



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Studio in

**Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata**

Classe LM-6 - Biologia

---

**Produzione ricombinante della proteina ACE2 per la rilevazione  
di SARS-CoV-2 nella sensoristica**

---

**Recombinant production of ACE2 protein for the SARS-CoV-2  
detection by sensor**

**Candidato:**  
Marco Palombini

**Relatore:**  
Paolo Mariani

**Correlatore:**  
Lucia Silvestrini

Anno Accademico 2020-2021

# Indice

<b>1. Scopo della tesi</b>	<b>1</b>
<b>2. Introduzione</b>	<b>3</b>
2.1 Il virus SARS-CoV-2 e il recettore ACE2	3
2.2 Metodi per il rilevamento di SARS-CoV-2	10
<b>3. Materiali e Metodi</b>	<b>14</b>
3.1 Produzione della proteina ricombinante ACE2f	14
3.1.1 Cellule BL21 .....	14
3.1.2 Vettore di espressione.....	14
3.1.3 Terreno di coltura .....	15
3.1.4 Trasformazione batterica.....	16
3.1.5 Colture cellulari.....	17
3.1.6 Espressione proteica ricombinante.....	18
3.1.7 Estrazione.....	18
3.1.8 Purificazione.....	19
3.1.9 SDS-PAGE .....	21
3.1.10 Western blot.....	25
3.1.11 FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography .....	27
3.1.12 Dialisi .....	27
3.1.13 Quantificazione della proteina .....	28
3.2 Potenziali Sensori (PS)	29
3.2.1 Libreria di tamponi.....	29

3.2.2 Soluzioni contenenti ACE2f, Spike e VLP di SARS-CoV-2..	29
3.2.3 Test con SARS-CoV-2.....	30
3.2.4 Valutazione del deposito di spore fungine e di VLP su PS .....	31
3.2.5 Microscopia elettronica .....	31
<b>4. Risultati</b>	<b>32</b>
4.1 Produzione della proteina ricombinante ACE2f	32
4.1.1 Espressione ricombinante del minimo frammento di ACE2 capace di interagire con Spike.....	32
4.1.2 Valutazione dell'espressione di ACE2f tramite SDS-PAGE e Western Blot.....	33
4.1.3 Dialisi e Mantenimento della proteina ricombinante nel tempo	36
4.2 Ottenimento di un PS per la rilevazione di SARS-CoV-2	40
4.2.1 Valutazione di interazioni tra le soluzioni tampone e i PS .....	40
4.2.2 Valutazione del legame tra ACE2f e i PS .....	41
4.2.3 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e le VLP di SARS-CoV-2 .....	42
4.2.4 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e il RBD della proteina Spike di SARS-CoV-2.....	44
4.2.5 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e la Spike di SARS-CoV-2 .....	45
4.2.6 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e SARS-CoV-2 .....	47
4.2.6.1 Risultati .....	47
4.2.7 Valutazione dell'utilizzo dei PS per il rilevamento di spore e lieviti .....	56
<b>5. Discussione</b>	<b>62</b>
5.1 Produzione della proteina ricombinante ACE2f	62
5.2 Potenziali Sensori (PS)	63

<b>6. Conclusione</b>	<b>66</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>67</b>



# 1. Scopo della tesi

Questo progetto sperimentale nasce grazie alla collaborazione tra l'azienda DG for life, azienda leader nel campo degli ologrammi applicati a fini di protezione dalla contraffazione di documenti di identità, banconote, documenti di viaggio ecc e l'Università Politecnica delle Marche. La collaborazione nasce con l'obiettivo di sviluppare un sensore colorimetrico a risposta rapida per il SARS-CoV-2 potenzialmente utilizzabile, con le dovute modifiche, come piattaforma anche per altre macromolecole. Il potenziale sensore (PS) che si è cercato di sviluppare basa il suo funzionamento nel cambio colorimetrico che dovrebbe avvenire al deposito di un campione salivare contenente il SARS-CoV-2. La superficie del sensore, doverosamente funzionalizzata con ACE2f, ossia il dominio di interazione del recettore della proteina spike di SARS-CoV-2, lega la particella virale e tramite un fenomeno fisico dovuto ad una proprietà intrinseca del materiale del PS, non descritto in questa tesi per motivi di confidenzialità industriale, fa avvenire il viraggio di colore. Il lavoro di tesi di conseguenza è stato suddiviso in due parti sperimentali complementari, finalizzate a (i) produrre e purificare la proteina

ricombinante ACE2f e (ii) la valutazione e selezione di materiali da utilizzare per ottenere un PS con possibilità future di commercializzazione.

## 2. Introduzione

### 2.1 Il virus SARS-CoV-2 e il recettore ACE2

Il virus SARS-CoV-2, acronimo per “severe acute respiratory syndrome coronavirus 2”, è il virus responsabile della pandemia in atto da marzo 2020, è un virus che si manifesta con un ampio spettro sintomatologico spesso correlato a malattie pregresse e all’età del contagiato. In alcuni soggetti può decorrere in modo asintomatico, a volte si manifesta semplicemente come un’influenza e altre volte provoca la morte del soggetto infetto principalmente dovuta ad una forte polmonite interstiziale. È ormai denominato dalla maggior parte delle persone COVID-19, acronimo ufficiale per “CoronaVirus Disease 19”. A novembre 2021 si stima che circa 250 milioni di persone siano entrate in contatto con il virus, di questi i decessi confermati sono stati 5 milioni, si pensa comunque che questi numeri non rappresentino del tutto la quantità reale dei casi a causa dello scadente o quasi nullo controllo epidemiologico in alcuni paesi [1, 2].

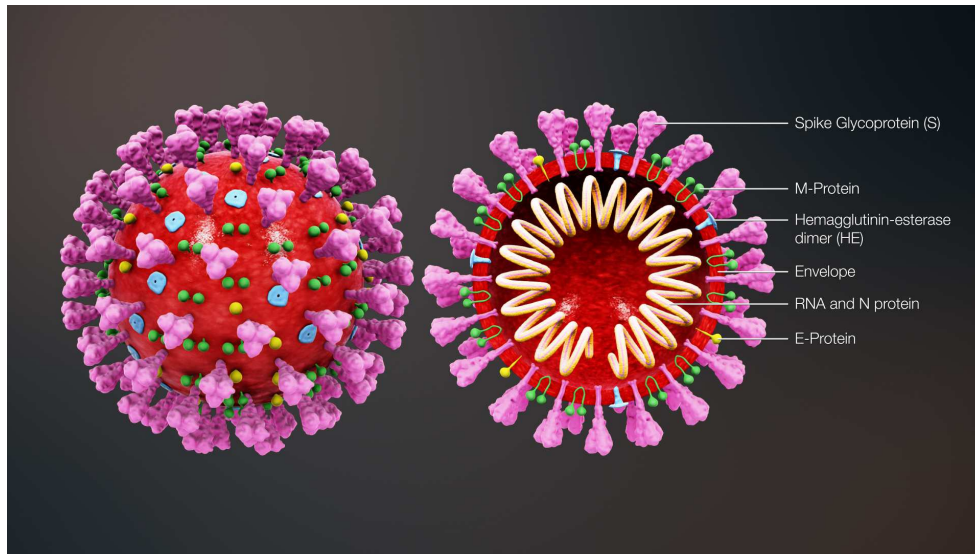
SARS-CoV-2 è un virus che fa parte della famiglia *Coronaviridae*, genere *betacoronavirus*, sottogenere *Sarbecovirus*. La famiglia dei Coronavirus

comprende oltre al SARS-CoV-2 anche i ben noti virus che causano la MERS e la SARS oltre che quelli responsabili della semplice influenza [3].

Analisi filogenetiche di genomi di coronavirus hanno mostrato come il genoma più simile e filogeneticamente vicino al SARS-CoV-2 sia quello del virus che infetta i pipistrelli (RaTG13), con cui condivide il 93,1% della sequenza della proteina spike [4].

Il SARS-CoV-2 è un virus ad RNA (+), il quale codifica per 29 proteine, 4 delle quali sono proteine strutturali: la spike (S), la proteina di membrana (M), la proteina dell' envelope (E) e quella del nucleocapside (N) [5, 6].

La proteina S, in forma omotrimerica, ha un peso molecolare di 438.26 kDa e lega il recettore ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2). Osservando dall'esterno dell' envelope, la porzione più sporgente S1 della proteina S contiene il dominio RBD (Receptor Binding Domain) utilizzata dal virus per legarsi al recettore cellulare ACE2. Una seconda porzione, denominata S2, guida la fusione del virus con la cellula ospite. Infine, la proteina S presenta una porzione transmembrana che connette la porzione extracellulare della spike al virus.



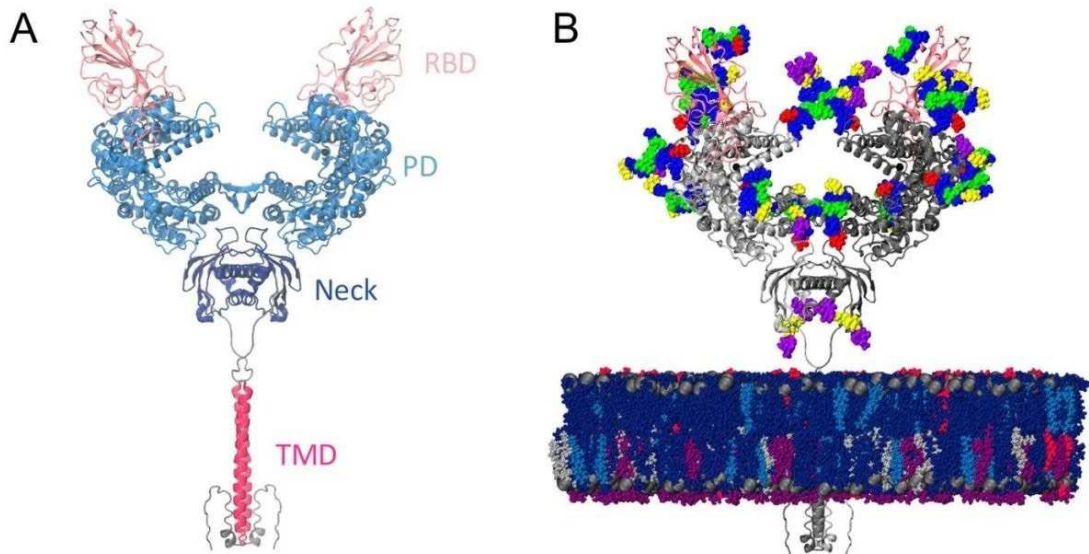
**Figura 2.1.** In questa figura sono indicati alcuni dei principali elementi costituenti il SARS-CoV-2, quali per esempio le principali proteine strutturali e l'RNA virale [7]

Tutta la porzione extracellulare è fortemente glicosilata, infatti la porzione RBD (Receptor Binding Domain) è coperta da catene di zucchero utili a mascherare il virus dal sistema immunitario dell'ospite [8].

Il recettore ACE2 è situato sulle superfici cellulari di molti organi, quali polmoni, cuore, reni e intestino [8].

ACE2 è una glicoproteina transmembrana di 805 amminoacidi, dove i primi 17 costituiscono il peptide segnale, la sequenza canonica di ACE2 è stata identificata nell'isoforma 1, nella sua interezza possiede un peso molecolari pari a 92 kDa, la proteina matura, senza segnale di membrana, ha un peso inferiore pari a 76 kDa. È un enzima costituito da più subunità, infatti è un etero pentamero con un dominio catalitico extracellulare e dal punto di vista

macroscopico è una proteina che può essere suddivisa in tre porzioni, come indicato in Figura 2.2:



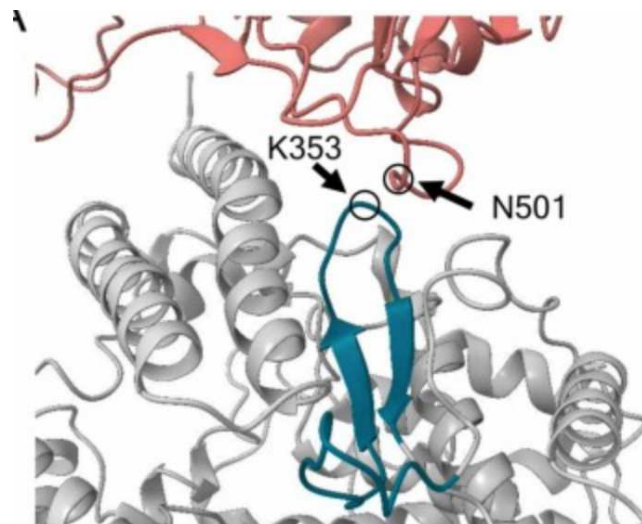
**Figura 2.2.** (A) Struttura completa di ACE2; RBD identifica il receptor binding domain della proteina spike; TMD, transmembrane domain; PD, protein domain. (B) ACE2 con evidenziati i diversi siti di glicosilazione e con il TMD che attraversa la membrana [9]

La sequenza amminoacidica di ACE2 è la seguente:

>sp|Q9BYF1|1-805

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNM  
NNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMS  
TIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVVGKQLRPLYEEYVVL  
KNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKL  
MNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKE  
AEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRIILMCTKVTMDDFLTA  
HHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIIGLLSPDFQEDNET  
EINFLKQALTIIVGTLPFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDET  
YCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEAALCQAAKHEGPI LHKCDISNSTEAGQKLFNML  
RLGKSEPWTALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDNKNSFVGVSTDWSPYADQSIKV  
RISLKSALGDKAYEWNDEMFLFRSSVAYAMRQYFLKVNQMI LFGEDVRVANLKPRI SFN  
FFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPNNQPPVSIWLI  
VFGVVMGVIVVGIVILIFTGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF

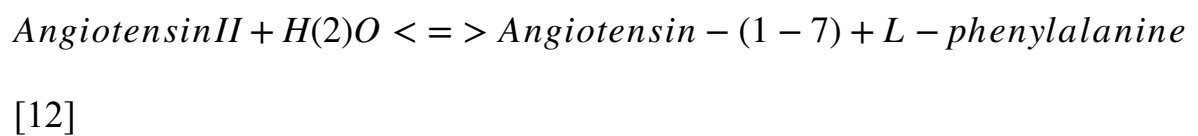
**Figura 2.3.** In figura è rappresentata la sequenza amminoacidica di ACE2. Si ha il peptide segnale (giallo), il dominio extracellulare (nero), la porzione transmembrana con la funzione di ancorare ACE2 alla membrana cellulare (verde) e la porzione citoplasmatica (blu). L'interazione tra l'RBD e ACE2 avviene nella regione evidenziata in grigio e mostrata più nel dettaglio nella Figura 2.4 [11].



