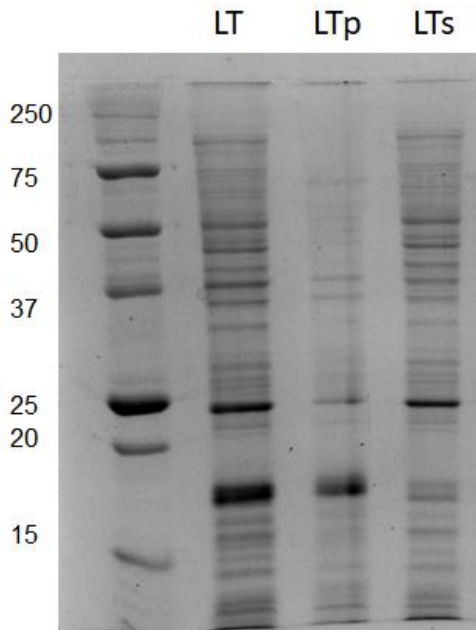


Figura 7. Analisi dei campioni per determinare la solubilità della proteina ricombinante.

* *

Nel gel SDS-PAGE 12% colorato in Comassie Blue sono stati caricati 5 μ l di lisato totale, di supernatante, dopo centrifugazione (LTs), e di pellet dopo centrifugazione (LT_p) normalizzati per volume.

Dall'analisi del gel mostrato in figura (Fig. 7) la proteina ricombinate si trova quasi tutta nella frazione LT_p (asterisco *), ovvero nel pellet, quindi nei corpi di inclusione, come osservato in letteratura anche con altri vettori simili.

La purificazione dai corpi di inclusione della proteina ricombinante risulta essere piuttosto complicata in quanto vi è la necessità di procedere con la denaturazione dei corpi di inclusione stessi e la successiva rinaturazione della proteina di interesse. Per tale processo, complicato, non esiste un protocollo valido per tutte le proteine ed ha bassissime rese, richiede molto tempo ma soprattutto non garantisce la totale rinaturazione, aspetto molto importante nel nostro caso perché l'obiettivo è produrre delle citochine per studi funzionali, quindi attive.

Si è proceduto quindi con l'utilizzo di un vettore alternativo **pMCSG9-EK (p9-EK)**, provvisto del gene codificante per la Maltose Binding Protein (MBP), la quale permette una miglior solubilizzazione della proteina di fusione.

4.10. Clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning) in p9-EK

pMCSG9 è un vettore, derivato direttamente da pMCSG7, che permette il clonaggio indipendente dalla ligazione (LIC) con la possibilità di clonare un inserto voluto a valle della proteina che lega il maltosio (MBP).

L'espressione di proteine di fusione con la MBP può essere utilizzata per aumentare la solubilità delle proteine stesse in *E. coli*, infatti MBP si comporta da "solubility enhancer".

Come già precisato, per l'utilizzo di p9-EK, essendo questo derivato direttamente dal vettore p7-EK, è stata utilizzata la stessa coppia di primer in quanto i due vettori possiedono la medesima regione LIC, ciò permette anche di utilizzare gli inserti già preparati per il clonaggio in p7-EK con le estensioni specifiche per LIC.

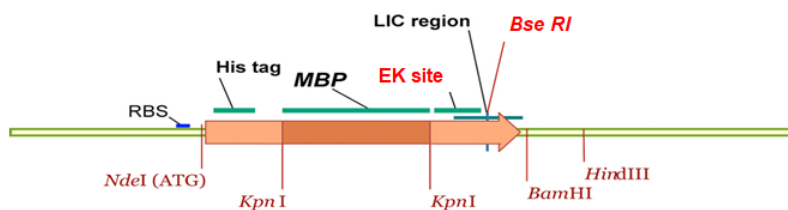


Figura 8. *pMCSG9 – modified EK (p9-EK).*

4.10.1. Preparazione del vettore:

Anche in questo caso, la propagazione del plasmide p9-EK è stata effettuata nel ceppo di *E. coli* GC-5 in terreno liquido LB con Ampicillina (100µg/ml).

Successivamente il vettore è stato purificato mediante utilizzo del kit QIAprep Miniprep.

Per la successiva fase di clonaggio il vettore è stato digerito con endonucleasi *BseRI*.

La reazione ha previsto un periodo di incubazione di 2 ore a 37°C.

A digestione terminata è stata effettuata una elettroforesi in gel d'agarosio allo 0.8% per valutare l'avvenuta digestione del plasmide mediante analisi delle bande.

Sono stati caricati 2µl del vettore non digerito e 2µl del prodotto di digestione, quindi del vettore linearizzato. Nella figura sottostante (**Fig. 9**) viene riportato il risultato della corsa elettroforetica.

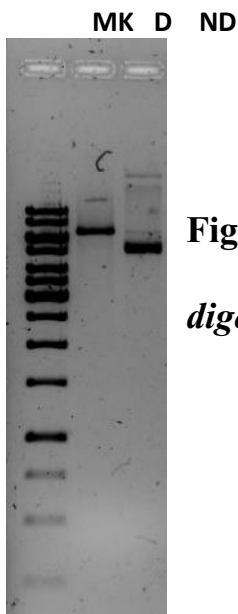


Figura 9. Elettroforesi per analisi del prodotto della reazione di digestione di p9-EK. Non digerito (ND) e digerito (D).

Il vettore linearizzato è stato estratto con kit direttamente del gel d'agarosio (NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up). Successivamente è stato sottoposto a trattamento con T4 DNA polimerasi in presenza di solo dTTPs.

4.10.2. Preparazione dell'inserto:

I prodotti di amplificazione (**Par. 1.1**) sono stati purificati con kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up e quantizzati con spettrofotometro Nanodrop.

I risultati della quantizzazione sono riportati in **Tab. 4**.

I prodotti di PCR ottenuti dal kit, corrispondenti alle 5 isoforme α , β , ε , θ ed Iso7 (γ e δ sono state già purificate e trattate per le prove precedenti) stati trattati con l'enzima T4 DNA Polimerasi per la creazione delle "sticky ends" necessarie alla successiva reazione di annealing con il vettore linearizzato.

	Concentrazione (ng/μl)	A_{260/280}
<i>α</i>	207.6	1.80
<i>β</i>	273.0	1.80
<i>ε</i>	238.6	1.82
<i>θ</i>	208.0	1.81
<i>Iso7</i>	126.5	1.81

Tabella 4. Quantizzazione Nanodrop prodotti di amplificazione. Dai rapporti 260/280 ottenuti si deduce che i prodotti di purificazione sono poco o per nulla contaminati da proteine che assorbono a 260nm.

4.10.3. Fase di Annealing:

Ottenuti il plasmide p9-EK linearizzato e purificato e gli inserti amplificati, entrambi trattati con T4 DNA polimerasi, è stata effettuata la reazione di Annealing: reazione tra una aliquota di 2µl di vettore linearizzato con 2µl di inserto, appena ottenuto.

Le sporgenze (overhangs) complementari sono abbastanza lunghe da permettere l'annealing senza utilizzo dell'enzima Ligasi.

4.11. Trasformazione *E. coli* GC-5 competenti per l'acquisizione del plasmide ricombinante p9-EK

Il ceppo *E. coli* GC-5, competente, è stato trasformato secondo protocollo.

Vengono quindi utilizzati 50 µl di *E. coli* GC-5 e 2 µl di plasmide ricombinante.

Dopo la trasformazione, una aliquota di cellule è stata piastrata su terreno solido LB con Ampicillina (100µg/ml) e lasciata in crescita o.n. a 37°C.

Le colonie prodotte sono state utilizzate per la selezione dei cloni positivi per il plasmide ricombinante.

4.12. PCR Colony

A questo punto è stata effettuata una PCR Colony per verificare l'avvenuta acquisizione del costrutto ricombinante.

Sono stati selezionati quindi i cloni voluti dalle piastre (pick colony) ed è stata effettuata una PCR (protocollo DreamTaq[®] Green DNA polimerasi, in MM.) utilizzando nuovamente i primers LIC.

I prodotti di PCR sono stati poi caricati su gel di agarosio all'1,5% (in **Fig. 10**).

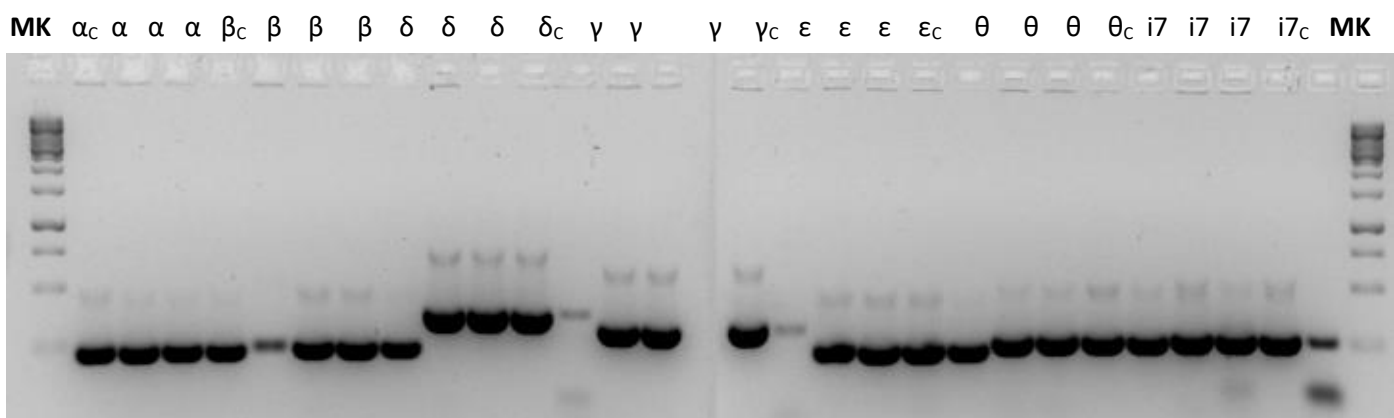


Figura 10. PCR Colony cloni α , β , γ , δ , ϵ , θ e Iso7.

Nel gel d'agarosio al 1,5% sono stati caricati i prodotti dell'amplificazione diretta da colonia: da sinistra i prodotti dell'amplificazione di 3 colonie, per

ogni isoforma, ottenute dal clonaggio, i campioni C indicano le amplificazioni di controllo con i templati originali (gli stessi utilizzati per la produzione degli inserti). Nelle corsie laterali è stato caricato il marker di peso molecolare *BlueEasy Prestained Protein Marker – Nippon*.

4.13. Estrazione DNA plasmidico con kit QIAprep Miniprep

Dai cloni positivi è stato estratto il plasmide ricombinate con kit QIAprep Miniprep ed è stata effettuata una quantizzazione allo spettrofotometro Nanodrop.

	Concentrazione (ng/μl)	A _{260/280}
α 1	39,7	1,93
α 2	35,0	1,91
α 3	37,4	1,93
β 1	37,4	1,95
β 2	42,1	1,96
β 3	30,9	1,95
γ 1	31,0	1,85
γ 2	32,0	1,87
γ 3	29,5	1,83
δ 1	35,9	1,99
δ 2	42,4	2,02
δ 3	30,4	1,87
ε 1	41,4	1,9
ε 2	35,8	2,01
ε 3	38,6	2,02

<i>θ 1</i>	38,5	1,98
<i>θ 2</i>	35,6	1,94
<i>θ 3</i>	42,4	2,08
<i>Iso7 1</i>	39,3	2,00
<i>Iso7 2</i>	40,5	1,96
<i>Iso7 3</i>	42,4	2,05

Tabella 5. Quantizzazione Nanodrop dei cloni positivi da PCR Colony:

vengono riportati in tabella i valori ottenuti nell'analisi dei cloni positivi per le sette isoforme *CXCL12*. In questa quantizzazione i rapporti 260/280 risultano ottimi.