**Figura 2.4.** Nell'immagine è raffigurato il complesso tra il RBD di SARS-CoV-2 (in rosa) e ACE2. È possibile osservare i due foglietti  $\beta$  antiparalleli presenti nel dominio di legame tra ACE2 e il RBM [10]

ACE2 possiede siti di legame per 2 cofattori, lo ione zinco e lo ione cloruro. I residui 374, 378 e 402 legano lo ione zinco mentre i residui 169, 477 e 481 legano lo ione cloruro. È anche possibile osservare tre legami disolfuro intracatena e sette residui glicosilati (53, 90, 103, 322, 432, 546, 690) [11].

ACE2 appartiene alla classe enzimatica delle idrolasi, più nello specifico può essere inserita nella categoria delle carbossipeptidasi, catalizza la reazione:



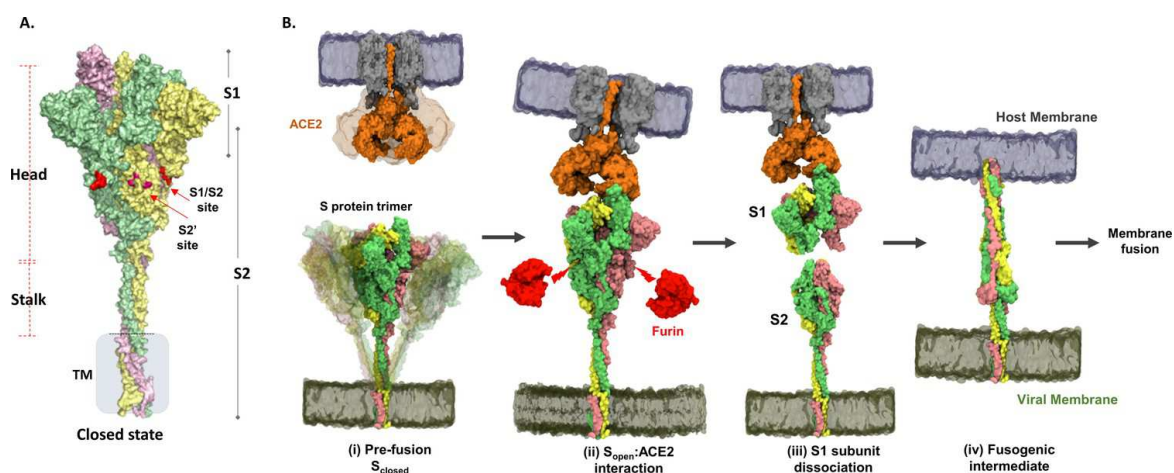
Questa è una reazione chiave nel sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), un complesso ormonale che ha la funzione di regolare la omeostasi cardiovascolare. In questo processo metabolico si ha la trasformazione dell'angiotensinogeno, una proteina prodotta nel fegato, in angiotensina 1 grazie all'azione della renina, un'idrolasi prodotta dalle cellule iuxtaglomerulari del rene. L'angiotensina 1 è un ormone peptidico che stimola la vasocostrizione, viene a sua volta tramutata in angiotensina 2 tramite l'enzima ACE, come ACE2 consiste in una carbossipeptidasi con il ruolo di rimuovere due residui al C-terminale.

A questo punto ACE2 catalizza la reazione elencata in precedenza nella quale si ottiene come metabolita l'angiotensina-(1-7) partendo dall'angiotensina 2 [13, 14].



La struttura del complesso Spike-RBD + dominio N-terminale di ACE2 è stata risolta mediante cristallografia a raggi X, è risultato che l'RBD di spike possiede cinque foglietti  $\beta$  antiparalleli, tra due dei quali vi è una porzione estesa costituita da  $\alpha$  eliche e loops denominata RBM. È stata osservata l'interazione tra la porzione RBM della spike di SARS-CoV-2 e il dominio N-terminale di ACE2 dimostrando che la modalità di legame ACE2 + SARS-CoV-2 è molto simile a quella ACE2 + SARS-CoV [15].

Il legame tra il recettore e il ligando dà inizio al ciclo replicativo di SARS-CoV-2 all'interno dell'ospite. Inizialmente la porzione N-terminale di S1 si lega ad una tasca di ACE2 di forma lobata, successivamente interviene una proteasi transmembrana, la serina proteasi 2 (TMPRSS2) che taglia tra l'unità S1 e S2 della proteina S con l'aiuto della furina, un'idrolasi che catalizza il taglio tra amminoacidi e partecipa alla produzione di proteine mature a partire dai precursori. TMPRSS2 partecipa anche al taglio di ACE2, inducendo un cambiamento conformazionale di S2 fondamentale per la fusione tra la membrana virale e quella cellulare (Figura 3) [13, 15].



**Figura 3.** (A) Proteina S con i monomeri mostrati in giallo, verde e rosa. (B) Schema della fusione tra la spike virale e il recettore ACE2 della cellula ospite, è possibile osservare il ruolo della furina nel processo proteolitico della proteina S [16]

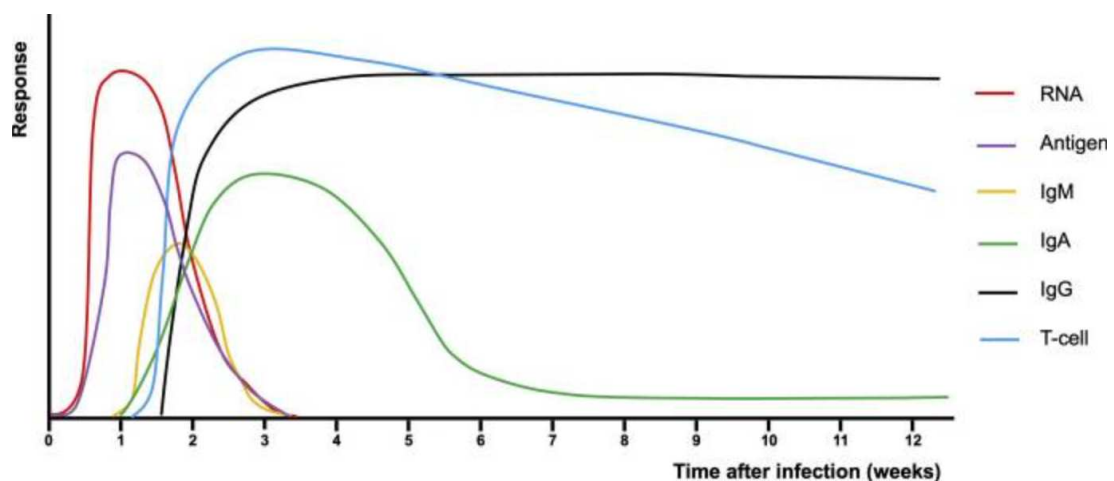
## 2.2 Metodi per il rilevamento di SARS-CoV-2

Ad oggi i metodi di diagnosi per individuare la presenza diretta o indiretta del virus o di infezione e guarigione in un individuo possono suddividersi in metodi molecolari, sierologici, immunologici ed antigenici [17].

Tipico esempio di diagnosi molecolare è la real time RT-PCR, questa permette di individuare una sequenza specifica del genoma virale e, se presente nel campione analizzato, emettere un segnale luminoso doverosamente quantificato. I geni ricercati nella diagnosi molecolare dipendono dall'azienda produttrice dei kit, ad esempio i geni N, S, E o nelle zone ORF1ab e ORF8. Le diagnosi immunologiche, sierologiche e antigeniche invece basano il loro funzionamento sulla quantificazione di anticorpi o l'individuazione di anticorpi tramite anti-Ab e di antigeni utilizzando come campioni di partenza

generalmente siero, plasma, sangue o, in modo simile a come avviene nell'analisi molecolare, muco nasale, materiale nasofaringeo o orofaringeo raccolto tramite tampone [17].

I metodi di diagnosi immunologici sfruttano la risposta umorale dell'organismo per osservare se presenti anticorpi IgM o IgG contro gli antigeni virali. Le prime ad apparire sono le immunoglobuline IgM, caratterizzate da un'emivita molto breve. Al contrario le IgG si manifestano e sono rintracciabili dai 7 ai 14 giorni successivi dalla prima manifestazione dei sintomi e il loro titolo anticorpale rimane stabile per almeno i 4-6 mesi successivi. Ad oggi risulta che il 5% dei sintomatici e tra il 15% e il 40% degli asintomatici risultano negativi per il titolo anticorpale [17].



**Figura 4.** Insorgenza ed emivita dei fattori umorali e cellulari dell'organismo [17]

Tra gli anticorpi prodotti vi sono anche dei particolari anticorpi chiamati “neutralizzanti”, questi vengono prodotti in risposta all’azione altamente immunogenica del dominio RBD della spike nel SARS-CoV-2 [19].

Gli anticorpi possono ostacolare la fusione del virus con ACE2 in particolare in due modi:

- impediscono il legame della subunità S1 con il recettore presente nelle cellule bersaglio
- bloccano il cambio di conformazione della subunità S2 impedendo al virus di proseguire nell’infezione in atto

[20]

Per quantificare il titolo degli anticorpi neutralizzanti per un virus vengono utilizzati i test di neutralizzazione con riduzione delle placche (PRNT) e quello di pseudo-neutralizzazione (sVNT), questi permettono di eseguire un’analisi quantitativa degli anticorpi, il test PRNT in particolare è considerato il gold standard per la quantificazione degli anticorpi neutralizzanti [17].

I test sierologici attualmente utilizzati sono il lateral flow immunoassay (LFIA), l’ELISA e il chemiluminescence immunoassay (CLIA) [17].

Ciò che si ricerca differisce in relazione al saggio utilizzato. Nel caso del lateral flow test si ricercano le IgM, le IgA o le IgG. È un test di facile utilizzo ma spesso si riscontrano risultati qualitativi eterogenei con limitata sensibilità

nella fase acuta della malattia. Con l'ELISA e con CLIA rispetto al saggio precedente si ha una maggiore sensibilità e una risposta quantitativa che permette anche di eseguire una quantificazione anticorpale, oltre che, ovviamente, ottenere una risposta qualitativa.

### **3. Materiali e Metodi**

#### **3.1 Produzione della proteina ricombinante ACE2f**

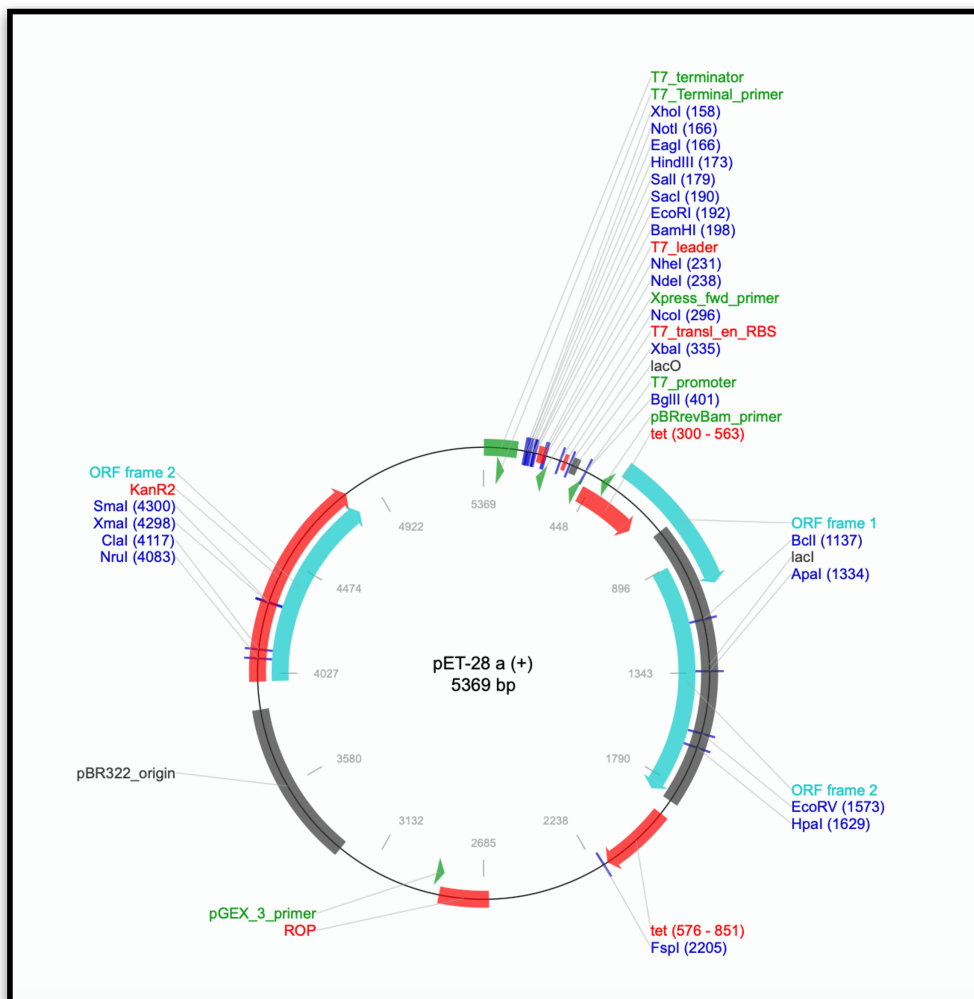
##### **3.1.1 Cellule BL21**

Per la produzione della proteina ricombinante sono state utilizzate cellule di *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pLysS caratterizzate dal seguente genotipo:

*F – , ompT, hsdSB(rB – mB – ), gal, dcm, (DE3), pLysS, (CamR)*

##### **3.1.2 Vettore di espressione**

Il plasmide utilizzato per la produzione ricombinante di ACE2f è ACE2-PET28a(+) (ProteinTech ID: Ag30683). Questo codifica per la porzione extracellulare di ACE2 (30-356) di 40 kDa, la quale si lega alla proteina S del SARS-CoV-2. Il vettore di espressione è stato trasformato in cellule di *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pLysS.