4.14. Sequenziamento BMR Genomics

Per validare la sequenza nucleotidica del costrutto in p9-EK è stato commissionato il sequenziamento alla BMR Genomics.

Anche in questo caso il sequenziamento ha dimostrato, mediante allineamento con la sequenza codificante per *CXCL12*, senza il leader peptide, una identità del 100%.

4.15. Test di espressione in BL21 (DE3) pLysS

Per analizzare tutti i cloni in parallelo è stato seguito il protocollo di espressione in piccola scala in uso al NY-MaSBIC.

In breve, dopo la trasformazione (con 20 μ l di cellule competenti *BL21 (DE3)* *pLysS*) si allestiscono delle colture da 1 ml nelle piastre DW (Deep-Well), dopo la crescita o.n. a 37°C in agitazione vengono prelevati 40 μ l di coltura che vengono utilizzati per inoculare 1 ml di LB con Ampicillina (100 μ g/ml). Dopo circa un'ora di crescita a 37°C in agitazione (O.D. 600 nm circa 1) si aggiunge 1 mM di IPTG e dopo tre ore si blocca l'espressione raccogliendo le cellule mediante centrifugazione (nella DW). I pellet vengono congelati ed utilizzati il giorno seguente per la purificazione in piccola scala mediante Filter plate (descritta nei MM).

Nel gel riportato in **Fig. 11** sono stati caricati 10 μ l del prodotto di purificazione per ciascuna isoforma.

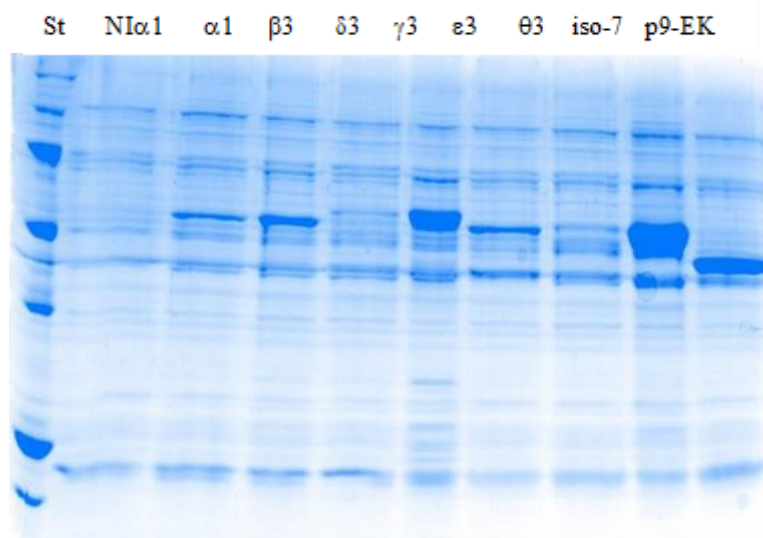


Figura 11. Espressione in piccola scala delle 7 isoforme di CXCL12 clonate in p9EK.

Gel al 12% SDS-PAGE nel quale sono stati caricati 10 μ l di proteine purificate mediante Ni-IDA in piccola scala. Prima corsia a sinistra *MW Standard BIORAD Precision Plus*, NI α 1 prodotto della coltura non indotta (controllo negativo) a seguire i prodotti dei vari cloni ed infine il prodotto del vettore senza inserto (MBP).

4.16. *Trasformazione E. coli BL-21 (DE3) pLysS competenti per acquisizione del plasmide ricombinante p9-EK e Test di espressione per Induzione con IPTG*

4.16.1. Trasformazione E.coli BL-21 (DE3) pLysS e preparazione colture per Test di induzione con IPTG

È stata eseguita la trasformazione di cellule *E. coli BL-21 (DE3) pLysS* seguendo la stessa procedura del paragrafo precedente. Dopo la trasformazione, sono state allestite delle pre-culture in terreno liquido LB con Ampicillina (100 μ g/ml).

Le pre-culture sature sono state poi diluite con terreno fresco LB con Ampicillina (100 μ g/ml) e sono state lasciate in crescita; sono stati quindi misurati i valori di O.D. allo spettrofotometro.

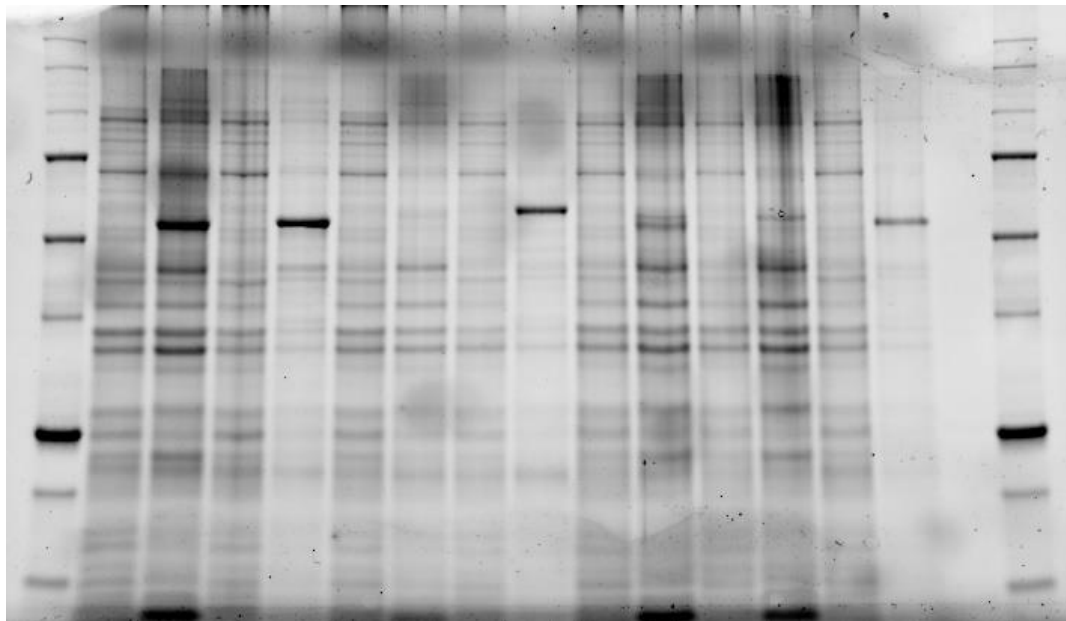
Non vengono riportate le letture pre- induzione per ogni campione in quanto mostravano valori di O.D. molto simili tra loro, nell'ordine di 0.5 O.D.

4.16.2. Induzione con IPTG (0,2mM) in MIDI-scale

I campioni sono stati quindi sottoposti ad induzione con IPTG (0,2 mM) ed incubati per 3 ore a 37°C, in oscillazione a 600rpm. Trascorso il tempo di incubazione sono state effettuate delle nuove letture spettrofotometriche a 600nm; anche in questo caso, come sopra, non sono state riportate le letture post-induzione per ogni campione in quanto tutti i campioni presentavano circa 1.6 O.D.

È stato a questo punto preparato un gel SDS-PAGE 12% (Stain free gel) per confronto tra i campioni non indotti ed indotti (in **Fig. 12**).

MK α_{PRE} α_{POST} β_{PRE} β_{POST} δ_{PRE} δ_{POST} γ_{PRE} γ_{POST} ϵ_{PRE} ϵ_{POST} θ_{PRE} θ_{POST} $i7_{PRE}$ $i7_{POST}$ MK



75
50
37
25
20
15

Figura 12. Espressione in media scala delle 7 isoforme di CXCL12 clonate in p9EK.

Gel al 12% SDS-PAGE (Stain-free) nel quale sono stati caricati 5 µl di lisato cellulare derivante dalle colture non indotte (N) ed indotte (I).

4.17. Prova preliminare di espressione in 3 ceppi *E. coli* diversi:

BL21(DE3) pLysS, C41(DE3) e Rosetta (DE3)

È stata condotta una prova preliminare di espressione, in piccola scala (PCR plate, 96 well plate), delle 7 isoforme in tre diversi ceppi di *E. coli*: *BL21 (DE3) pLysS*, *C41 (DE3)* e *Rosetta (DE3)*. I campioni indotti sono stati caricati su gel SDS-PAGE per confrontare il livello di espressione nei ceppi batterici.

Come si può osservare da risultato della corsa elettroforetica, l'isoforma 7 è la maggiormente espressa in tutti e tre i ceppi ma in percentuale maggiore in

C41 e Rosetta. Per cui si procede con prove di espressione, inducibile, e di purificazione, mediante cromatografia di affinità su resina Ni-IDA, delle isoforme.

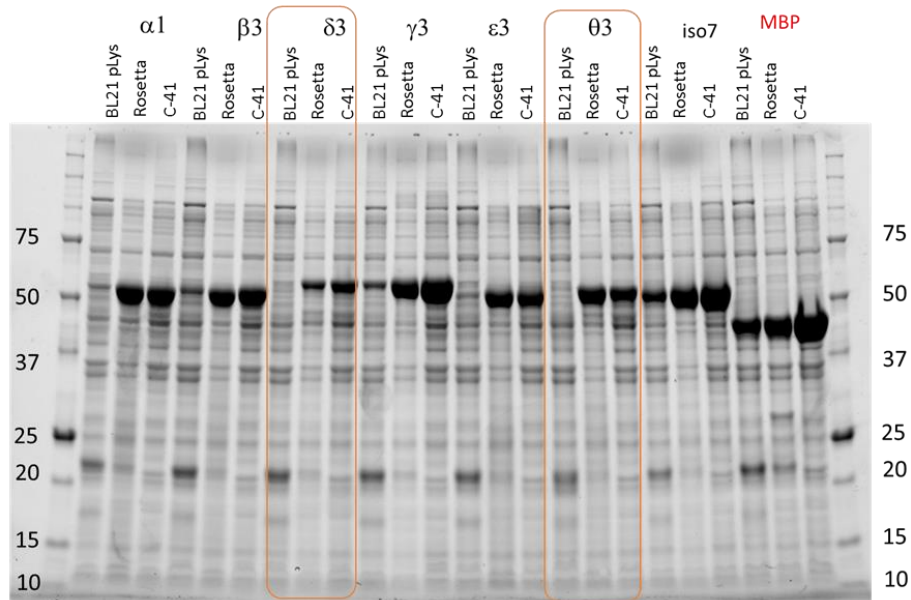


Figura 13. Confronto del livello di espressione in tre ceppi di *E. coli*: BL21 (DE3), C41 (DE3) e Rosetta dei cloni in p9-EK. SDS-PAGE (Comassie Criterion gel).

Vengono evidenziate le bande relative ai campioni indotti per δ e θ : l'analisi di queste riconferma il risultato della prova di induzione precedente nella quale non si aveva una espressione inducibile apprezzabile per tali isoforme. Analogamente, anche per l'isoforma ϵ è stata dimostrata l'inefficienza dell'induzione nel ceppo *BL21 (DE3)*.

Nelle prove successive viene effettuato un confronto tra il rendimento di purificazione per l'isoforma α , la più caratterizzata sia a livello funzionale che

strutturale, ed iso7, attualmente soltanto predetta e che necessiterebbe di ulteriori studi di approfondimento.

4.18. *Trasformazione in E. coli C41 (DE3) competenti per acquisizione del plasmide ricombinante, di CXCL12-Isoform 7 e CXCL12-Isoform α , e test di espressione per induzione con IPTG*

Per tentare di avere una resa migliore è stato quindi utilizzato il ceppo di *E. coli C41 (DE3)*: tale ceppo è più resistente nei confronti delle proteine ricombinanti, le quali potrebbero risultare tossiche a concentrazioni troppo alte, condizione usuale nei sistemi di espressione inducibili come quello trattato.

Caratteristiche aggiuntive riguardanti questo ceppo di *E. coli* sono in MM.

- *CXCL12-Isoform 7*

4.18.1. Trasformazione *E. coli C41 (DE3)* e preparazione colture per Test di induzione con IPTG

Come da protocollo, è stata effettuata la trasformazione, a seguito della quale sono state allestite delle pre-colture in 5 ml di terreno liquido LB con Ampicillina (100 μ g/ml) lasciate in crescita over-night.

Le pre-colture sature sono state poi diluite con terreno LB, con aggiunta di Ampicillina (100 μ g/ml), e sono state lasciate in crescita per 1 ora e mezzo a 37°C in oscillazione a 400rpm; successivamente sono stati misurati i valori di O.D. allo Spettrofotometro.

4.18.2. Induzione con IPTG (0,2mM)

I due campioni sono stati quindi indotti in fase di crescita esponenziale con IPTG (0,2mM) ed incubati per 3 ore a 37°C, in agitazione (600rpm).

Terminata l'incubazione sono state effettuate le letture spettrofotometriche a 600nm.

Vengono riportate le letture (**Tab. 6**) per due campioni di Iso7, condotti in parallelo.

	<i>Lecture Assorbanza (ABS) a 600nm PRE-induzione</i>	<i>Lecture Assorbanza (ABS) a 600nm POST-induzione</i>
- Iso 7 #1	0,490	2,06
- Iso 7 #2	0,600	2,06

Tabella 6. *Lecture Assorbanza (ABS) a 600nm, campioni prima e dopo induzione.*

Per il confronto tra i campioni indotti e non indotti, è stato preparato un gel SDS-PAGE 12% (Stain Free, in **Fig. 14**).

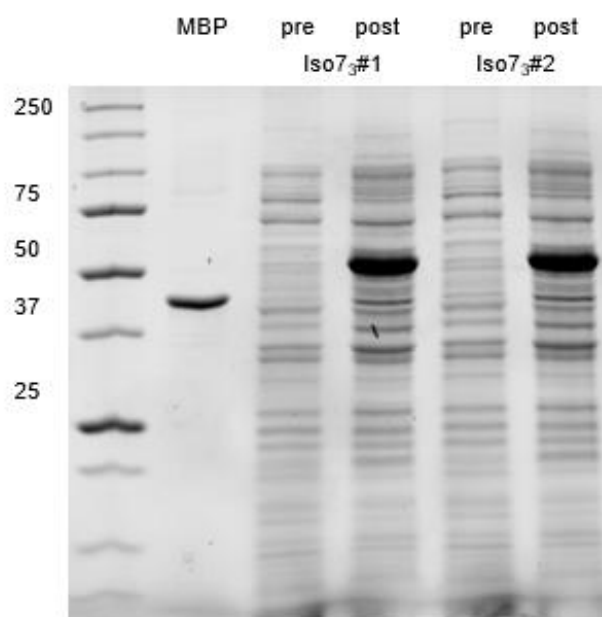


Figura 14. Confronto PRE- e POST- induzione Iso7 in *E. coli* C41(DE3).

Dal gel si deduce che l'induzione risulta essere funzionale e molto riproducibile utilizzando il ceppo *E. coli* C41 (DE3), inoltre si conferma che si ha una maggiore espressione della proteina ricombinante rispetto all'utilizzo di *E. coli* BL21 (DE3).

- CXCL12-Isoform α

È stato seguito il medesimo protocollo di purificazione per l'isoforma α .

4.18.3. Trasformazione *E. coli* C41 (DE3) e preparazione colture per Test di induzione con IPTG

È stata effettuata la trasformazione di cellule del ceppo *E. coli* C41 (DE3), come nelle prove precedenti.

4.18.4. Induzione con IPTG (0,2mM)

Analogamente all'isoforma 7, la prova è stata condotta in doppio.

Le cellule sono state indotte in fase di crescita esponenziale con 0,2mM di IPTG per 3 ore. Vengono riportate le letture di assorbanza prima e dopo l'induzione (**Tab. 7**).

	<i>Lettura Assorbanza (ABS) a 600nm PRE-induzione</i>	<i>Lettura Assorbanza (ABS) a 600nm POST- induzione</i>
- α #1	0,519	2,10
- α #2	0,543	2,10

Tabella 7. Letture Assorbanza (ABS) a 600nm, campioni PRE- e POST-indotti. Le cellule sono state indotte in fase di crescita esponenziale.

I campioni sono stati poi caricati su gel SDS-PAGE 12% (Stain Free) per la valutazione dell'induzione (**Fig. 13**).

#1 #2

MBP α_{PRE} α_{POST} α_{PRE} α_{POST}

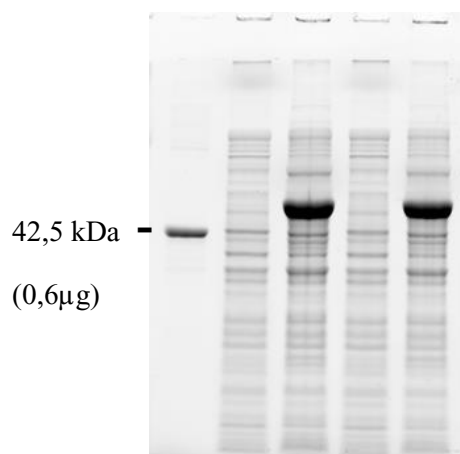


Figura 13. Confronto PRE- e POST-induzione α in *E. coli* C41(DE3).

Anche in questo caso, dall'analisi del gel SDS-PAGE 12% (Stain Free), si conclude che l'induzione mostra buoni risultati, confermando una migliore espressione dell'isoforma α nel ceppo *E. coli* C41 (DE3) rispetto al *BL21* (DE3) *pLysS*. Probabilmente il maggior livello di espressione in C41 (DE3) è attribuibile proprio al fatto che questo ceppo è più resistente nei confronti di alte concentrazioni di proteina ricombinante, che invece risultano essere tossiche per il ceppo *BL21* (DE3) *pLysS*.

4.19. Purificazione cloni *Iso7*_{#1} e α _{#1} (*pMSCG9-EK*) in *E. coli* C41 (DE3) mediante Cromatografia di affinità (Ni-IDA)

Cromatografia di affinità (Ni-IDA) MBP - *Iso7* in *E. coli* C41 (DE3)

Il clone *Iso7*_{#1} è stato utilizzato per una prova di purificazione mediante cromatografia di affinità con utilizzo della resina Ni-IDA.

Il pellet di cellule *E. coli* C-41 (*Iso7_{#1} p9-EK*), con peso pari a 2,1g, è stato risospeso con Lysis Buffer (1g di cellule in 10ml di Lysis Buffer) e successivamente sonicato per la lisi meccanica delle cellule.

Dopo questa fase è stata prelevata una aliquota del lisato (Lisato Totale, LT) per successiva analisi. Dopo il trattamento per la solubilizzazione, il campione è stato centrifugato a 6800 xg. Allo stesso modo è stata centrifugata l'aliquota precedentemente prelevata, ottenendo i campioni, LT_S (S), surnatante, e LT_P (P), pellet.

Contemporaneamente è stata riequilibrata la resina Ni-IDA con Equilibration Buffer.

Le frazioni ottenute dopo centrifugazione sono state poi caricate su gel SDS-PAGE 12% (in **Fig. 14**).

Si è proceduto quindi con il caricamento in colonna cromatografica del lisato (L), lasciato legare o.n. in rotazione. Dopo questa fase, è stata raccolto il materiale non legato (corrispondente al campione UNB = Unbound sul gel) per verificare quanta proteina si è legata alla resina. Sono stati quindi effettuati gli step di lavaggio della resina: i Wash Buffers utilizzati, contenenti concentrazioni crescenti di Imidazolo, dovrebbero permettere la rimozione dei contaminanti che si sono legati in maniera aspecifica alla resina stessa.

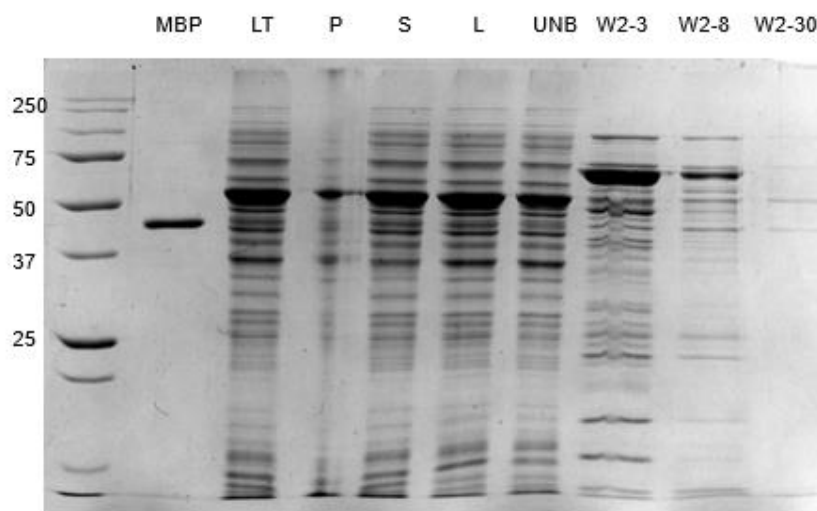


Figura 14. *Analisi della solubilità e distribuzione di MBP-Iso7 nelle prime fasi della purificazione.*

Nell' SDS-PAGE 12% (Comassie stain) sono stati caricati i campioni, normalizzati per volume, corrispondenti al: lisato totale (LT), Super (S) e pellet (P) dopo la centrifugazione a 6800 xg, il lisato chiarificato (L) caricato su Ni-IDA e il materiale non legato alla Ni-IDA (UNB). I campioni indicati con W2-3, W2-8 e W2-30 (10 μ l) sono le frazioni derivanti dal lavaggio effettuato con l'aggiunta di 50 mM Imidazolo. Nel primo pozzetto a sinistra sono stati caricati 5 μ l dello standard di peso molecolare e nel secondo pozzetto (MBP) sono stati caricati 0,6 μ g di MBP ricombinante.

Dal gel mostrato in **Fig.14** si deduce che la proteina si trova in minima parte nella frazione di pellet, per cui la sua solubilità è aumentata con l'utilizzo di p9-EK; tuttavia circa il 50% del prodotto di fusione è presente a livello dell'Unbound.