**Figura 3.1.** Plasmide pET-28a(+) utilizzato per la produzione di ACE2f

### 3.1.3 *Terreno di coltura*

Il terreno utilizzato per la crescita di *E. coli* è l'LB, sia in forma liquida che con aggiunta di agar (Tabella 3.1). Il terreno liquido è stato utilizzato per la produzione di ACE2f in *E. coli*, il secondo per l'ottenimento dei cloni di *E. coli* mediante trasformazione batterica con il plasmide in grado di esprimere ACE2f. Gli antibiotici di selezione utilizzati sono il Cloramfenicolo e

Kanamicina, rispettivamente in una concentrazione finale pari a 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di terreno utilizzato.

	1 litro	1 litro
<b>1% Tryptone</b>	10 g	10 g
<b>0.5% Yeast extract</b>	5 g	5 g
<b>1% NaCl</b>	10 g	10 g
<b>1.5% Agar</b>		15 g

**Tabella 3.1.** Composizione dei terreni utilizzati

### 3.1.4 Trasformazione batterica

Il procedimento di trasformazione è avvenuto sotto cappa a flusso laminare dove è stato aggiunto il plasmide alle cellule competenti BL21 (DE3)-pLysS. Mediante shock termico a 42° C per 20 secondi, la creazione di pori transienti sulla membrana di *E.coli* ha permesso l'entrata del plasmide. Successivamente sono stati aggiunti 800  $\mu\text{l}$  di LB liquido ed infine si è messo il tutto ad incubare 1 h a 225 RPM a 37°C. Trascorso il tempo necessario, la biomassa è stata piastrata su LB solido contenente kanamicina e cloramfenicolo. Le piastre sono state poi incubate a 37°C per 16-18 h in un incubatore statico (Shell LAB SL series). Una volta che è avvenuta la crescita microbica queste possono essere mantenute in frigo a 4° C.



### 3.1.5 *Colture cellulari*

I cloni sono stati prelevati e fatti crescere in terreni liquidi di LB con Kanamicina e Cloramfenicolo. La crescita è avvenuta a 37° a 180 RPM nell'incubatore INNOVA 44 della NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC (Figura 3.2). Come conferma per l'avvenuta crescita è stata misurata la densità ottica a 600 nm (OD600) mediante uno spettrofotometro DeNovix DS-11 FX (Figura 3.2).

**A**



**B**



**Figura 3.2.** (A) INNOVA 44, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, (B) DeNovix DS-11 FX

### ***3.1.6 Espressione proteica ricombinante***

Le cellule pre-coltivate sono state inoculate in 1 L di terreno liquido e la crescita a 37 °C è stata monitorata fino al raggiungimento di una OD600 pari a 0.6-0.8. Una volta raggiunta la densità ottica indicata, l'espressione di ACE2f è stata indotta aggiungendo alla coltura liquida Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) 0.5 mM che è stata poi incubata overnight a 20° C, 180 RPM.

### ***3.1.7 Estrazione***

La coltura liquida, lasciata in incubatore overnight, è stata suddivisa in quantità uguali in tubi da 50 ml. La sospensione microbica è stata centrifugata (centrifuga Beckman Coulter) a 4000 RPM per 15 minuti. Così facendo si separa la biomassa dal terreno di coltura. Il terreno è stato rimosso e le cellule sono state sospese nel tampone di lisi (Tabella 3.2) e sonicate. Ciò che si ottiene è stato poi centrifugato ulteriormente a 4000 RPM per 1 ora con il fine di separare l'estratto cellulare dai detriti cellulari.

### Tampone di lisi

Reagente	Concentrazione finale
HEPES pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
$\beta$ -Mercaptoetanololo	1 mM
PMSF	1 mM

**Tabella 3.2.** Tampone utilizzato per sospendere le cellule prima della sonicazione

#### 3.1.8 Purificazione

L'estratto cellulare totale viene sottoposto a cromatografia di affinità, incubandolo overnight con una resina al nichel in un incubatore rotante a 4°C. Passato il tempo necessario a far legare il tag di 6 istidine fuso ad ACE2f alla resina, si prosegue con il versare la soluzione in una colonna da banco. Mentre avviene l'impaccamento della resina, il non-legato (flow through) viene raccolto. La resina viene poi lavata con due tamponi a diversa forza ionica (Tabella 3.3, 3.4), entrambi con lo scopo di eliminare eventuali proteine non legate alla resina. Anche in questo caso si possono raccogliere dei campioni per poi analizzarli mediante l'SDS-PAGE. Infine si raccolgono una o più eluizioni utilizzando il tampone di eluizione (Tabella 3.5).

### Tampone di lavaggio - Wash 1

Reagente	Concentrazione finale
HEPES pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
PMSF	1 mM
Imidazolo	10 mM

**Tabella 3.3.** Composizione del primo tampone utilizzato per eliminare eventuali contaminanti

### Tampone di lavaggio - Wash 2

Reagente	Concentrazione finale
HEPES pH 7.5	50 mM
NaCl	100 mM
PMSF	1 mM
Imidazolo	10 mM

**Tabella 3.4.** Composizione del secondo tampone utilizzato per eliminare eventuali contaminanti

### Tampone di eluizione

Reagente	Concentrazione finale - 50 ml
PBS	A vol. 41 ml
NaCl	150 mM
Imidazolo	300 mM

**Tabella 3.5.** Composizione del tampone utilizzato per raccogliere l'eluato contenente la proteina di nostro interesse

### **3.1.9 SDS-PAGE**

I quattro campioni ottenuti con la cromatografia di affinità (FT, Wash 1, Wash 2 e l'eluizione) sono stati fatti correre in gel SDS-PAGE al 12% la cui composizione è descritta in Tabella 3.6 e in Tabella 3.7. L'obiettivo di questa tecnica analitica è separare le proteine tramite elettroforesi in gel di poliacrilammide sulla base della loro massa molecolare. L'SDS è un forte agente denaturante delle proteine in quanto interferisce con le interazioni idrofobiche intramolecolari. I campioni sono stati preparati miscelando la soluzione proteica con Laemmli Sample buffer 4x (Tabella 3.8), è seguito poi un bagno termostatico a 98° C per 3 minuti per poi caricare il tutto nei pozzetti del gel. La metodologia utilizzata per sostenere i vetrini e di conseguenza i gel è il sistema TETRA SYSTEM. Nella camera da corsa è stato versato il Running buffer (Tabella 3.9) e i campioni sono stati caricati nei pozzetti. Il potenziale applicato è stato di 80 V per 30' e 100 V per circa i 60' successivi. Negli esperimenti sono stati utilizzati due standard: il PM2610 e il peqGOLD marker IV. Conclusa la corsa elettroforetica, il gel viene colorato con il Coomassie stain (Tabella 3.10) e successivamente decolorato con un Destain a base di metanolo (Tabella 3.11). L'immagine dei risultati del SDS-PAGE è stata acquisita mediante transilluminatore ChemiDoc XRS Biorad (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Transilluminatore  
ChemiDoc XRS

**SDS-PAGE - Running gel 12%**

<b>Reagente</b>	<b>Quantità</b>
H <sub>2</sub> O	1.34 ml
Acrilammide 30%	1.64 ml
Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	1 ml
SDS 10%	40 µl
APS 10%	20 µl
TEMED	2 µl
<b>Volume totale</b>	<b>4 ml</b>

**Tabella 3.6.** Composizione del Running gel al 12%

### SDS-PAGE - Stacking gel 4%

Reagente	Quantità
H <sub>2</sub> O	1.50 ml
Acrilammide 30%	350 µl
Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	625 µl
SDS 10%	40 µl
APS 10%	20 µl
TEMED	2 µl
<b>Volume totale</b>	<b>2.5 ml</b>

**Tabella 3.7.** Composizione dello Stacking gel al 4% nel quale si caricheranno i campioni nei pozzetti

### Laemmli Sample buffer 4x

Reagente	Quantità
β-Mercaptoetanolo	0.1%
Bromophenol blue	0.0005%
Glycerol	10%
SDS	2%
Tris-HCl (1 M, pH 6.8)	63 mM - 5%

**Tabella 3.8.** Buffer miscelato con la soluzione contenente la proteina che poi si farà denaturare in bagno termostatico e poi correre in SDS-PAGE

### Running buffer - TGS 10x

Reagente	Quantità - 1 litro
Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
H2O	A vol. ~ 1 litro

**Tabella 3.9.** Composizione del Running buffer utilizzato nel SDS-PAGE

### Coomassie stain

Reagente	Quantità - 1 litro
Metanolo	500 ml
Acido Acetico Glaciale	100 ml
Coomassie Brilliant Blue	1 g
H2O	A vol. ~ 1 litro

**Tabella 3.10.** Composizione del colorante utilizzato per colorare il gel di acrilammide

### Destain

Reagente	Quantità - 1 litro
Metanolo	250 ml
Acido Acetico Glaciale	100 ml
H2O	A vol. ~ 1 litro

**Tabella 3.11.** Composizione del decolorante utilizzato per decolorare il gel di acrilammide



### **3.1.10 Western blot**

La tecnica di western blot è stata applicata per confermare la presenza di ACE2f, è stato utilizzato il kit per western della Bio-Rad. Inizialmente è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel SDS-PAGE su membrana di cellulosa, precedentemente equilibrata nel tampone di trasferimento assieme ai fogli di carta Whatman. Si assembla il tutto a "sandwich" e si inserisce nel Trans-Blot-Turbo, programma Mixed-MV 7 minuti. Avvenuto il trasferimento delle proteine nella membrana si eseguono 3 lavaggi con TBS (Tabella 3.12) ognuno da 2 minuti, successivamente si lascia la membrana in immersione nella Blocking solution (Tabella 3.13) per 1 ora. Passata 1 ora si eseguono altri 3 lavaggi con TBS ognuno da 2 minuti. Infine si tiene la membrana overnight in agitazione a 4° con l'anticorpo primario (6X - His Tag Monoclonal Antibody, Invitrogen). Il giorno successivo si eseguono 3 lavaggi con TBS-T (Tabella 3.14) da 5 minuti per poi mettere in immersione la membrana con la soluzione contenente gli anticorpi secondari per 90 min. Passati 90 min si eseguono 3 lavaggi da 2 minuti l'uno con TBS. Eseguiti i lavaggi, la membrana con le proteine immobilizzate viene trattata con il kit Clarity (Biorad) per il rilevamento del segnale chemiluminescente, dovuto all'interazione tra luminolo e perossidasi. L'immagine della membrana è stata acquisita mediante transilluminatore ChemiDoc XRS (Biorad).

### TBS

Reagente	Quantità
NaCl	137 mM
Tris-HCl	20 mM

**Tabella 3.12.** Soluzione utilizzata per eseguire i lavaggi della membrana

### Blocking solution - TBS-T-BSA

Reagente	Quantità
TBS	Tabella 5.1
BSA	5%
Tween 20	0.1%

**Tabella 3.13.** Soluzione utilizzata per evitare che gli anticorpi si leghino in modo aspecifico

### TBS-T

Reagente	Quantità
TBS	Tabella 5.1
Tween 20	0.1%

**Tabella 3.14.** Soluzione utilizzata per eseguire i lavaggi prima di aggiungere gli anticorpi secondari

### ***3.1.11 FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography***

La FPLC è una tipologia di cromatografia che permette di separare i componenti di una soluzione in base alla loro taglia. La separazione avviene grazie alla diversa affinità di un soluto verso due fasi, la fase liquida e una fase stazionaria. La prima è costituita da una soluzione tampone, la seconda da una fase solida costituita da biglie di resina o agarosio. Nel nostro caso il PBS è il tampone utilizzato per la separazione di ACE2f rispetto al resto dei componenti della soluzione. La proteina è stata separata utilizzando una colonna Sephadex GL 10/300.

### ***3.1.12 Dialisi***

Durante la fase di purificazione di proteine la dialisi può essere utilizzata per modificare il tampone in cui si trova la soluzione proteica di interesse oltre a permettere anche il refolding di proteine denaturate. In questo caso è stata eseguita una dialisi con il fine di scambiare il buffer di eluizione in cui era presente ACE2f , e quindi rimuovere l'imidazolo in esso contenuto, con un tampone di mantenimento (Tabella 3.15). Sono stati utilizzati dei concentratori Amicon Ultra - 4 Ultracel con un cutoff da 30 kDa.

### Tampone di mantenimento - Storage buffer

Reagente

Quantità

Reagente	Quantità
PBS	A vol.
PMSF	1 mM

**Tabella 3.15.** Soluzione tampone utilizzata per mantenere nel tempo ACE2f prodotta

#### *3.1.13 Quantificazione della proteina*

La proteina prodotta è stata quantificata mediante una valutazione spettrofotometrica a 280 nm usando lo spettrofotometro DeNovix DS-11 FX. Per la spettrofotometria è stata saggiata l'assorbanza dei campioni proteici alla lunghezza d'onda 280 nm. Come riferimento è stata utilizzata la quantificazione generica in cui  $1A = 1 \text{ mg/ml}$ . Inizialmente sono stati prelevati 2  $\mu\text{l}$  di soluzione utilizzata per il tampone di mantenimento (PBS 1x pH 7.4, PMSF 1 mM) ed è stata utilizzata per ottenere il "Bianco", successivamente sono stati prelevati 2  $\mu\text{l}$  di soluzione contenente la proteina ACE2f, depositati sul supporto per la misurazione tramite NanoDrop ed è stata letta l'assorbanza per la quantificazione della proteina.

## **3.2 Potenziali Sensori (PS)**

Gli esperimenti test sono stati effettuati su potenziali sensori (PS) applicabili al rilevamento di SARS-CoV-2. Per questioni di segretezza industriale la struttura e le caratteristiche del PS non possono in alcun modo essere descritte in questo lavoro di tesi.

### ***3.2.1 Libreria di tamponi***

Al fine di osservare la risposta del PS alle soluzioni utilizzate, diversi tamponi sono stati testati in modo da valutare eventuali reazioni superficiali. Le varie condizioni di concentrazione e di pH sono state testate arrivando a selezionare quelle più idonee allo scopo del lavoro. Le immagini relative a questa fase rientrano nella proprietà industriale.