Le frazioni corrispondenti al W2 (50mM imidazolo) mostrano quanto questo lavaggio sia efficace nell'eluire gran parte delle proteine legate in maniera non specifica alla resina. Lo step di eluizione ha poi previsto l'uso di un buffer con una concentrazione di Imidazolo pari a 300mM: il legame tra la resina e il tag di Istidine è reversibile, per cui l'aggiunta dell'Imidazolo, che si comporta da ligando competitivo con maggiore affinità per la Ni-IDA rispetto al tag, permette il distacco della proteina di interesse dalla resina.

Nella figura in basso è riportato un gel SDS-PAGE (Stain Free) riepilogativo delle frazioni di eluizione ottenute.

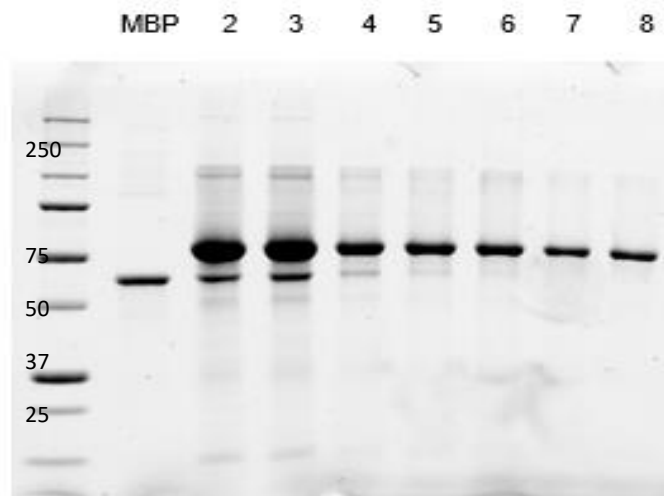


Figura 15. Frazioni corrispondenti all'eluizione della Ni-IDA.

Nel gel SDS-PAGE (Stain Free) sono stati caricati 2 μ l delle frazioni eluite dalla Ni-IDA con l'aggiunta di 300 mM Imidazolo. Il gel mostra che nella fase di eluizione si ottiene il distacco del prodotto di fusione dalla resina ma

allo stesso tempo, nelle prime frazioni, viene eluita anche una discreta quantità di aspecifico.

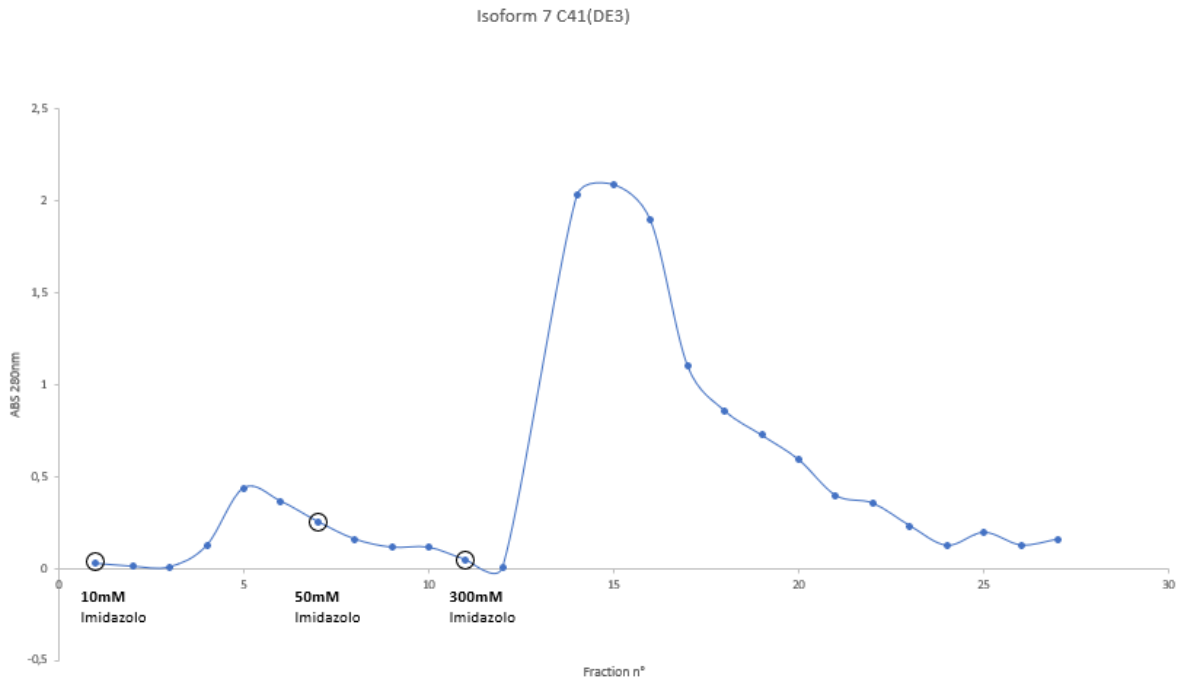


Figura 16. Cromatogramma Ni-IDA Iso7#1 p9-EK E. coli C41 (DE3).

Dall'analisi dell'andamento dell'assorbanza, durante il processo cromatografico, risulta un picco in corrispondenza delle frazioni di lavaggio, confermando la rimozione di contaminanti che avevano legato in modo aspecifico la resina.

4.19.1. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution

Il passaggio successivo ha previsto l'utilizzo di concentratori centrifughi da ultrafiltrazione per concentrare la proteina di interesse contenuta nelle frazioni di eluizione, di cui è stato fatto un pool (volume totale 15 ml).

Per allontanare l'imidazolo e concentrare il campione è stato usato un apparato di ultrafiltrazione dotato di una membrana selettiva per pesi molecolari maggiori di 30KDa. Sottoponendo l'apparato a centrifugazione la proteina presente nella parte superiore dell'apparato non attraverserà la membrana e si concentrerà, mentre i sali passeranno attraverso la membrana. Ripetendo il processo di concentrazione e diluendo il campione con una soluzione senza Imidazolo (buffer di scambio, in MM.), direttamente nel concentratore, si ottiene la quasi eliminazione dell'imidazolo. Al termine della concentrazione è stato aggiunto il Buffer di dimezzamento per diminuire la concentrazione di sale (NaCl). Il Buffer di dimezzamento viene utilizzato in quanto nei successivi step di taglio del tag dalla proteina di interesse, la presenza di una concentrazione così alta di sale nel tampone potrebbe disturbare la reazione, inoltre contiene il 10% di glicerolo che permette la conservazione ottimale del campione a -20°C.

La proteina è stata concentrata tre volte, raggiungendo un volume finale di 5 ml.

Nell'immagine sottostante è possibile osservare un gel SDS-PAGE (Stain Free) di confronto tra il pool delle frazioni di eluizione non concentrato (NC) e concentrato (C).



Figura 17. Confronto tra il pool delle frazioni di eluizione prima (NC) e dopo

concentrazione (C). Nel gel SDS-PAGE sono stati caricati 2 μ l di pool di eluizione non concentrato e 2 μ l di pool concentrato, precedentemente diluito.

Cromatografia di affinità (Ni-IDA) MBP - α in *E. coli* C41 (DE3)

In modo analogo è stata condotta la purificazione, mediante cromatografia di affinità con resina Ni-IDA, del clone $\alpha_{\#1}$.

Il pellet di *E. coli* C41 ($\alpha_{\#1}$ p9-EK) con peso pari a 2,5g è stato risospeso con Lysis Buffer (1g in 10ml di buffer) sottoposto poi a sonicazione.

Terminato il trattamento per la lisi cellulare, il campione è stato centrifugato a 6800xg; come nelle altre prove è stata prelevata una aliquota del lisato grezzo, centrifugato anch'esso a 6800xg, per la valutazione delle frazioni LT_S e LT_P; tali frazioni sono state quindi caricate su gel SDS-PAGE 12% (in Fig. 18).

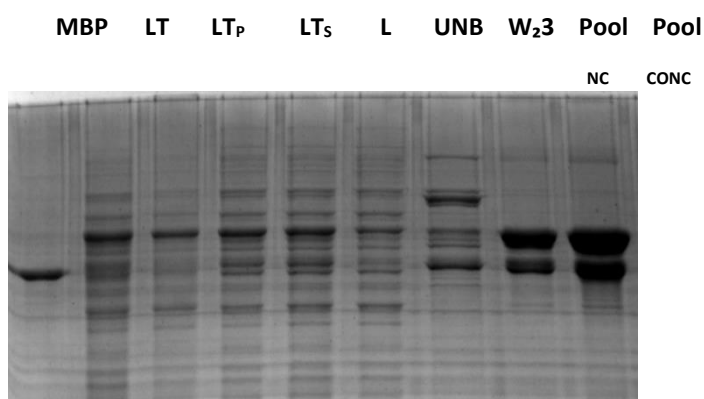
Si è proceduto quindi con il caricamento in colonna cromatografica del lisato (L), lasciato legare o.n. in rotazione. Dopo questa fase, è stata raccolto il Flow-through (corrispondente al campione UNB = Unbound sul gel in **Fig. 18**).

Sono stati quindi effettuati gli step di lavaggio della resina ed infine l'eluizione con buffer con Imidazolo 300 mM, che permetterà il distacco della proteina legata alla resina.

4.19.2. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution

Il pool delle frazioni di eluizione, di 16 ml, è stato concentrato mediante l'utilizzo di concentratori centrifughi aggiungendo Buffer di scambio, che allontana l'Imidazolo; è stato poi aggiunto il Buffer di dimezzamento per dimezzare la concentrazione di NaCl: volume finale 5 ml.

Nell'immagine seguente viene riportato il gel SDS-PAGE riepilogativo delle frazioni di Lisato cellulare (LT), Flow-through (UNB), W2-3, cioè la frazione di lavaggio dei contaminati, e le frazioni di pool di eluizione Non Concentrato e Concentrato.



42,5 kDa -
(0,6 μ g)

Figura 18. Analisi della solubilità e distribuzione di MBP- α durante la purificazione. Nell' SDS-PAGE 12% (Comassie stain) sono stati caricati i campioni, normalizzati per volume, corrispondenti al: lisato totale (LT), Super (S) e pellet (P) dopo la centrifugazione a 6800 xg, il lisato chiarificato (L) caricato su Ni-IDA e il materiale non legato alla Ni-IDA (UNB). Il campione W2-3 (10 μ l) rappresenta la frazione di eluato relativa al lavaggio effettuato con una concentrazione di Imidazolo pari a 50 mM. Nel primo pozzetto a sinistra (MBP) sono stati caricati 0,6 μ g di MBP ricombinante.

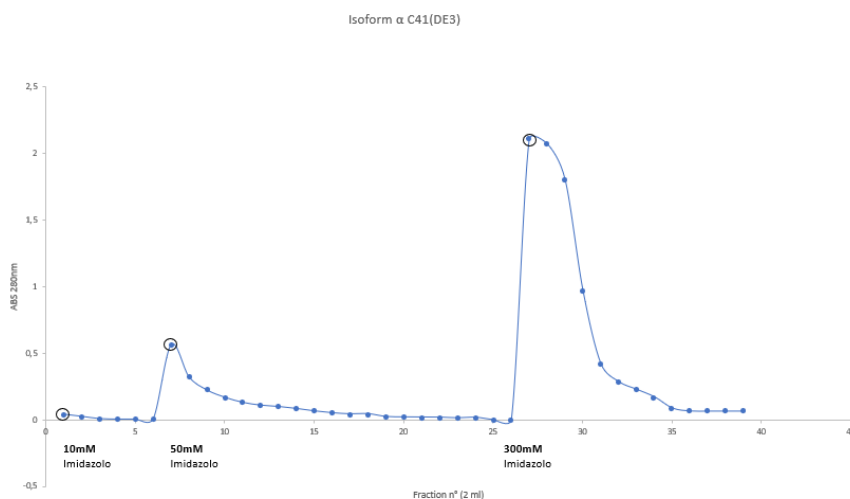


Figura 19.

Cromatogramma Ni-IDA α #1 p9-EK *E. coli* C41 (DE3).

Il grafico mostra il picco di assorbanza relativo alla fase di lavaggio della resina, corrispondente quindi al contaminante rimosso.

4.20. *Trasformazione ed espressione in E. coli Rosetta (DE3) competenti per acquisizione del plasmide ricombinante, di CXCL12-Isoform 7 e CXCL12-Isoform α , per test di espressione per induzione con IPTG*

Il ceppo *E. coli Rosetta (DE3)* deriva da *E. coli BL21 (DE3)* ed è stato progettato per rendere più efficiente l'espressione di proteine eucariotiche, esso infatti contiene tRNA per codoni che raramente vengono utilizzati dal batterio.

4.20.1. Trasformazione *E. coli Rosetta (DE3)* per test di espressione con induzione da IPTG (0,2 mM)

È stata effettuata la trasformazione di cellule del ceppo *E. coli Rosetta (DE3)*, come nelle prove precedenti. Come da protocollo, le cellule sono state indotte in fase di crescita esponenziale con 0,2 mM di IPTG per 3 ore.

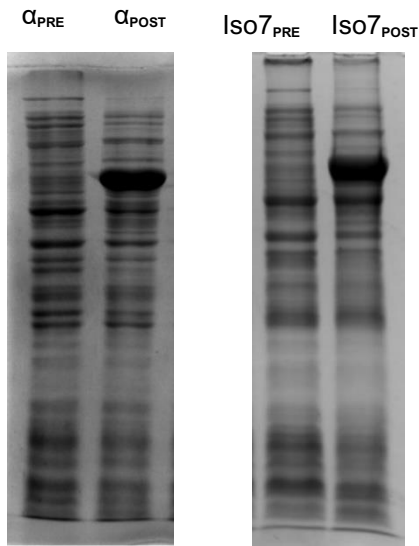


Figura 20. Analisi campioni *Iso7* e α PRE- e POST- induzione in *E. coli* Rosetta (DE3).

Dall'analisi del gel SDS-PAGE 12% (Comassie stain gel) si deduce che l'espressione delle due isoforme nel ceppo *E. coli* Rosetta (DE3) è funzionale, tuttavia, coerentemente con lo studio preliminare di confronto dell'espressione nei tre ceppi, il ceppo C41 (DE3) mostra risultati di espressione migliori in induzione con IPTG.

Nonostante i risultati sopra riportati si prosegue con la purificazione dei cloni indotti in *E. coli* Rosetta (DE3) al fine di ottenere un riscontro più completo che permetta di determinare quale sia il migliore ospite per la produzione e la purificazione del prodotto di fusione.

4.21. Purificazione cloni *Iso7* e α (p9-EK) in *E. coli* Rosetta (DE3) mediante Cromatografia di affinità (Ni-IDA)

Cromatografia di affinità (Ni-IDA) MBP - *Iso7* in Rosetta

Pellet di circa 1g, risospeso in 10 ml di Lysis Buffer e sonicato. Il lisato totale ottenuto (di cui è stata prelevata una aliquota come nelle prove precedenti) è stato centrifugato a 6800xg. Le frazioni del lisato totale (pellet e surnatate) sono state caricate su gel SDS-PAGE 12% (**Fig. 21**).

Terminata la centrifuga, il surnatante è stato caricato in colonna cromatografica (Ni-IDA) e lasciato legare o.n. a 4°C in rotazione. È stato successivamente raccolto il Flow-through risultante (UNB).

Effettuati gli step di lavaggio (a concentrazioni crescenti di Imidazolo), si è proceduto con l'eluizione a 300mM Imidazolo per il distacco della proteina.

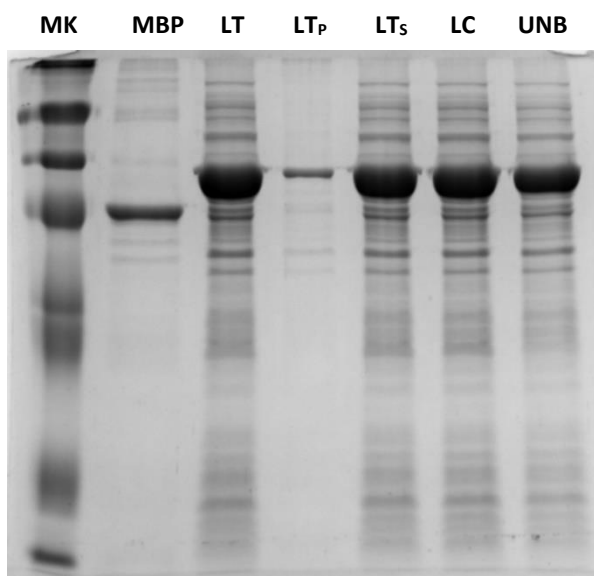


Figura 21. Analisi della solubilità e distribuzione di iso7. Il prodotto proteico è presente in grande quantità (in questo caso le bande si presentano sature) e si ritrova in minima parte nella frazione LTP; tuttavia, anche la banda relativa all'Unbound mostra una saturazione del segnale, quindi una quantità

rilevante del prodotto proteico non si è legato alla resina. Prima corsia da sinistra marker di peso molecolare *BlueEasy Prestained Protein Marker – Nippon*.

4.21.1. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution

Il pool delle frazioni di eluizione, di 12 ml, è stato concentrato con Buffer di scambio, ed è stato poi aggiunto il Buffer di dimezzamento: volume finale 5 ml.

Successivamente è stata messa a punto una dialisi per il campione di pool concentrato allo scopo allontanare i contaminanti residui a basso PM.

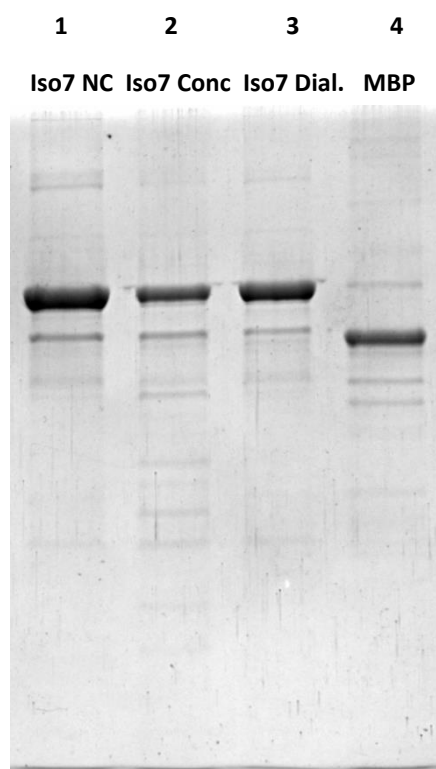


Figura 22. SDS-PAGE pool Iso7 Eluizione Non Concentrato, Concentrato e Dializzato. La purificazione è stata abbastanza efficiente, il prodotto di fusione è infatti relativamente puro e mostra un quantitativo irrilevante di aspecifico.

Cromatografia di affinità (Ni-IDA) α in Rosetta (DE3)

Pellet *E. coli Rosetta (DE3)* (α p9-EK), 1,9 g risospeso in 12,5ml di Lysis buffer.

Il lisato totale è stato centrifugato a 6800xg. Il surnatante è stato a questo punto caricato in resina Ni-IDA a 4°C in rotazione o.n. ed è stato successivamente recuperato il Flow-through.

Il gel SDS-PAGE (Comassie) riportato in basso (**Fig. 23**) mostra le frazioni di Lisato Totale, la frazione di Lisato chiarificato L e il Flow-through Ft.

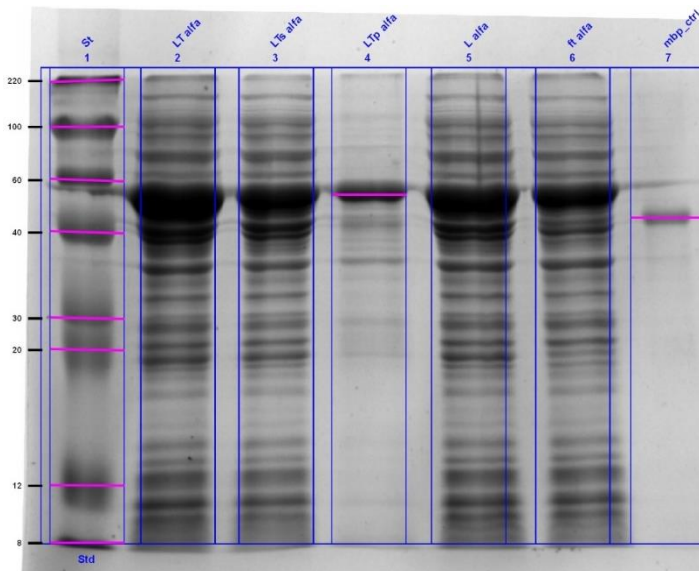


Figura 23. Analisi della solubilità e distribuzione di MBP-alfa durante la purificazione. Prima corsia da sinistra marker di peso molecolare *BlueEasy*

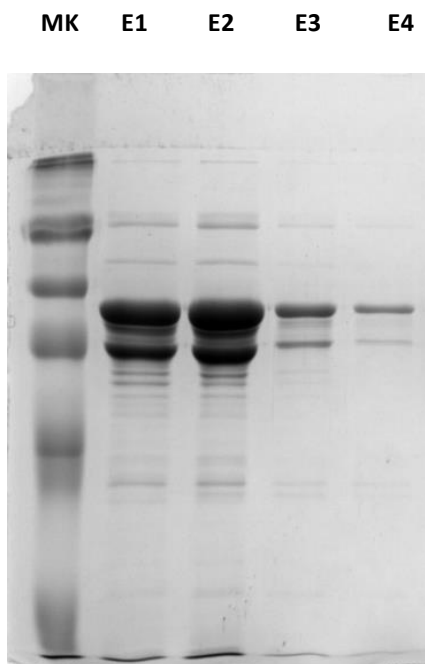
Prestained Protein Marker – Nippon.

Dal gel SDS-PAGE (Comassie stain) è possibile vedere che il prodotto proteico si presenta, come nelle prove precedenti, in parte nel pellet,

probabilmente ciò potrebbe essere dovuto alla sua propensione all'aggregazione (si ritrova quindi nei corpi di inclusione). La banda relativa al Ft mostra che circa la metà del prodotto proteico non si è legato alla resina, come per prima il motivo potrebbe risiedere nel legame di aspecifici (prodotto di fusione tronco) che tendono a saturare la resina non permettendo un buon rendimento di legame.

A questo punto si è proceduto con il lavaggio della resina con i relativi buffer e successivamente si è indotto il distacco del prodotto proteico di interesse dalla resina mediante aggiunta di un'alta concentrazione di Imidazolo (300mM).