### ***3.2.2 Soluzioni contenenti ACE2f, Spike e VLP di SARS-CoV-2***

Una volta selezionate le soluzioni tampone adeguate al PS, sono state testate prima una soluzione proteica e poi una soluzione contenente i capsidi virali di SARS-CoV-2. Il PS è stato funzionalizzato con una porzione di ACE2f (aa 30-356), che si lega al dominio RBD della proteina spike di SARS-CoV-2. I PS funzionalizzati sono stati testati con VLP di SARS-CoV-2. La soluzione nella quale erano mantenute è descritta in Tabella 3.16. Lo stock di partenza

aveva una concentrazione pari a 0.13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e nel corso degli esperimenti le diluizioni sono state preparate in acqua bidistillata dato che la diluizione nel tampone stesso delle VLP creava una patina traslucida sulla superficie del PS. Un ulteriore test è avvenuto con le proteine di SARS-CoV-2 spike-RBD e spike intera (Proteintech) successivamente depositate sui potenziali sensori al fine di evidenziare reazioni rilevabili.

### Soluzione di mantenimento per le VLP

Reagente	Concentrazione
Tris-HCl	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	0.5 mM

**Tabella 3.16.** Composizione del buffer in cui sono mantenute le VLP

### 3.2.3 Test con SARS-CoV-2

I PS sono stati testati applicando anche il virus SARS-CoV-2. Sono state effettuate 4 prove con l'obiettivo di rilevare eventuali risposte del PS alla presenza del virus. Questi esperimenti hanno dato una prima evidenza della sensibilità del PS.

#### ***3.2.4 Valutazione del deposito di spore fungine e di VLP su PS***

Il PS è stato testato anche per il rilevamento di lieviti e spore fungine a diverse concentrazioni

#### ***3.2.5 Microscopia elettronica***

Per confermare il deposito delle cellule fungine e delle VLP sono state acquisite delle immagini mediante microscopia elettronica a scansione SEM PHILIPS XL20.

## 4. Risultati

### 4.1 Produzione della proteina ricombinante ACE2f

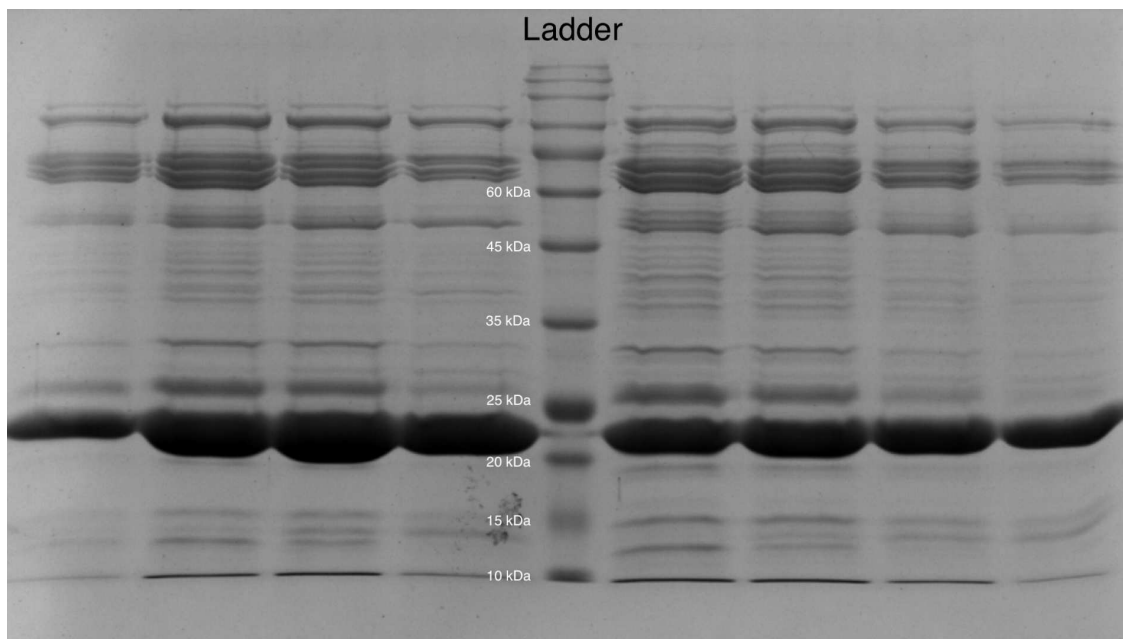
#### 4.1.1 *Espressione ricombinante del minimo frammento di ACE2 capace di interagire con Spike*

Il ceppo di *E. coli* BL21(DE3)pLys è stato trasformato con il plasmide pET28a contenente il frammento di ACE2 (ACE2f, residui 30-356 codificati da BC048094) codificante per la regione interagente con la proteina spike di SARS-CoV-2. I cloni ottenuti sono stati pre-coltivati e inoculati in terreno liquido LB contenente Cloramfenicolo e Kanamicina come antibiotici di selezione. La crescita è avvenuta fino al raggiungimento di una densità ottica OD600 pari a 0.6-0.8. Un volta arrivata a questo valore di crescita, alla coltura è stato aggiunto IPTG 0.5 mM per l'induzione dell'espressione di ACE2 che è avvenuta per ca. 16 h a 20°C. Trascorse le ore necessarie la biomassa è stata raccolta mediante centrifugazione ed è stata mantenuta a -80°C fino alle successive fasi di estrazione delle proteine totali e di purificazione.



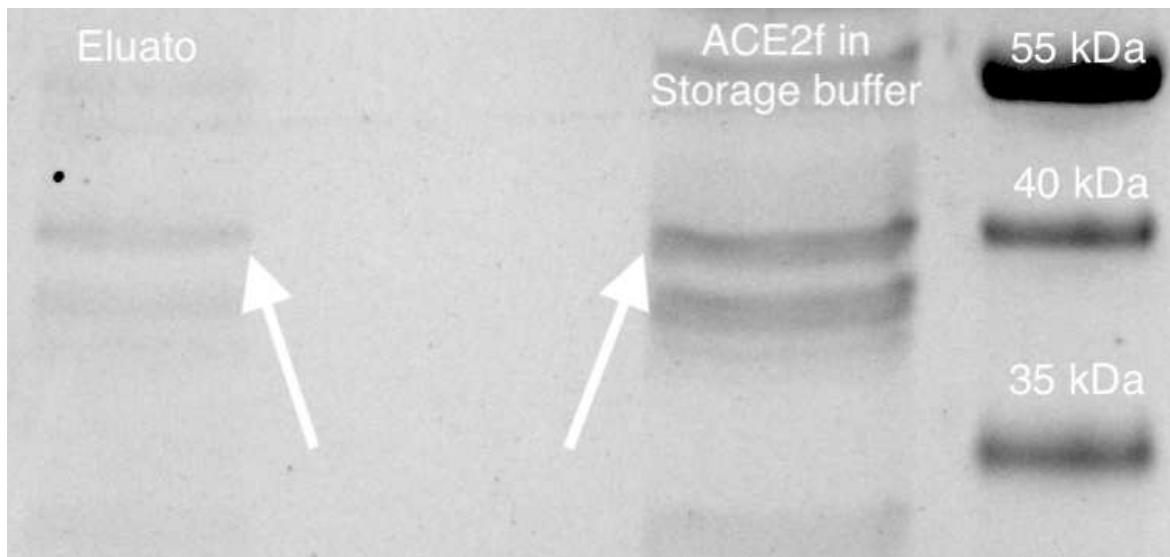
#### 4.1.2 *Valutazione dell'espressione di ACE2f tramite SDS-PAGE e Western Blot*

Eseguita la purificazione di ACE2f tramite cromatografia di affinità è stato verificato se ci fosse, tramite SDS-PAGE, una banda riconducibile ad ACE2f ad un'altezza di ca. 40 kDa. Nei primi esperimenti, nei quali non sono stati utilizzati inibitori delle proteasi ed inoltre i buffer di lavaggio e di eluizione erano a base di Tris-HCl, è possibile osservare come probabilmente una proteasi abbia tagliato ACE2f in due o più porzioni, infatti è possibile notare una banda di 15 kDa e una da 25 kDa, la cui somma tra le due corrisponde proprio al peso della proteina di nostro interesse (Figura 4.1).

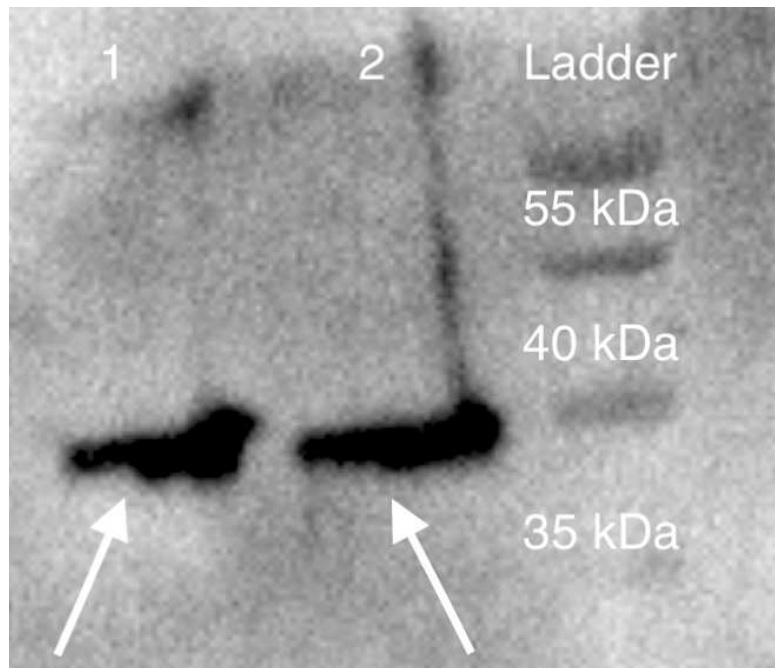


**Figura 4.1.** È possibile osservare in figura gli 8 eluati caricati su gel e le corrispondenti bande proteiche ad altezza non voluta

Nei successivi esperimenti sono state cambiate le composizioni di tutti i tamponi utilizzati, da quello di lisi a quelli di eluizione, utilizzandoli non più a base di Tris-HCl ma a base di PBS. Anche in questo caso risultavano delle bande proteiche sia al di sopra che al di sotto di 40 kDa, questo potrebbe essere riconducibile a proteasi che potrebbero aver degradato ACE2f oltre che a residui proteici contaminanti e a condizioni di purificazione non adeguate. Nei successivi esperimenti è stato utilizzato un tampone di lisi a base HEPES, rispetto agli esperimenti precedenti è stato aggiunto il  $\beta$ -Mercaptoetanololo come agente riducente e il PMSF per inibire le proteasi. Come è possibile osservare dalla Figura 4.2, sia nel campione derivato dall'eluato che in quello trasferito nel buffer di mantenimento, si hanno delle bande riconducibili ad ACE2f oltre che altre bande indesiderate al di sopra e sotto i 40 kDa. Questo'ultimo eluato ed un ulteriore campione prodotto in precedenza seguendo lo stesso protocollo sono stati saggiati mediante Western blot. Il Western blot mostra come ACE2f sia stata effettivamente prodotta (Figura 4.3).



**Figura 4.2.** Nella prima colonna è possibile osservare l'eluato con imidazolo ancora presente, nella seconda colonna invece è stato caricato un campione successivo alla dialisi (ACE2f in tampone di mantenimento)



**Figura 4.3.** Nella prima colonna è possibile osservare ACE2f della Figura 4.2, nella seconda colonna è possibile osservare un'aliquota di ACE2f mantenuta nel tampone di mantenimento a 4 °C per 20 giorni

Avvenuta la conferma dell'espressione di ACE2f, si è proceduto a quantificarla tramite metodi spettrofotometrici. È stato osservato come in media, seguendo il primo protocollo stilato, per una produzione si ottengano 150 ng/ml di proteina desiderata.

#### ***4.1.3 Dialisi e Mantenimento della proteina ricombinante nel tempo***

Successivamente alla produzione della proteina è stata eseguita una prima dialisi mediante l'utilizzo di un concentratore Amicon Ultra - 4 Ultracel con cutoff di membrana da 30 kDa al fine di scambiare il tampone di eluizione con il tampone di mantenimento. Questo ha permesso di eliminare l'imidazolo contenuto nel primo, che nel tempo avrebbe degradato la proteina, e al contempo per mantenere la proteina nel tampone di mantenimento contenente PMSF 1 mM. Nel corso degli esperimenti è stato osservato come l'utilizzo di un inibitore delle proteasi sia necessario ad evitare la degradazione di l'ACE2f. La scelta del tampone di mantenimento definitivo è derivata da una ricerca bibliografica che ha permesso di individuare la composizione di diversi tamponi di mantenimento utilizzati con ACE2, nel nostro caso ne sono stati scelti due da testare con ACE2f (Tabella 4.1). È stato osservato il mantenimento della proteina nel tempo a due diverse temperature, in Tabella 4.2 è possibile osservare il Design of Experiment. I risultati del mantenimento della proteina sono stati ottenuti facendo correre i campioni in

SDS-PAGE. È possibile osservare nella Figura 4.4 come il mantenimento nel tempo di ACE2f sia migliore utilizzando il PBS rispetto al HBS. Il campione testato a 48 giorni è stato al quinto giorno dializzato verso un buffer di mantenimento a base di mannitolo e glicerolo (Tabella 4.3) per poi essere scambiato nuovamente nel buffer di mantenimento a base di PBS descritto in Tabella 4.1. È possibile osservare come quest'ultimo campione si sia conservato nell'immagine acquisita tramite ChemiDoc XRS Biorad (Figura 4.4).

#### Soluzioni di mantenimento

Soluzione	Contenuto
PBS	PBS pH 7.4, PMSF 1 mM
HBS	HEPES pH 7.5, PMSF 1 mM

**Tabella 4.1.** Soluzioni testate per osservare in quale avvenisse meglio il mantenimento di ACE2f

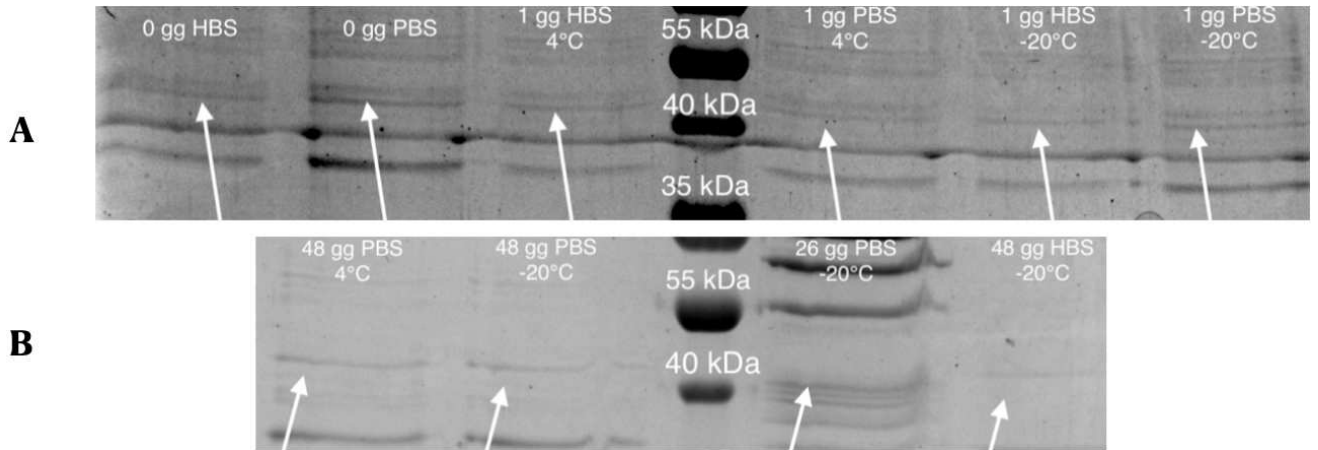
Tempo (Giorni)	Test di mantenimento		Temperatura °C
	PBS	HBS	
0	x	x	/
1	x	x	4, -20
2	x	x	4, -20
5	x		4, -20
12	x		4, -20
15	x		4
19	x		4
20	x		4
26	x		-20
48	x		4, -20

**Tabella 4.2.** Soluzioni testate per osservare in quale avvenisse meglio il mantenimento di ACE2f

### Soluzione di mantenimento a base di zucchero e glicerolo

Reagente	Concentrazione
Mannitolo 5%, Glicerolo 4%	20%
PBS pH 7.4	A vol.

**Tabella 4.3.** Composizione del buffer in cui è stato mantenuto ACE2f per una notte prima di essere scambiato nuovamente in PBS e PMSF 1 mM



**Figura 4.4.** (A) È possibile osservare come ACE2f si mantenga in modo migliore già al primo giorno con il buffer di mantenimento a base PBS. (B) Nelle prime due colonne sono state caricate le aliquote di ACE2f scambiate con il buffer a base di zucchero e glicerolo, nella terza ACE2f a 26 giorni tenuta a -20°C. Nell'ultima colonna ACE2f a 48 giorni a -20°C in HBS, in quest'ultimo caso si può notare come il mantenimento sia stato peggiore rispetto agli altri campioni caricati

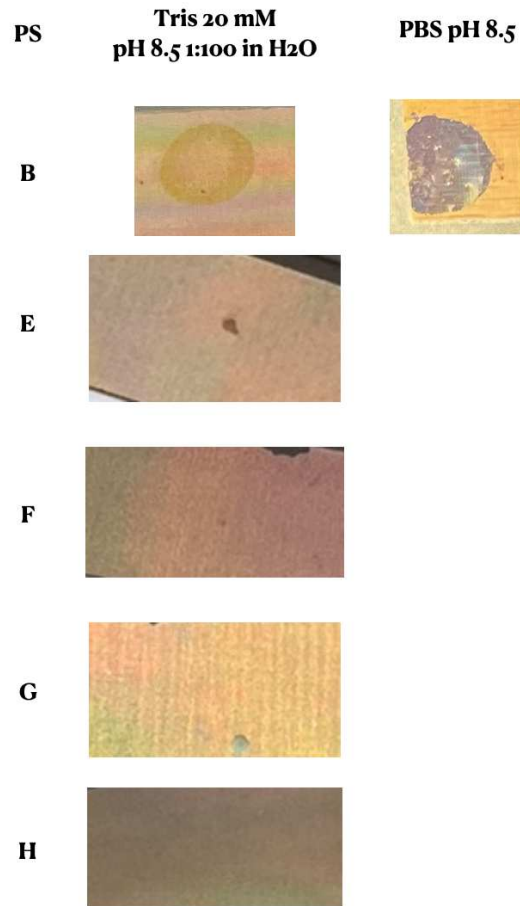
## **4.2 Ottenimento di un PS per la rilevazione di SARS-CoV-2**

Essendo un progetto i cui dati sono strettamente confidenziali per la collaborazione con un'azienda, la descrizione dei risultati è solamente indicativa del flusso di lavoro svolto. I dettagli procedurali non sono quindi riportati.

### ***4.2.1 Valutazione di interazioni tra le soluzioni tampone e i PS***

Sono stati eseguiti dei test per ottenere delle librerie di soluzioni tampone, inoltre questo ci ha permesso di osservare come il PS non funzionalizzato avrebbe reagito con le soluzioni testate. Diverse soluzioni tampone a base Tris e a base fosfato sono state utilizzate per testare la risposta della superficie dei PS di tipo B, E, F, G e H. (Figura 4.5).





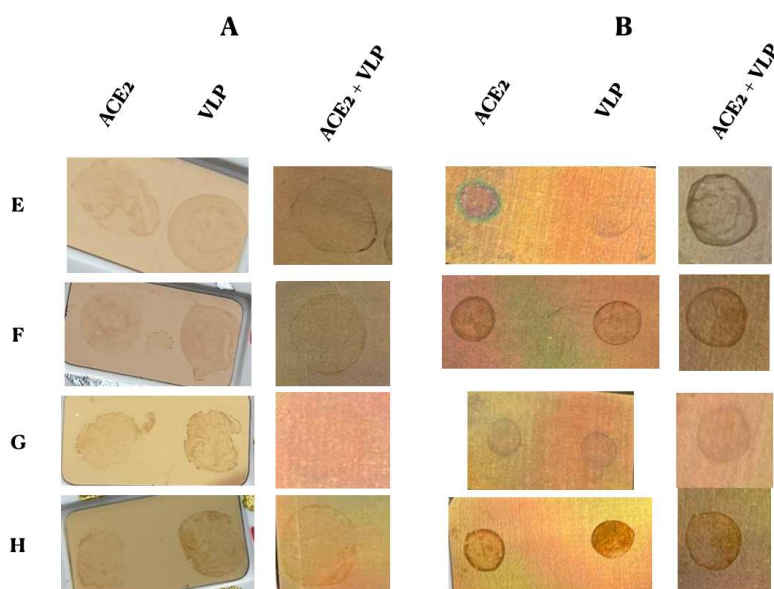
**Figura 4.5.** Librerie di soluzione tampone, sono mostrati solo alcuni degli ultimi risultati ottenuti. Ogni lettera corrisponde ad una tipologia di PS

#### 4.2.2 *Valutazione del legame tra ACE2f e i PS*

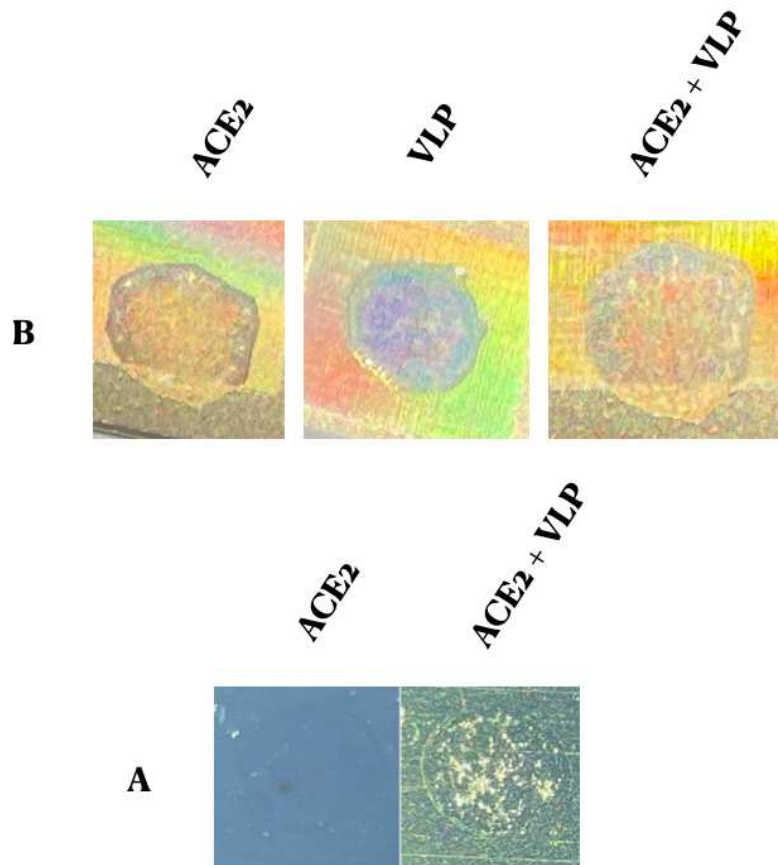
Parallelamente a questo lavoro di tesi, il gruppo di biofisica molecolare ha dimostrato che il legame tra ACE2f e la superficie dei PS avviene in modo specifico. Questa misura è stata resa possibile dall'uso di una microbilancia al quarzo che ha monitorato il legame dinamico di ACE2.

### 4.2.3 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e le VLP di SARS-CoV-2

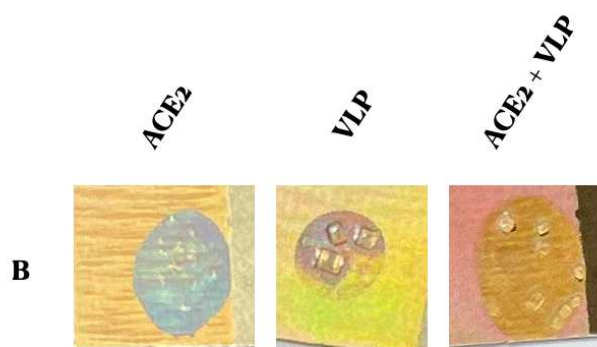
I PS sono stati funzionalizzati con la porzione extracellulare di ACE2 (ACE2f, residui 30-356). Lo stock di partenza di ACE2f aveva una concentrazione di proteina pari a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Proteintech ID: 30683), quello contenente le VLP di 0.13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Nel corso degli esperimenti è stata testata la funzionalizzazione dei PS con una quantità variabile di ACE2f in diversi tamponi. I lavaggi e le diluizioni delle VLP sono stati eseguiti sempre con acqua bidistillata poiché il buffer stesso delle VLP provocava il deposito di una patina traslucida sulla superficie del PS. In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati controlli negativi e il volume delle gocce di soluzione contenenti ACE2f e le VLP depositate sul PS sono sempre state pari a 5  $\mu\text{l}$  (Figure 4.6, 4.7, 4.8).



**Figura 4.6.** Comparazione tra diverse condizioni di pH e concentrazione delle proteine ACE2 e VLP tra due esperimenti (A e B), sono mostrati i risultati con i PS di tipo E, F, G e H



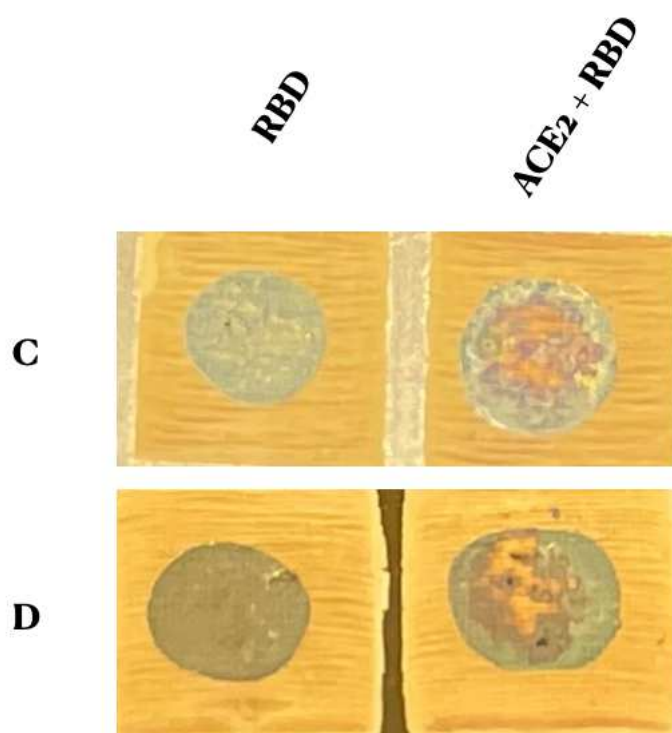
**Figura 4.7.** Ulteriori risultati ottenuti con il PS di tipo B e il PS di tipo A. In questo esperimento con il PS di tipo B si sono usate quantità maggiori sia di ACE2 che delle VLP rispetto ai test precedenti



**Figura 4.8.** In un esperimento è stato utilizzato il buffer PBS pH 8.5 per la diluizione di ACE2, le VLP sono state diluite in H<sub>2</sub>O. Si può osservare l'inaspettata formazione di cristalli

#### 4.2.4 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e il RBD della proteina Spike di SARS-CoV-2

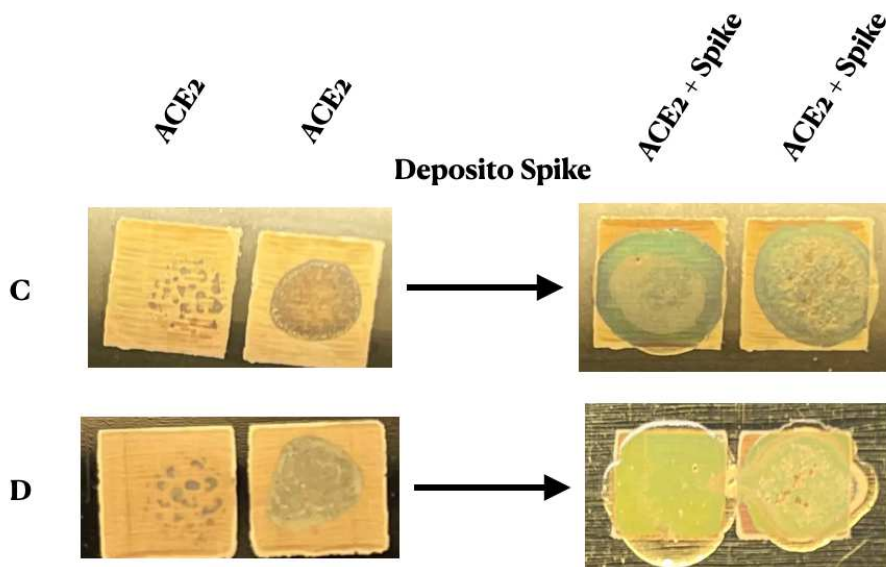
È stato eseguito un test in cui è stato depositato sui PS il receptor binding domain (RBD), la porzione terminale della proteina spike. I test sono avvenuti utilizzando i PS di tipo C e D. L'RBD è stato depositato sia in un settore del PS funzionalizzato con ACE2f sia in un settore privo di funzionalizzazione che fungerà da controllo negativo. Il volume finale della soluzione proteica depositata in entrambi i PS è pari a 5  $\mu$ l per ogni settore. Non sono avvenuti lavaggi del PS né precedenti né successivi al deposito del RBD (Figura 4.9).