Nella figura in basso è riportato un gel SDS-PAGE delle frazioni di eluizione che hanno mostrato picchi rilevanti.



**Figura 24. SDS-PAGE COMASSIE 12%
frazioni di eluizione.**

L'Imidazolo (300 mM) permette il distacco del prodotto di fusione ma, come è visibile dal gel, vi è una gran quantitativo di prodotto aspecifico eluito, con peso molecolare pari al peso della MBP. Prima corsia da sinistra marker di peso molecolare *BlueEasy Prestained Protein Marker – Nippon*.

4.21.1. Concentrazione mediante uso di concentratori Millipore (30,000 MWCO), con Buffer di scambio, del pool Elution

Il pool di eluizione di 4,5 ml è stato prima di tutto diluito tre volte: volume totale 13,5 ml. Successivamente è stato concentrato con utilizzo di un Buffer di scambio fino ad un volume di 6 ml.

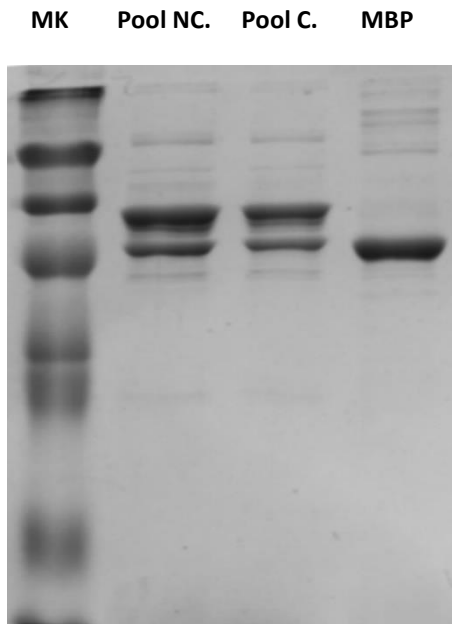


Figura 25. SDS-PAGE (Comassie stain) confronto pool Eluizione Non Concentrato e Concentrato.

Il prodotto di fusione non mostra una purezza apprezzabile, è presente dell'aspecifico. Prima corsia da sinistra marker di peso molecolare *BlueEasy*

Prestained Protein Marker – Nippon.

4.21.2. Trattamento del Flow-through derivante dalla cromatografia di affinità in Ni-IDA per α in *Rosetta (DE3)*

Rispetto all'isoforma 7, per la quale il protocollo di purificazione seguito sembra aver portato all'ottenimento di un prodotto di fusione relativamente puro, l'isoforma α mostra la presenza di un altro prodotto di purificazione in fase di eluizione con peso molecolare pari alla MBP: questo potrebbe derivare da prodotti di fusione tronchi, provvisti quindi di coda di Istidine, che legano la resina con alta affinità.

A questo scopo si è proceduto con il trattamento del Flow-through derivante dal primo caricamento in resina (in **Fig. 23** si può vedere come Ft presenti un gran quantitativo del prodotto di fusione non legato ma non mostra un quantitativo rilevante di aspecifico) per tentare di ottenere un prodotto finale con un maggior grado di purezza. Come prima cosa il campione Ft è stato centrifugato a 15000xg per 30 minuti, di questo è stato poi recuperato il surnatante, caricato in resina Ni-IDA, precedentemente equilibrata con Equilibration buffer, e lasciato o.n. in rotazione per permettere il legame. Successivamente è stato recuperato il nuovo Flow-through e la resina è stata lavata con buffer di lavaggio: Wash buffer 1, privo di Imidazolo, Wash buffer 2 con 75 mM Imidazolo, per la rimozione di eventuali contaminanti.

Successivamente si procede con l'eluizione con Elution buffer 300 mM Imidazolo; nella figura sottostante viene riportato un SDS-PAGE descrittivo delle frazioni di eluizione.

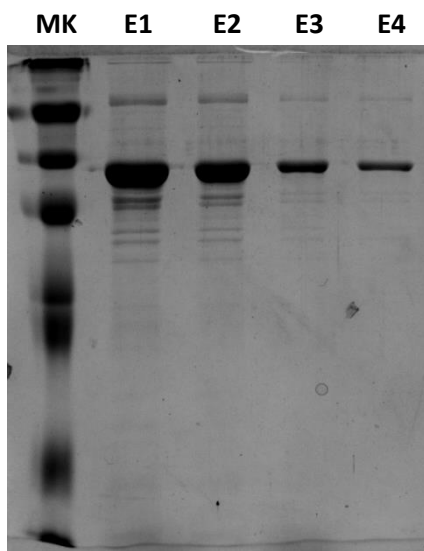


Figura 26. SDS-PAGE (Comassie stain)
frazioni di eluizione. Frazioni di eluizione (300 mM Imidazolo) derivanti dal secondo processo cromatografico che mostravano picchi di assorbanza rilevanti. Prima corsia da sinistra marker di peso molecolare *BlueEasy Prestained Protein Marker – Nippon*.

Le frazioni di eluizione sono state quindi unite, ottenendo un volume finale di 5 ml. Successivamente è stata messa a punto la dialisi per l'allontanamento dell'Imidazolo.

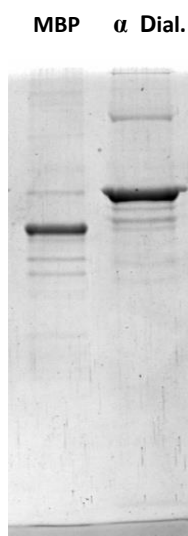


Figura 27. MBP e α dializzato. SDS-PAGE (Comassie stain).

Il risultato in figura, confrontato con SDS-PAGE in **Fig. 25**, dimostra che il trattamento del Flow-through permette l'effettivo recupero del prodotto di fusione non legato con la resina nel primo processo cromatografico: il dializzato è relativamente puro e non mostra la banda con peso molecolare pari alla MBP ottenuta dal primo caricamento della resina Ni-IDA.

4.22. Dosaggio proteico con metodo Bradford

Il dosaggio delle proteine è stato eseguito utilizzando il Saggio Bradbord che prevede la quantizzazione delle proteine a 595nm: il colorante Comassie Brilliant Blue reagisce con gli aminoacidi aromatici della proteina provocando lo shift di assorbanza verso tale lunghezza d'onda. Dettagli in MM.

Iso7 in C41 (DE3) 14 mg totali [2,82 μ g/ μ l]

α in Rosetta (DE3) 4,7 mg totali [0,78 μ g/ μ l]

4.23. Rimozione del TAG con proteasi specifica (Enterochinasi) e recupero di CXCL12

La rimozione del tag His-MBP è stata effettuata mediante reazione di taglio enzimatico: inizialmente è stato proposto l'utilizzo della forma nativa della proteasi Enterochinasi (EK-Roche), in quanto facilmente removibile dalla miscela di digestione attraverso l'ultrafiltrazione, utilizzando quindi dispositivi selettivi per molecole con peso maggiore ai 30 kDa. L'EK nativa è un enzima proteolitico di grandi dimensioni, per cui, in un sistema di questo tipo, è stato osservato che non possedeva facile accesso al sito di taglio per la maggioranza delle proteine di fusione prodotte. Conseguentemente è stata utilizzata la forma ricombinante dell'enzima: rec-EK (small fragment) prodotta e commercializzata dalla Novagen. Con questa forma dell'enzima, e seguendo le condizioni di reazione suggerite dal produttore, la gran parte delle proteine di fusione vengono tagliate in modo efficiente, quando ciò non ha luogo basta optare per l'utilizzo di una concentrazione maggiore dell'enzima stesso.

Per la valutazione dell'efficienza di taglio vengono effettuati dei test in piccola scala, i quali tuttavia non permettono di evidenziare e fare considerazioni sui problemi di solubilità del prodotto tagliato.

L'inattivazione dell'enzima può essere eseguita mediante utilizzo di un inibitore selettivo di Serina proteasi, come appunto l'EK utilizzata, il 4-(2-amminoetil) benzensolfonil fluoruro cloridrato o AEBSF, facilmente dializzabile.

Secondo le indicazioni suggerite dal produttore, i prodotti di fusione dovrebbero essere dializzati con una soluzione contenente 50 mM NaCl, tuttavia è stato osservato che alcuni di questi subiscono parziale precipitazione a tale concentrazione salina; inoltre, la soluzione tampone fornita per la reazione dell'enzima contiene 2 mM Ca^{2+} , il quale potrebbe interferire con la solubilità del prodotto di fusione durante la reazione di digestione e con l'eventuale saggio biologico.

Quindi è stato necessario verificare se l'enzima mantenesse la sua attività anche in presenza di 150 mM NaCl (concentrazione ottimale per i nostri campioni) e valutare se il CaCl_2 fosse indispensabile per l'enzima.

Per questo motivo è stata valutata l'attività della rec-EK in presenza di 20 mM Hepes pH 7.8, 5% glicerolo (condizione già controllata) con l'aggiunta di diverse concentrazioni di sale: 150mM NaCl, 50 mM NaCl e 50mM NaCl in

aggiunta a 2mM Ca²⁺; sono stati utilizzati 10 µg dell'isoforma iso7 in un test in piccola scala (20 µl finali). Come mostrato in **Fig. 28** le diverse concentrazioni saline non interferiscono in modo sostanziale con la reazione di taglio; inoltre, apparentemente, l'isoforma 7 priva di tag resta in soluzione, ciò è osservabile dal gel: il campione Ds, sottoposto a centrifugazione, mostra una quantità di iso7 proporzionale al controllo di digestione (D).

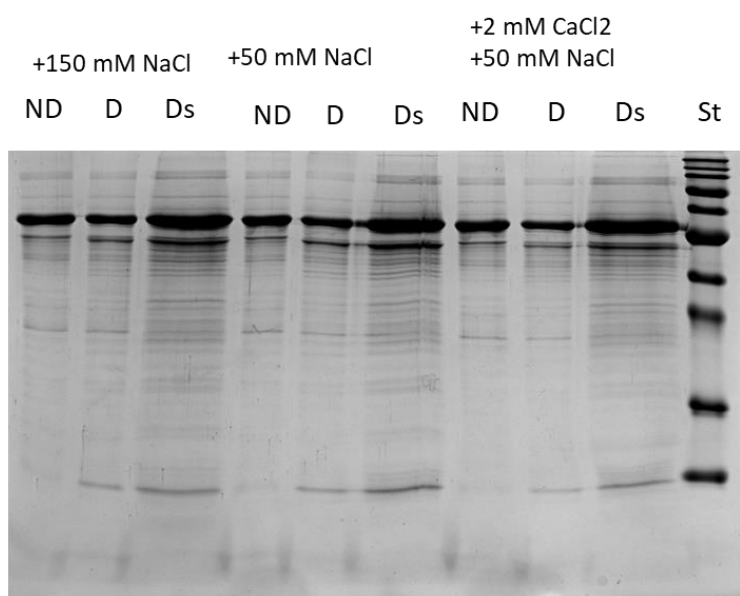


Fig.28. Analisi della digestione in piccola scala di Iso7 in diverse condizioni di reazione. A sinistra 5 µl di standard di

PM Biorad.

Nel gel SDS-PAGE al 15% sono stati caricati 3 µl del campione non digerito (ND), 3 µl del campione digerito (D), e 12 µl del supernatante (Ds) della miscela di reazione centrifugata a 12,000 xg per 15 minuti.