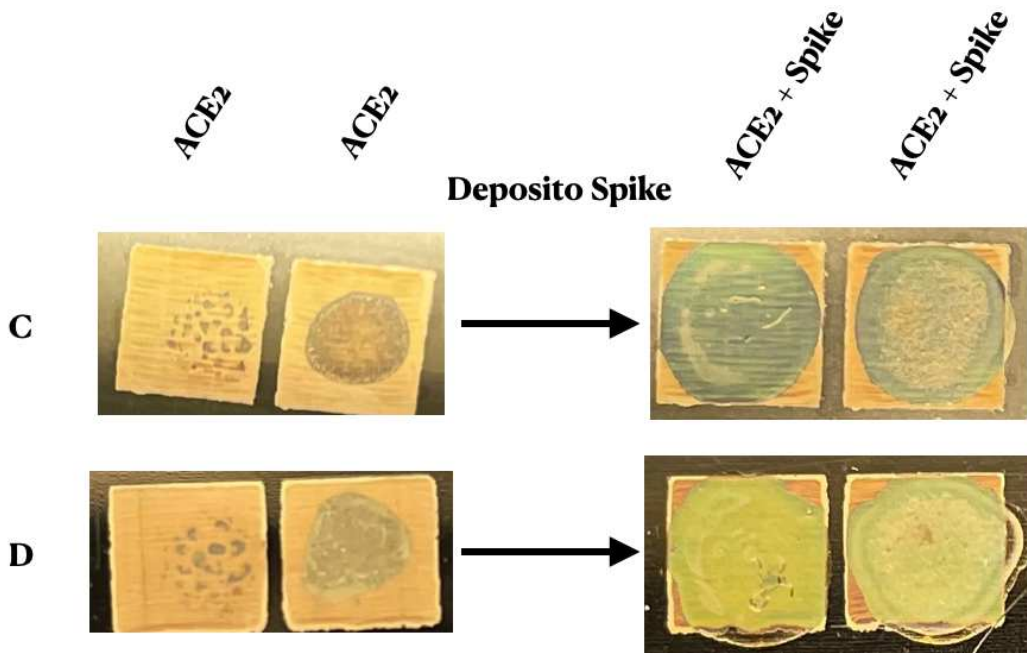
**Figura 4.9.** È possibile osservare la variazione colorimetrica nel settore funzionalizzato con ACE2f, assente invece dove non è stata effettuata la funzionalizzazione

#### 4.2.5 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e la Spike di SARS-CoV-2

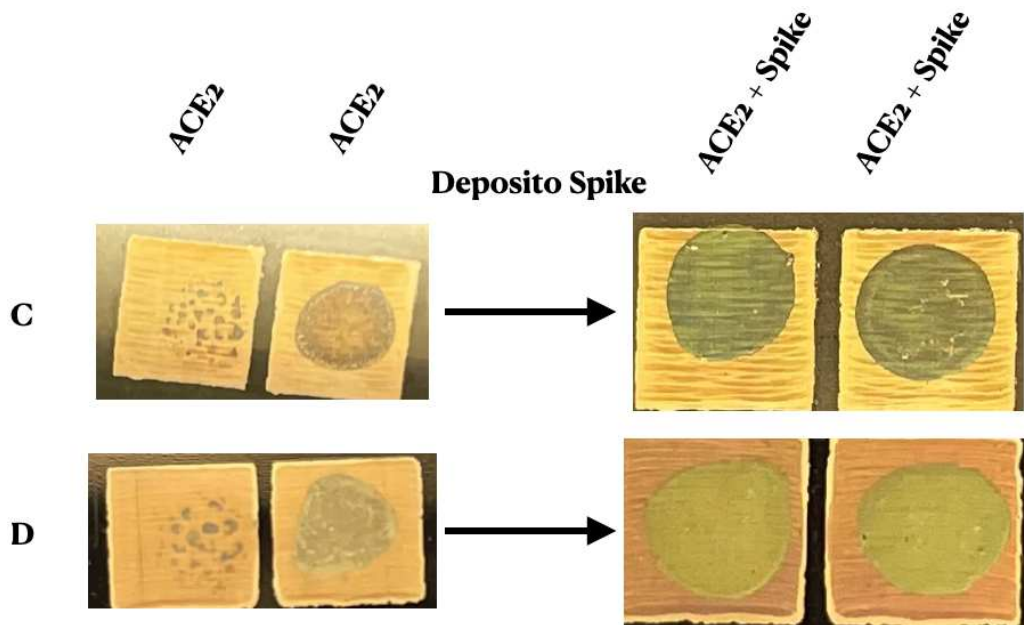
Sono stati testati due PS, la tipologia C e la tipologia D, con la proteina spike di SARS-CoV-2. Il settore di sinistra in tutti gli esperimenti è stato funzionalizzato con una quantità minima e costante di ACE2f, al contrario nel settore di destra le quantità utilizzate sono sempre state maggiori e variabili tra loro. Sono state testate tre combinazioni tra determinate quantità di ACE2f e di spike, entrambe le proteine sono state diluite durante gli esperimenti in Tris 20 mM pH 8.5. Il volume depositato delle soluzioni sulla superficie dei PS è stato sempre pari a 5  $\mu$ l. È stato lasciato il tutto ad asciugare temperatura ambiente e non sono avvenuti lavaggi successivi al deposito di ACE2f o di spike (Figure 4.10, 4.11, 4.12).



**Figura 4.10.** Nel settore di sinistra la quantità della proteina spike depositata è molto maggiore rispetto ad ACE2f. Nel settore di destra la quantità di ACE2f è circa 10 volte maggiore rispetto al settore di sinistra oltre che essere di più rispetto al RBD. Si possono osservare nel settore di destra di entrambi i PS delle possibili leggere interazioni tra ACE2f e spike



**Figura 4.11.** In questo secondo esperimento nel settore di sinistra si ha sempre una quantità di ACE2f molto minore rispetto alla proteina spike depositata. Nel settore di destra invece la quantità di ACE2f è più che doppia rispetto alla spike



**Figura 4.12.** Nel terzo ed ultimo esperimento nel settore di sinistra si ha una quantità simile di ACE2f e spike, nel settore di destra sono state utilizzate quantità dieci volte minori rispetto ai risultati precedenti sia di ACE2f che di spike, inoltre la quantità di ACE2f è circa il doppio di spike

#### ***4.2.6 Valutazione dell'interazione tra ACE2f e SARS-CoV-2***

I test sono proseguiti con il depositare la particella virale completa di SARS-CoV-2 sui PS. È stato inizialmente eseguito un esperimento da cui poi ne sono stati organizzati altri tre, per un totale di quattro esperimenti. Le quantizzazioni dei campioni utilizzati è espresso come cps/5µl ossia copie genomiche presenti nei 5 µl inoculati sull'etichetta. Le quantizzazioni sono state fatte utilizzando una Standard Internazionale per l'RNA di SARS-CoV-2 e quindi per le copie genomiche virali e non per il numero reale di particelle virali. Quest'ultime infatti sono verosimilmente presenti in quantità maggiore in quanto possono essere prodotte anche particelle difettive prive di genoma e quindi non quantizzabili. I PS sono stati funzionalizzati unicamente in un solo settore dei due presenti, questo per ottenere da una parte il risultato del test (ACE2 + SARS-CoV-2) e dall'altra il controllo negativo (SARS-CoV-2).

##### ***4.2.6.1 Risultati***

Nel primo esperimento sono stati testati 2 tipi di PS, per convenienza li chiameremo A e B. Ogni PS è stato funzionalizzato con tre diverse quantità di ACE2f e ognuna di queste tre è stata testata con quattro diluizioni di sospensione virale. Il volume depositato sulle etichette di soluzione contenente ACE2f è pari a 5 µl. Sia ACE2f che la goccia contenente SARS-CoV-2 sono state fatte asciugare a temperatura ambiente.

Diluizioni	Cps/5 $\mu$ l
DIL 1 - Tal quale	/
DIL 2 - 1:10	/
DIL 3 - 1:100	/
DIL 4 - 1:1000	/

**Tabella 4.4.** Faq simile delle diluizioni testate

PS	ACE2f (ng)	DIL 1 t/q	DIL 2 1:10	DIL 3 1:100	DIL 4 1:1000
A1	k	x			
A2	k		x		
A3	k			x	
A4	k				x
A5	y	x			
A6	y		x		
A7	y			x	
A8	y				x
A9	z	x			
A10	z		x		
A11	z			x	
A12	z				x

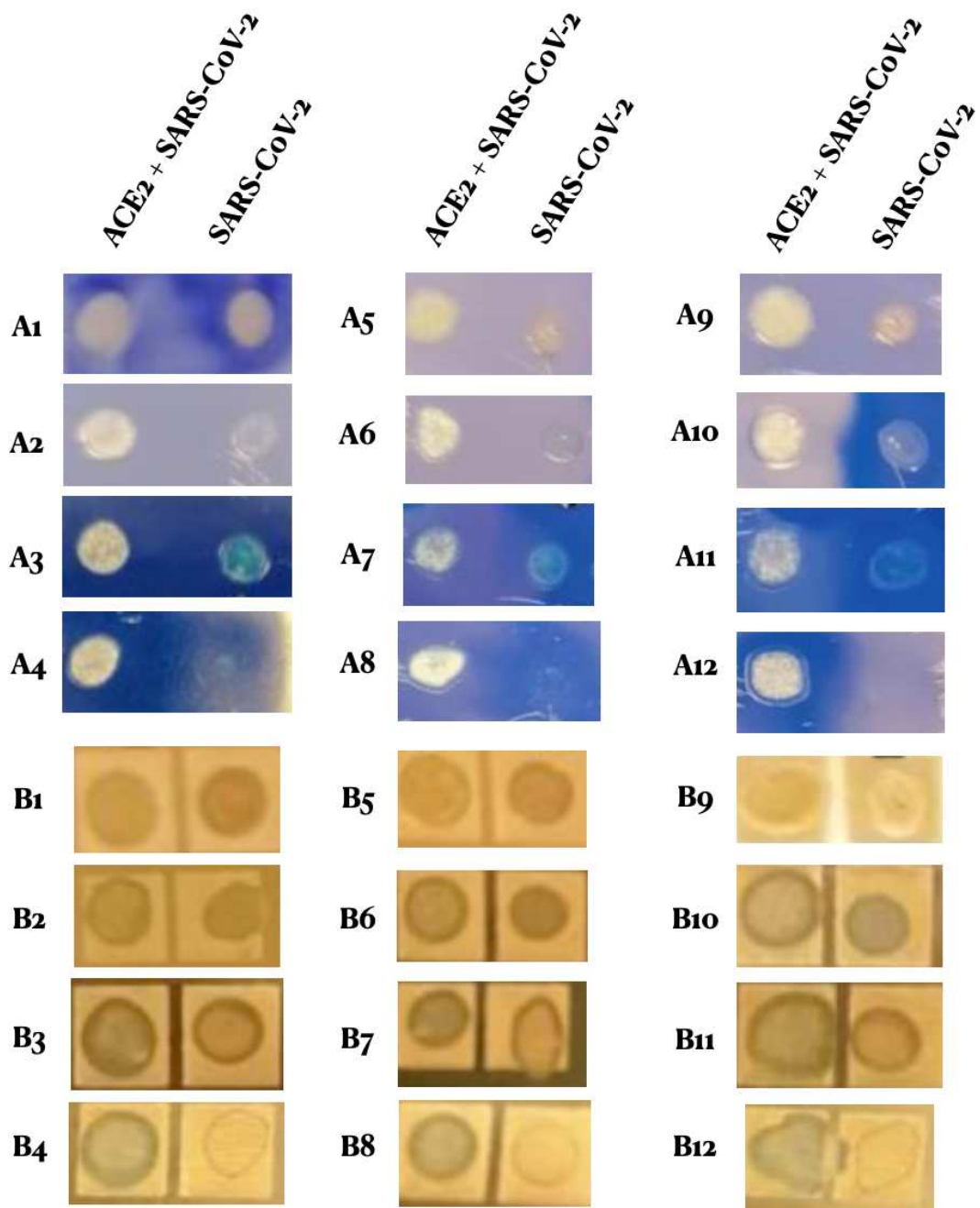
**Tabella 4.5.** Design of Experiment per il primo test di deposito di SARS-CoV-2 sui PS ottici A



PS	ACE2f (ng)	DIL 1 t/q	DIL 2 1:10	DIL 3 1:100	DIL 4 1:1000
B1	k	x			
B2	k		x		
B3	k			x	
B4	k				x
B5	y	x			
B6	y		x		
B7	y			x	
B8	y				x
B9	z	x			
B10	z		x		
B11	z			x	
B12	z				x

**Tabella 4.6.** Design of Experiment per il primo test di deposito di SARS-CoV-2 sui PS ottici B

È possibile osservare come il risultato migliori al diminuire della quantità di copie virali depositate sulla superficie funzionalizzata (Figura 4.13).