Per affrontare il recupero della proteina ricombinante dopo il taglio è stata effettuata una digestione in media scala con la rec-EK di iso7; è stata quindi

ottenuta la proteina in presenza di: 20 mM HEPES pH 7.8, 150 mM NaCl e 5% glicerolo, utilizzando 10 U di enzima per mg di proteina di fusione con incubazione a 22°C o.n.

Al termine della digestione è stato aggiunto 1 mM AEBSF per inattivare irreversibilmente rec-EK.

In queste condizioni il grado di digestione varia per le diverse isoforme dal 50% al 90%. Aumentando la quantità di enzima e/o il tempo di incubazione le isoforme digerite al 50% possono essere digerite quasi totalmente. Nel caso specifico MBP-iso7 viene digerita almeno al 50%; il controllo di digestione effettuato dopo 6 ore, ha mostrato il 30% di taglio (**Fig. 29** sinistra). Al termine dell'incubazione, di circa 18 ore, e dopo aver prelevato un'aliquota del digerito (Dc), la miscela di digestione è stata concentrata mediante un apparato di ultrafiltrazione con una membrana selettiva per le proteine con peso molecolare maggiore di 30 kDa.

In questo caso la proteina ricombinante iso7 può essere recuperata dall'eluato, successivamente concentrato sul dispositivo da 3 kDa. Questo approccio usato in precedenza ha però mostrato una bassa percentuale di recupero, quindi sono stati allestiti diversi controlli per valutare attentamente se il recupero fosse condizionato dalla precipitazione delle CXCL12 dopo il rilascio del partner di fusione (**Fig. 29** destra).

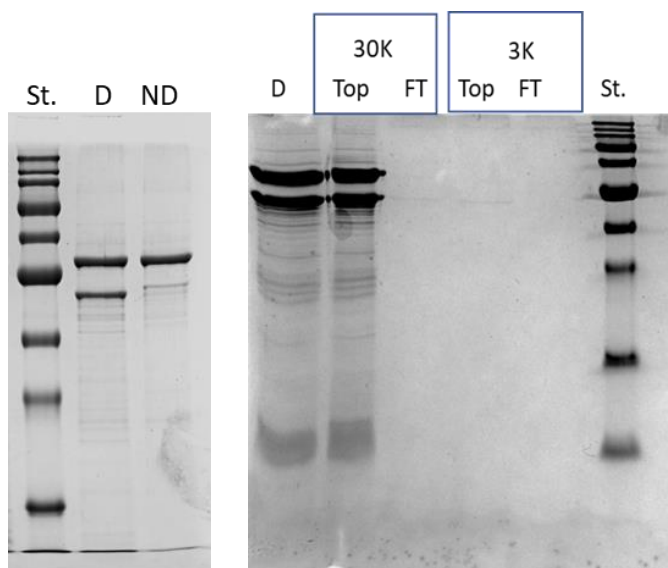


Fig. 29. Recupero dell'isoforma CXCL12-Iso7 dopo il taglio del TAG. 5 μ l di standard di PM Biorad.

Analisi dei gel SDS-PAGE al 15% mostrati in figura: a sinistra sono stati caricati 2 μ l di miscela di digestione prima dell'aggiunta di rec-EK (ND) e 2 μ l prelevati dopo 6 ore d'incubazione a 22°C (D); a destra sono stati caricati 4 μ l della miscela di digestione dopo 18 ore di incubazione a 22°C, 4 μ l della miscela di digestione concentrata (normalizzata sul volume iniziale), 4 μ l dell'eluato del concentratore 30K e a seguire 4 μ l del materiale concentrato (normalizzato sul volume iniziale) con l'apparato da 3K e 4 μ l dell'ultrafiltrato 3K.

Dal gel di destra mostrato in **Fig. 29** risulta chiaro che CXCL12 iso7 nelle nuove condizioni di taglio può essere liberata dal TAG: il taglio ha un'efficienza di circa il 50% che può essere facilmente migliorata aumentando la quantità di rec-EK, ma il recupero rapido con l'ultrafiltrazione

non è possibile, in quanto, anche se staccata dal Tag, la proteina viene comunque trattenuta dalla membrana selettiva per 30 kDa.

Il fenomeno non sembra correlato alla precipitazione perché fra i campioni D e il Top del 30 K non si osservano differenze. Quindi è probabile che nonostante sia tagliata dal partner di fusione la proteina d'interesse continui ad interagire con esso.

Attualmente sono in corso esperimenti per valutare delle possibili alternative per il recupero delle isoforme di CXCL12 dopo il taglio.

5. *Conclusion*

Il lavoro di tesi presentato ha permesso di ottenere delle informazioni interessanti riguardanti l'espressione in *E. coli* e la purificazione della proteina ricombinante CXCL12.

Il primo approccio ha previsto l'utilizzo del vettore p7-EK: l'espressione è stata testata in ceppo di *E. coli* BL21(DE3) ed è stato osservato (in particolare per la isoforma γ) la formazione dei tipici corpi di inclusione; nello specifico la perdita del prodotto in fase di centrifugazione del lisato grezzo è stata dedotta l'analisi dei campioni rappresentativi delle frazioni di LTs e LTp, i quali hanno mostrato appunto un accumulo totale del prodotto ricombinante a livello del pellet. In letteratura sono riportati diversi protocolli di purificazione per CXCL12 ricombinante a partire dal trattamento dei corpi di inclusione, la maggior parte di questi lavori tuttavia non ha mostrato delle buone rese, soprattutto in termini di quantità di prodotto ottenuto.

Per questo motivo una prima considerazione è stata fatta sul vettore, in particolare, per evitare il problema dell'insolubilità si è optato per l'utilizzo di un altro vettore di espressione, p9-EK, il quale permette la produzione della proteina ricombinante come prodotto di fusione con la MBP: codificata a monte del gene di interesse, può essere utilizzata sia come tag per la purificazione, che come partner di fusione per aumentare la solubilità del

prodotto stesso. Quindi l'uso di p9-EK ha consentito di ottenere un prodotto di fusione solubile (proteina ricombinante in soluzione), anche se una piccola percentuale continua a ritrovarsi nel pellet, probabilmente ciò potrebbe derivare dalla tendenza intrinseca di questa chemochina all'aggregazione, riportata in letteratura.

Un'ulteriore considerazione è stata fatta sulla scelta del sistema di espressione, e quindi sulla combinazione ospite-vettore più adatta. È importante capire che non esiste un protocollo univoco per la produzione eterologa di proteine ricombinanti per cui è necessario effettuare delle prove per trovare le condizioni più adatte, variando ad esempio il ceppo ospite.

In questo caso è stata valutata l'espressione in tre diversi ceppi di *E. coli*: *BL21 (DE3) pLysS*, *C41 (DE3)* e *Rosetta (DE3)*; sono ceppi ingegnerizzati appositamente progettati per la produzione di proteine ricombinanti eterologhe. Da prove preliminari di espressione (inducibile) si è concluso che il ceppo *BL21(DE3) pLysS* non è il più adatto all'espressione della proteina ricombinante, ciò può dipendere da diversi fattori, ad esempio le isoforme espresse in minor quantità potrebbero essere tossiche per le cellule, tuttavia non è stato osservato un calo nella crescita.

Per questo motivo si è deciso di utilizzare i due ceppi alternativi, *C41 (DE3)* e *Rosetta (DE3)*, più resistenti nei confronti di alte concentrazioni di proteina tossica.

Nello specifico, in questo lavoro, è stata testata l'espressione di due isoforme di CXCL12: l'isoforma α e l'isoforma 7. Per prima cosa è stata valutata l'espressione inducibile con 0,2mM IPTG, successivamente si è approcciata la purificazione mediante cromatografia di affinità in Ni-IDA; in basso vengono riportate delle tabelle riassuntive relative alle rese di purificazione nei due ceppi, utili per il confronto.

1.

MBP-ISO7 in <i>C41(DE3)</i>	RECUPERO SUL TOTALE	SOLUBILITÀ	RECUPERO NI-IDA	UNB	PUREZZA
LT	80 mg	100%			
LTp	8 mg	10%	10%		
LTs	72 mg*	90%	90%		
Loading Ni-IDA	36 mg			50%*	
UNB	<u>36 mg</u>			<u>50%*</u>	
pAffinity	16 mg	20%		45%	90%

2.

MBP-ISO7 in <i>Rosetta(DE3)</i>	RECUPERO SUL TOTALE	SOLUBILITÀ	RECUPERO NI-IDA	UNB	PUREZZA
LT	96 mg	100%			
LTp	9,6 mg	10%	10%		

LTs	86,4 mg*	90%	90%	
Loading NI- IDA	26 mg	30 %		30%*
UNB	<u>60.5</u> <u>mg</u>			<u>70%*</u>
pAffinity	11,25 mg	12%		43%
				85%

Tabelle 1-2. Riepilogo delle rese di purificazione da cromatografia Ni-IDA per MBP-Iso7 in C41 (DE3) e Rosetta (DE3).

I valori di recupero dalla cromatografia di affinità e il grado di purezza del campione estratto dalle cellule *C41 (DE3)* sono accettabili se non consideriamo la perdita del 50% nel materiale non legato.

In *Rosetta* a quanto pare questo valore peggiora (50% di recupero per *C41* contro il 30% per *Rosetta*), per cui il miglior ospite per la produzione e purificazione di MBP-iso7 CXCL12 sembra essere il ceppo di *E. coli C41 (DE3)*.

Paragonando MBP- α in *C41(DE3)* purificata con iso7 in *C41 (DE3)* si osserva che la % solubile della proteina di fusione per α si riduce di circa il 30%, questo fenomeno è confermato anche nel ceppo *Rosetta (DE3)*. Inoltre, come descritto nei risultati usando lo stesso protocollo di Iso7, nonostante nel lavaggio a 50mM Imidazolo si eluisce una discreta quantità di MBP, quest'ultima è molto rappresentata anche nell'eluato compromettendo il grado di purificazione.

3.

MBP-Alfa in C41(DE3)		RECUPERO SUL TOTALE	SOLUBILITÀ	RECUPERO NI-IDA	UNB	PUREZZA
LT	50 mg	100%				
LTp	20 mg	40%	40%			
LTs	30 mg	60%	60%			
Loading NI- IDA	20 mg			66%*		
UNB	<u>10 mg</u>				<u>33%*</u>	
pAffinity	16 mg	32%		80%		66%

Tabella 3. Riepilogo delle rese di purificazione da cromatografia Ni-IDA per MBP- α in C41 (DE3).

Considerata la notevole quantità di proteina presente nel materiale non legato, l'aggiunta di un ulteriore step di purificazione ha permesso di ottenere per MBP- α un grado di purezza e un recupero paragonabili a quelli di iso7.

Come riportato nei risultati, è stato effettuato il trattamento del materiale non legato per tentare di ottenere un prodotto più puro.

4.

MBP-Alfa in Rosetta(DE3)		RECUPERO SUL TOTALE	SOLUBILITÀ	RECUPERO NI-IDA	UNB	PUREZZA
LT	50 mg	100%				
LTp	12 mg	25%	25%			
LTs	38 mg*	75%	75%			

Loading NI-IDA 1st	11 mg			30%
UNB	<u>27</u> <u>mg*</u>			<u>70%*</u>
pAffinity 1	16 mg	32%	80%	66%

5.