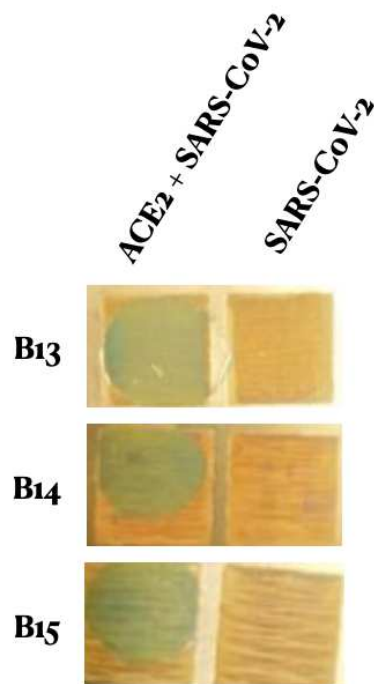
**Figura 4.13.** PS di tipo A e B testati con SARS-CoV-2

Un secondo esperimento si è svolto in modo simile al precedente, sono state testate tre ulteriori diluizioni di SARS-CoV-2 (Tabella 4.7). I test sono stati eseguiti unicamente sul PS B e la quantità di ACE2f utilizzata è rimasta uguale a quella utilizzata sui PS B5, B6, B7 e B8. La soluzione tampone utilizzata è stata la stessa del primo esperimento. Non sono avvenuti lavaggi né dopo il deposito di ACE2f né dopo il deposito di SARS-CoV-2. Le gocce di entrambe le soluzioni sono state fatte asciugare a temperatura ambiente.

<b>PS</b>	<b>ACE2f (ng)</b>	<b>DIL 5 1:10000</b>	<b>DIL 6 1:100000</b>	<b>DIL 7 1:1000000</b>
<b>B13</b>	y	x		
<b>B14</b>	y		x	
<b>B15</b>	y			x

**Tabella 4.7.** Design of Experiment dell'esperimento 2

Nella Figura 4.14 è possibile osservare i risultati ottenuti. Come nell'esperimento precedente è possibile notare come vi sia differenza tra il settore dove è stato depositato il virus senza funzionalizzazione da quello dove invece è presente.



**Figura 4.14.** Risultati ottenuti dal secondo esperimento avvenuto con i PS di tipo B testati con SARS-CoV-2

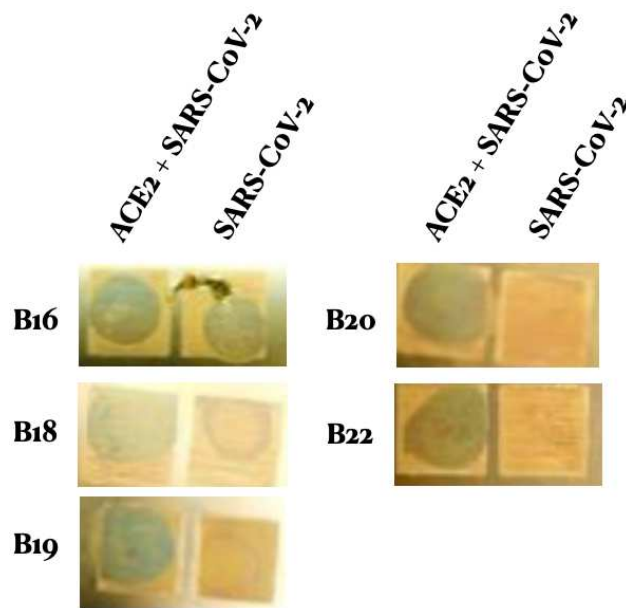
In un terzo esperimento sono stati aggiunti due lavaggi manuali successivi al deposito di ACE2f al fine di osservare se questa rimane adesa al PS. Il lavaggio è stato effettuato pipettando manualmente. Nell'operazione di lavaggio, va considerata anche la pressione del liquido. Una volta lasciati asciugare i PS a temperatura ambiente, le sospensioni virali vengono depositate come indicato in Tabella 4.8. La quantità di ACE2 è stata mantenuta fissa utilizzando un valore intermedio rispetto alle quantità

saggiare nel primo test. ACE2 è stata lasciata asciugare a temperatura ambiente.

<b>PS B</b>	<b>ACE2f (ng)</b>	<b>DIL 1 T/q</b>	<b>DIL 2 1:10</b>	<b>DIL 3 1:100</b>	<b>DIL 4 1:1000</b>	<b>DIL 5 1:1000 0</b>	<b>DIL 6 1:1000 00</b>	<b>DIL 7 1:1000 000</b>
<b>B16</b>	y	x						
<b>B17</b>	y		x					
<b>B18</b>	y			x				
<b>B19</b>	y				x			
<b>B20</b>	y					x		
<b>B21</b>	y						x	
<b>B22</b>	y							x

**Tabella 4.8.** Design of experiment del terzo esperimento eseguito con SARS-CoV-2

I risultati ottenuti mostrano come vi sia una risposta qualitativa significativa anche in questo esperimento (Figura 4.15).



**Figura 4.15.** Risultati ottenuti dal terzo esperimento avvenuto con i PS di tipo B testati con SARS-CoV-2. A causa di errori procedurali non sono stati ottenuti risultati dal B17 e dal B21

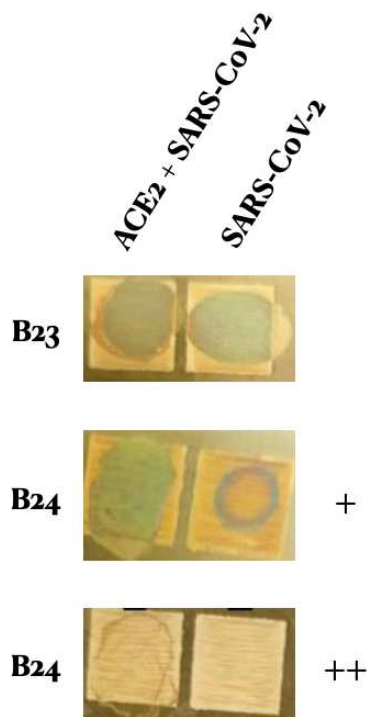
Nel quarto ed ultimo esperimento avvenuto con il SARS-CoV-2, come negli ultimi due, è stato utilizzato unicamente il PS di tipo B. In questo ultimo test sono stati eseguiti due lavaggi, non più successivi al deposito di ACE2f ma entrambi successivi al deposito delle particelle virali di SARS-CoV-2. I lavaggi eseguiti sono stati di due intensità differenti, in un PS è stato eseguito un lavaggio meno vigoroso e in un altro più intenso. Lo scopo di questo esperimento è stato valutare se sarebbe rimasta un'impronta del virus non solo dopo il deposito ma anche dopo un lavaggio "domestico". È stata utilizzata

anche in questo esperimento una quantità “media” di ACE2f. Anche in questo caso i lavaggi sono avvenuti con acqua bidistillata.

<b>PS B</b>	<b>ACE2f (ng)</b>	<b>DIL 1 T/q</b>	<b>DIL 3 1:100</b>	<b>Lavaggio +</b>	<b>Lavaggio ++</b>
<b>B23</b>	y	x		x	
<b>B24</b>	y		x	x	x

**Tabella 4.9.** Design of Experiment dell’esperimento 4. Il lavaggio + corrisponde ad un lavaggio più blando mentre il lavaggio ++ corrisponde ad un lavaggio più vigoroso

In Figura 4.16 è mostrato come il virus rimanga aggrappato al PS dopo il lavaggio post-deposito nella sospensione virale. Invece per il B24 si può osservare come sia in presenza di un lavaggio blando che più intenso, l’impronta del virus rimane sul settore dove è anche presente ACE2.



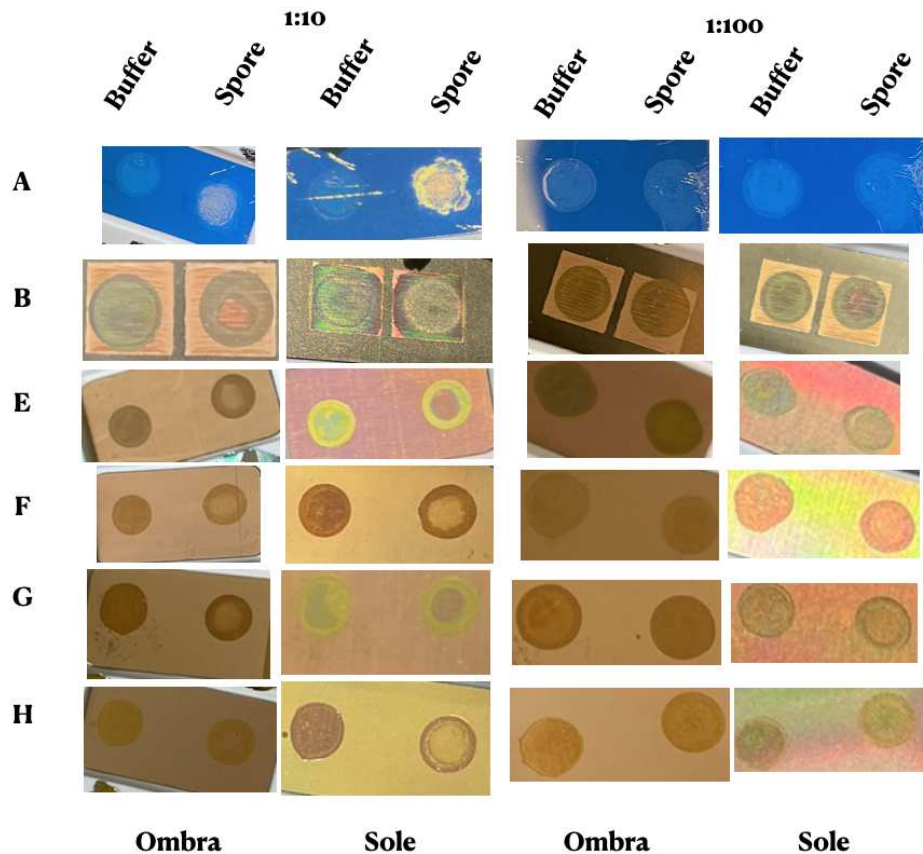
**Figura 4.16.** Risultati ottenuti dal quarto esperimento avvenuto con i PS di tipo B testati con SARS-CoV-2

#### **4.2.7 Valutazione dell'utilizzo dei PS per il rilevamento di spore e lieviti**

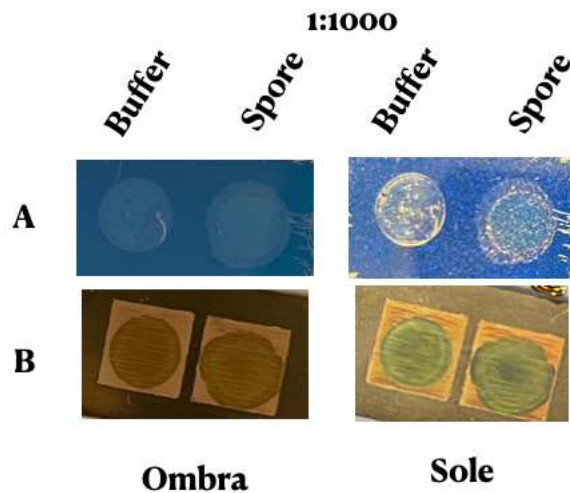
Sono stati testati sei PS con tre diluizioni scalari di spore di *Aspergillus nidulans*, per questioni di comodità e confidenzialità del progetto chiameremo anche in questo esperimenti i PS con delle lettere: A, B, E, F, G, H. In ogni PS un settore è stato utilizzato come controllo negativo depositandoci del buffer, nell'altro invece è stata depositata una diluizione scalare delle spore. Il volume delle gocce depositate è stato sempre pari a 5  $\mu$ l e sono state lasciate



asciugare a temperatura ambiente. Tra le tre diluizioni testate (1:10, 1:100 ed 1:1000), i risultati migliori sono stati ottenuti utilizzando la diluizione minore e quella intermedia (Figure 4.17, 4.18).



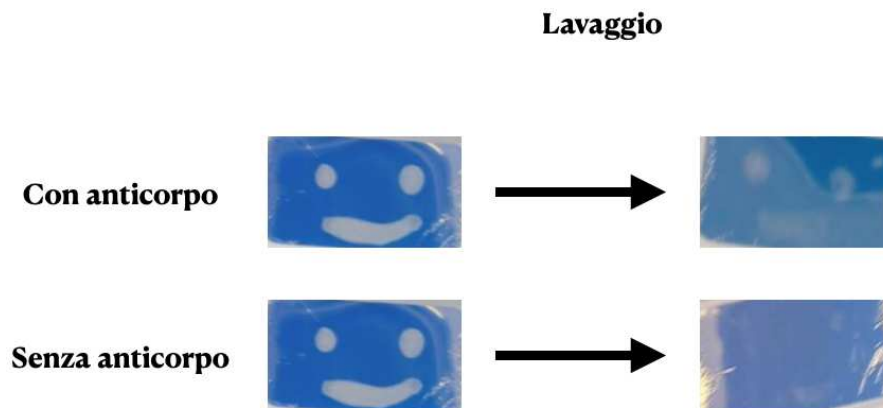
**Figura 4.17.** Risultati ottenuti con le diluizioni 1:10 ed 1:100 delle spore di *Aspergillus nidulans*. Il sensore A ed il sensore B hanno fornito la risposta migliore, infatti è possibile osservare come sia evidente la differenza tra il controllo negativo con solo il buffer e il deposito delle spore



**Figura 4.18.** Come è possibile osservare la diluizione 1:1000 non ha dato risultati

In base alle evidenze sull'adesione spontanea delle spore di *Aspergillus nidulans* ai PS, si è proceduto a testare una strategia di selettività. Gli ulteriori test sono avvenuti con il PS A ed il PS B. In questo caso si è utilizzato un anticorpo specifico per la parete cellulare fungina (in particolare del genere *Aspergillus* e di funghi dimorfici del genere *Candida*). Rispetto all'esperimento avvenuto in precedenza la soluzione contenente le spore di *Aspergillus nidulans* non è stata diluita. Anche in questo test il volume depositato sui PS corrisponde a 5  $\mu$ l ed è stato depositato sui due PS funzionalizzati in precedenza con l'anticorpo. Sia nell'ottenimento del controllo negativo che nell'esperimento con l'anticorpo la soluzione depositata è stata lasciata asciugare a temperatura ambiente. Il controllo negativo è stato ottenuto depositando una soluzione contenente le spore sui

PS non funzionalizzati con l'anticorpo specifico e con il fine di rilevare se le spore, dopo il lavaggio, rimanessero adese al PS nonostante l'assenza dell'anticorpo specifico (Figura 4.19, 4.20).