MBP-Alfa in Rosetta(DE3) - UNBOUND		RECUPERO SUL TOTALE	RECUPERO NI-IDA	PUREZZA
Loading NI-IDA 2nd	27 mg			
pAffinity 2	15 mg*	30%	56%*	85%

Tabelle 4-5. Riepilogo delle rese di purificazione da cromatografie Ni-IDA per MBP- α in Rosetta (DE3).

In conclusione, dall'utilizzo del medesimo protocollo di purificazione per le due isoforme, si osserva che per l'isoforma 7 si hanno buoni risultati, sia per quanto riguarda il recupero in resina Ni-IDA sia per il grado di purezza raggiunto che si avvicina al 90%: considerando i due ceppi, sia per *C41 (DE3)* che per *Rosetta (DE3)*, si ottengono ottimi risultati, in particolare *C41 (DE3)* si dimostra essere l'ospite più adatto; queste considerazioni vengono fatte nonostante il rilevante quantitativo di materiale non legato in resina, per cui sarebbero da approfondire e migliorare ulteriormente le condizioni di purificazione, ad esempio agendo sulle soluzioni tampone utilizzate (aggiustamento di pH ecc.).

Per l'isoforma α invece i risultati sono leggermente diversi in quanto vi è la necessità di effettuare un nuovo processo cromatografico a partire dal materiale non legato, durante la prima fase (UNB), per ottenere il prodotto con un grado di purezza accettabile.

I dati riportati sono comunque da confermare mediante ulteriori prove sperimentali e modifica delle condizioni di purificazione, necessario nel caso in cui si voglia procedere con la formulazione di un protocollo. Inoltre dalle prove effettuate si osserva che le isoforme di CXCL12 ricombinante si comportano in maniera diversa l'una dall'altra, quindi vi sarebbe la necessità di redigere dei protocolli specifici per ognuna e poter quindi avere delle buone rese sia quantitative che di purezza, essenziali per la successiva messa a punto di studi di funzionalità.

Dopo i primi approcci al taglio del Tag con l'enterochinasi ricombinate è stato necessario mettere a punto le condizioni di reazione in funzione della solubilità dei nostri prodotti di fusione. Al momento restano da definire le quantità di enzima necessarie per ottenere la digestione totale per ogni isoforma, che verranno affrontate appena chiarite le modalità di recupero delle CXCL12 dopo il taglio.

Le ipotesi prese in considerazione per il recupero sono:

A) Ultrafiltrazione diretta

1) miscela di digestione direttamente sull'apparato di ultrafiltrazione da 30 K (trattiene la His-MBP e molto probabilmente la rec-EK (da verificare) e lascia passare nell'eluato CXCL12)

2) l'eluato del 30 K con o senza aggiunta di BSA (conc. finale 0,1 mg/ml) deve poi essere concentrato sull'apparato da 3K

3) Preparazione finale in: 20 mM Hepes pH 7,8; 150 mM NaCl; 5% glicerolo

4) Dializzare contro PBS sterile

B) Affinità per sottrazione Ni-IDA su filter plate (per mantenere i campioni concentrati)

1) digerito incubato con NI-IDA (la sola His-MBP rimane legata)

2) Il materiale non legato (CXCL12) verrà concentrato per ultrafiltrazione (in genere una piccola percentuale di materiale non digerito potrebbe comunque essere presente).

3) Dializzare contro PBS sterile

C) Affinità per l'eparina su filter plate

1) Digerito incubato con resina HB (SIGMA) (solo CXCL12 tagliata dovrebbe legarsi)

2) Eluizione in presenza di 1,5M NaCl

3) Dializzare contro PBS sterile.

Chiaramente il metodo più rapido per ottenere i prodotti desiderati era l'ultrafiltrazione diretta che abbiamo usato per recuperare le isoforme γ e iso7.

Questo approccio usato in precedenza aveva mostrato però una bassa percentuale di recupero, quindi sono stati allestiti diversi controlli per valutare attentamente se il recupero fosse condizionato dalla precipitazione delle CXCL12 dopo il rilascio del partner di fusione o al binding aspecifico al supporto (dovuto alla bassa concentrazione delle proteine).

In entrambi i casi dopo la digestione di iso7 e γ il materiale residuo presente dopo il primo step di concentrazione sul 30K, 2ml concentrati fino a circa 0,2 ml mostrava che la maggior parte CXCL12 tagliata non attraversava il filtro ed era sotto forma di aggregato solubile. Diversi tentativi di solubilizzazione/dialisi (prendendo spunto dalla letteratura: diminuzione della concentrazione di NaCl, variazione di pH ecc.) non hanno prodotto alcun effetto. Con le isoforme α e β abbiamo valutato anche i due approcci con le resine di affinità.

Per quanto concerne la cromatografia con la Ni-IDA, i risultati ottenuti in parte spiegano le difficoltà nell'utilizzo di questa cromatografia nelle varie purificazioni.

In questo caso è stato osservato che le proteine CXCL12 α e β dopo il taglio, nonostante non abbiano il TAG di istidine, sono in grado di legarsi alla matrice Ni-IDA, non è chiaro se direttamente o perché interagiscono con la

His-MBP (ipotesi che spiegherebbe anche perché il materiale digerito non attraversa il filtro da 30 KDa).

Nel caso della cromatografia con la matrice di eparina l'aggiunta della resina alla miscela di digestione ha dato il risultato atteso, ma solo in parte: il 60% di CXCL12 α tagliata era presente nella frazione non legata come banda molto diffusa e solo il 40 % è eluito con 1,5 M NaCl, come atteso.

Questo risultato è decisamente incoraggiante, perché sottoponendo la miscela di digestione ad uno step di refolding (già messo a punto) si potrebbe ottenere un incremento del binding alla matrice di eparina e molto probabilmente un incremento della solubilità delle CXCL12 senza TAG.

Per quanto concerne le isoforme ϵ e δ che presentano problemi di solubilità dopo il taglio con la rec-EK, un esperimento pilota, condotto sul digerito δ ha permesso di recuperare circa 2-4 μ g di CXCL12 δ , conservato a -20°C in attesa di essere utilizzato per il test biologico. La proteina appare parzialmente ripiegata e potrebbe richiedere uno step di refolding più accurato. Comunque, se questo prodotto risultasse attivo, il protocollo, che prevede uno step di denaturazione potrebbe anche essere utilizzato per le altre isoforme, in alternativa alla cromatografia con eparina. Non si può escludere che aggiungendo lo step di refolding direttamente al digerito di ϵ e δ non si possa recuperare anche queste isoforme senza ricorrere alla denaturazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. T. Veldkamp *et al.*, “Monomeric structure of the cardioprotective chemokine SDF-1/CXCL12,” *Protein Sci.*, vol. 18, no. 7, pp. 1359–1369, 2009.
- [2] A. Righetti, M. Giuliatti, B. Šabanović, G. Occhipinti, G. Principato, and F. Piva, “CXCL12 and Its Isoforms: Different Roles in Pancreatic Cancer?” *J. Oncol.*, vol. 2019, 2019.
- [3] J. W. Murphy, Y. Cho, A. Sachpatzidis, C. Fan, M. E. Hodsdon, and E. Lolis, “Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 α) binding to heparin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 13, pp. 10018–10027, 2007.
- [4] B. Wu *et al.*, “Structures of the CXCR4 chemokine receptor in complex with small molecule and cyclic peptide antagonists,” *Science (80-)*, vol. 330, no. 6007, pp. 1066–1071, 2010.
- [5] B. Marcin Wysoczynska, Riu Liua, Boguslaw Czernya, Janina Ratajczaka, Magda Kuciaa, and Radoslaw B. Maksyma, Maciej Tarnowska, Katarzyna Grymulaa,b, Joanna Tarnowskaa, Mariusz Z. Ratajczaka, “The role of stromal derived factor-1 – cxcr7 axis in development and cancer,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2005.
- [6] Maksym RB¹, Tarnowski M, Grymula K, Tarnowska J, Wysoczynski M, Liu R, Czerny B, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ “The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer”. *Eur J Pharmacol.* 2009;625(1-3):31-40. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.04.071. Epub 2009
- [7] S. Nallamsetty, B. P. Austin, K. J. Penrose, and D. S. Waugh, “Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His 6 - MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of Escherichia coli,” *Protein Sci.*, vol. 14, no. 12, pp. 2964–2971, 2005.
- [8] Y. K. Liang, W. Ping, and L. J. Bian, “Cloning, expression and identification of an isoform of human stromal cell derived factor-1 α ” *Exp. Ther. Med.*, vol. 9, no. 5, pp. 1751–1756, 2015.
- [9] F. A. Marston, “The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli,” *Biochem. J.*, vol. 240, no. 1, pp. 1–12, 1986.

- [10] E. Oberlin *et al.*, “The CXC chemokine, stromal cell derived factor 1 (SDF-1), is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by lymphocyte-tropic HIV-1 syncytium-inducing strains.,” *Nature*, vol. 382, no. August, pp. 833–835, 1996.
- [11] C. Dealwis, E. J. Fernandez, D. A. Thompson, R. J. Simon, M. A. Siani, and E. Lolis, “Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1 α , a potent ligand for the HIV-1 ‘fusin’ coreceptor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 12, pp. 6941–6946, 1998.
- [12] B. A. Teicher and S. P. Fricker, “CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 11, pp. 2927–2931, 2010.
- [13] R. Janssens, S. Struyf, and P. Proost, “Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 44, no. October, pp. 51–68, 2018.
- [14] C. Scheich, V. Sievert, and K. Büssow, “An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography,” *BMC Biotechnol.*, vol. 3, pp. 1–8, 2003.
- [15] K. L. M. C. Franken *et al.*, “Purification of His-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: The benefits from the use of organic solvent,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 18, no. 1, pp. 95–99, 2000.
- [16] H. J. Cho *et al.*, “Maltose binding protein facilitates high-level expression and functional purification of the chemokines RANTES and SDF-1 α from *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 60, no. 1, pp. 37–45, 2008.
- [17] X. Sun *et al.*, “CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 4, pp. 709–722, 2010.
- [18] C. Laguri *et al.*, “The novel CXCL12 γ isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4,” *PLoS One*, vol. 2, no. 10, pp. 1–10, 2007.

- [19] C. T. Veldkamp, "The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin," *Protein Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 1071–1081, 2005.
- [20] M. De La *et al.*, "Differential processing of stromal-derived factor-1 α and stromal-derived factor-1 β explains functional diversity," *Blood*, vol. 103, no. 7, pp. 2452–2459, 2004.
- [21] G. Magistrelli, F. Gueneau, M. Muslmani, U. Ravn, M. Kosco-Vilbois, and N. Fischer, "Chemokines derived from soluble fusion proteins expressed in *Escherichia coli* are biologically active," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 334, no. 2, pp. 370–375, 2005.
- [22] L. Yu *et al.*, "Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1," *Gene*, vol. 374, no. 1–2, pp. 174–179, 2006.
- [23] K. E. Quinn, D. I. Mackie, and K. M. Caron, "Emerging roles of atypical chemokine receptor 3 (ACKR3) in normal development and physiology," *Cytokine*, vol. 109, no. February, pp. 17–23, 2018.
- [24] J. Arnau, C. Lauritzen, G. E. Petersen, and J. Pedersen, "Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins," *Protein Expr. Purif.*, vol. 48, no. 1, pp. 1–13, 2006.