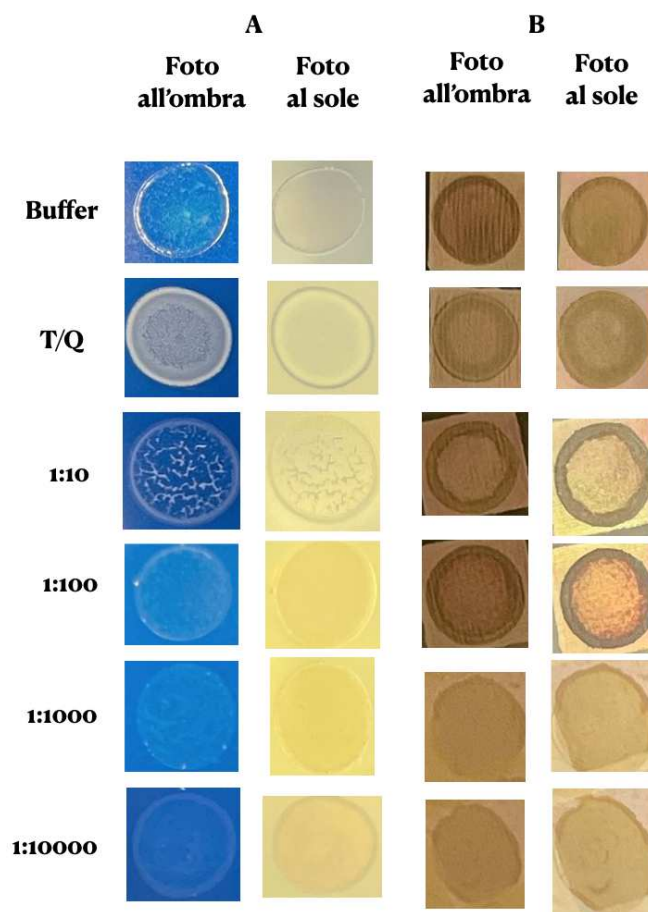


**Figura 4.19.** Comparazione dell'esperimento sul PS di tipo A. Dopo un copioso lavaggio del PS, dove l'anticorpo è assente si ha una quasi completa rimozione delle spore



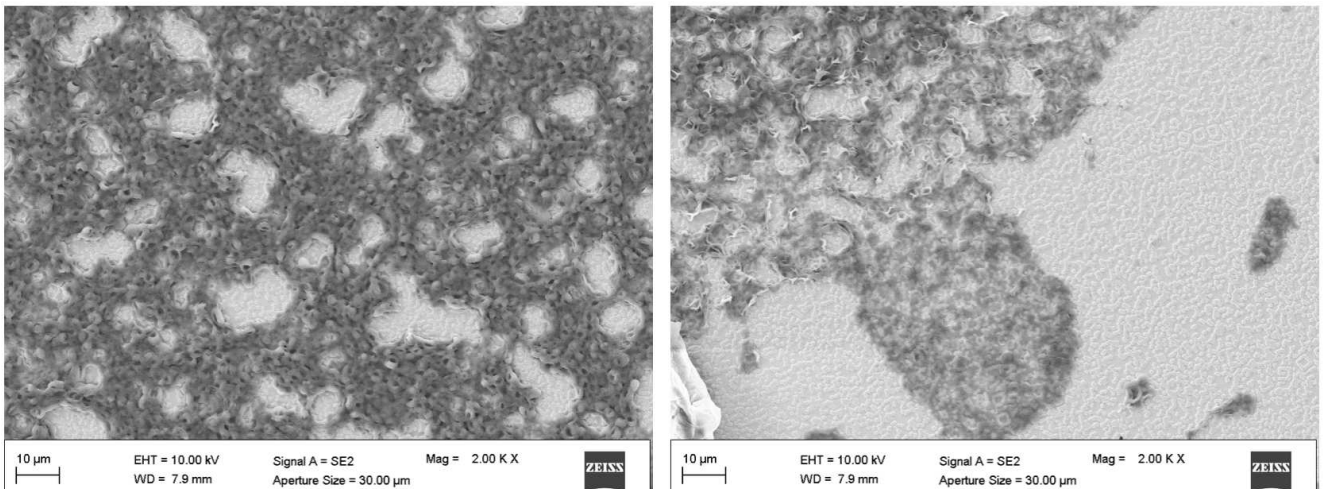
**Figura 4.20.** Esperimento sul PS di tipo B. Il settore di sinistra è stato funzionalizzato con l'anticorpo, quello di destra no

Ulteriori test sono avvenuti utilizzando il lievito *Pichia pastoris*, anche in questo esperimento sono stati testati i PS di tipo A e B. Partendo da una soluzione “tal quale” sono state ottenute quattro diluizioni scalari, queste diluizioni e anche quella di partenza sono poi state testate depositando un volume di 5  $\mu$ l sui PS in esame. Le gocce depositate sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente. Solamente per la soluzione “tal quale” e la diluizione 1:10 sono avvenuti tre lavaggi con acqua bidistillata (Figura 4.21).



**Figura 4.21.** Risultati dell'esperimento avvenuto con il PS di tipo A e di tipo B

Al fine di valutare visivamente come le cellule rimanessero adese alla superficie del PS anche dopo il lavaggio si è proceduto ad acquisire delle immagini mediante microscopia elettronica a scansione (Figura 4.22).



**Figura 4.22.** Immagini acquisite tramite microscopia elettronica a scansione. Le immagini mostrano la superficie del PS di tipo A. In entrambe le immagini è stata depositata la soluzione tal quale di cellule, a sinistra non è avvenuto nessun lavaggio, a destra sono avvenuti tre lavaggi con 20 µl di acqua bidistillata

## 5. Discussione

### 5.1 Produzione della proteina ricombinante ACE2f

La proteina ACE2f è stata correttamente espressa in seguito all'avvenuta trasformazione del ceppo cellulare BL21 (DE3)-pLysS con il plasmide PET28a(+) (ProteinTech ID: Ag30683). ACE2 è stata ingegnerizzata al fine di ottenere una tag istidinico C-terminale che ha permesso di purificarla tramite cromatografia di affinità. Per ottenere una produzione maggiore di proteina è stato necessario indurre le cellule con IPTG overnight a 20°C, quindi ad una temperatura inferiore rispetto alla temperatura di 37°C ottimale per la crescita di *E. coli*. Nel processo produttivo della proteina ricombinante sono stati utilizzati inibitori di proteasi nel tampone di lisi, nei tamponi di lavaggio e nel tampone di mantenimento, infatti in numerosi esperimenti nei quali non sono stati utilizzati inibitori l'SDS-PAGE ha mostrato la presenza di bande proteiche riconducibili a porzioni di ACE2f parzialmente degradata dall'azione di proteasi. Per la fase di lisi cellulare e purificazione tramite cromatografia di affinità i risultati migliori sono stati ottenuti utilizzando soluzioni tampone a base HEPES, si ipotizza infatti che quest'ultimo, grazie alla sua proprietà di mantenere il pH molto stabile nel tempo, abbia favorito il

mantenimento della giusta carica della proteina favorendo la sua solubilità e il legame alla resina di nichel. Per il mantenimento nel tempo della proteina ottenuta è stato osservato che l'utilizzo di soluzioni tampone a base PBS è preferibile rispetto a soluzioni a base di HEPES, favorendo il mantenimento di ACE2f fino a 26 giorni ad una temperatura di -20°C e fino a 48 giorni a 4°C e a -20°C eseguendo una dialisi del campione con una soluzione contenente mannitolo prima di trasferirlo nella soluzione finale di mantenimento. Questi parametri di mantenimento sono fondamentali nell'identificazione di una tempistica di mantenimento, conservazione e utilizzo dei PS su cui la proteina sarà immobilizzata.

## **5.2 Potenziali Sensori (PS)**

Le librerie di buffer hanno permesso di determinare eventuali interazioni tra la soluzione testata e i PS, osservando i risultati ottenuti appare evidente come la risposta migliore si ottenga con un buffer a base Tris. Questo infatti non lascia nei sensori delle alterazioni colorimetriche importanti che potrebbero deviare la lettura del risultato del PS da parte del fruitore. Il PBS a differenza del Tris lascia dei depositi cristallini sulla superficie del PS, probabilmente dovuti ai sali contenuti nella soluzione. I test avvenuti con le VLP hanno fornito risultati meno soddisfacenti del previsto, è possibile comunque

osservare come il PS di tipo A fornisca dei risultati interessanti, evidenziando un cambio colorimetrico che potrebbe stare a significare l'avvenuta interazione tra ACE2f e le VLP, cambio di colore che non si osserva dove è depositato solo ACE2f. Ulteriori test avvenuti con le spike e il RBD della proteina spike di SARS-CoV-2 hanno mostrato come effettivamente avvenga una potenziale interazione tra quest'ultime e i PS funzionalizzati con ACE2f, in particolare con la proteina spike RBD si ha un dato notevole, assente dove non è avvenuta la funzionalizzazione. I test con il virus SARS-CoV-2 sono terminati testando il PS con il virione nella sua interezza. Il deposito della soluzione contenente le particelle virali causa nei PS un effettivo cambio colorimetrico dove è stata effettuata la funzionalizzazione con ACE2f. Il risultato è più evidente all'aumentare della diluizione del campione contenente i virioni, inoltre il cambio colorimetrico si mantiene anche in seguito ad un avvenuto lavaggio del PS precedente e successivo al deposito virale. I test sui PS si sono conclusi testando il loro utilizzo con spore e lieviti, anche in questo caso i risultati hanno suggerito come effettivamente vi sia un cambio colorimetrico nei PS di tipo A e B nel settore nel quale vengono depositate le cellule e le spore. Degli ottimi risultati sono stati ottenuti funzionalizzando il PS con un anticorpo specifico verso le spore di *Aspergillus nidulans*, in questo caso è evidente come il PS funzionalizzato legghi a sé le spore causando un cambio colorimetrico e come le mantenga



adesi alla superficie anche eseguendo un lavaggio intenso successivo al deposito.

## 6. Conclusione

Mediante questo lavoro di tesi, che ha preso il via inizialmente con l'utilizzo della proteina M<sup>pro</sup> prodotta nel laboratorio Ma.S.Bi.C (Marche Structural Biology Center) ed immobilizzata sul PS, per poi essere sostituita da ACE2f, è stato possibile (i) stabilire un primo protocollo per la produzione ricombinante di una porzione di ACE2 nei batteri per applicazioni nella sensoristica e (ii) testare dei potenziali sensori di nuova generazione che possano rilevare in modo immediato e fruibile da tutti il virus SARS-CoV-2 [21]. Sono stati testati innumerevoli PS differenti tra loro per la loro composizione, osservando i risultati ottenuti è stato possibile selezionare alcuni dei PS candidati per rilevare il virus SARS-CoV-2. Oltre ai PS per SARS-CoV-2 si è potuto testare anche la risposta dei dispositivi a organismi differenti tipo spore e lieviti.

## 7. Bibliografia

- (1) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, novembre 2022, <https://covid19.who.int>
- (2) Wu, S. L., Mertens, A. N., Crider, Y. S., Nguyen, A., Pokpongkiat, N. N., Djajadi, S., et al. & Benjamin-Chung, J. (2020). Substantial underestimation of SARS-CoV-2 infection in the United States. *Nature communications*, 11(1), 1-10
- (3) Coronaviruses, gennaio 2022, <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/coronaviruses>
- (4) Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., ... & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215-220
- (5) Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., Sun, C., ... & Li, S. (2020). Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, 183(3), 730-738.
- (6) Kannan, S. P. A. S., Ali, P. S. S., Sheeza, A., & Hemalatha, K. (2020). COVID-19 (Novel Coronavirus 2019)-recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(4), 2006-2011.
- (7) SARS-CoV-2 section, febbraio 2022, <https://www.scientificanimations.com/wiki-images/>
- (8) SARS-CoV-2 Spike, giugno 2020, <https://pdb101.rcsb.org/motm/246>
- (9) Barros, E. P., Casalino, L., Gaieb, Z., Dommer, A. C., Wang, Y., Fallon, L., ... & Amaro, R. E. (2021). The flexibility of ACE2 in the context of SARS-CoV-2 infection. *Biophysical journal*, 120(6), 1072-1084.

- (10) Villa, A., Brunialti, E., Dellavedova, J., Meda, C., Rebecchi, M., Conti, M., ... & Ciana, P. (2022). DNA aptamers masking angiotensin converting enzyme 2 as an innovative way to treat SARS-CoV-2 pandemic. *Pharmacological research*, 175, 105982.
- (11) UniProtKB - Q9BYF1 (ACE2\_HUMAN), gennaio 2022, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYF1>
- (12) Angiotensin-converting enzyme 2, gennaio 2022, <https://enzyme.expasy.org/EC/3.4.17.23>
- (13) Salamanna, F., Maglio, M., Landini, M. P., & Fini, M. (2020). Body localization of ACE-2: On the trail of the keyhole of SARS-CoV-2. *Frontiers in medicine*, 7, 935.
- (14) Chamsi-Pasha, M. A., Shao, Z., & Tang, W. W. (2014). Angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for heart failure. *Current heart failure reports*, 11(1), 58-63.
- (15) Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., ... & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215-220.
- (16) Raghuvamsi, P. V., Tulsian, N. K., Samsudin, F., Qian, X., Purushotorman, K., Yue, G., ... & Anand, G. S. (2021). SARS-CoV-2 S protein: ACE2 interaction reveals novel allosteric targets. *Elife*, 10, e63646.
- (17) Ong, D. S., Fragkou, P. C., Schweitzer, V. A., Chemaly, R. F., Moschopoulos, C. D., & Skevaki, C. (2021). How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clinical Microbiology and Infection*.
- (18) Linda J. Carter, Linda V. Garner, Jeffrey W. Smoot, Yingzhu Li, Qiongqiong Zhou, Catherine J. Saveson, Janet M. Sasso, Anne C. Gregg, Divya J. Soares, Tiffany R.

Beskid, Susan R. Jerve, and Cynthia Liu. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science* 2020 6 (5), 591-605

- (19) Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H., Chromikova, V., McMahon, M., ... & Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature medicine*, 26(7), 1033-1036.
- (20) Poh, C.M., Carissimo, G., Wang, B. *et al.* Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients. *Nat Commun* 11, 2806 (2020).
- (21) Silvestrini, L., Belhaj, N., Comez, L., Gerelli, Y., Lauria, A., Libera, V., ... & Spinozzi, F. (2021). The dimer-monomer equilibrium of SARS-CoV-2 main protease is affected by small molecule inhibitors. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.