



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

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

ENTEROCHINASI RICOMBINANTE PER LA PRODUZIONE DI CITOCHINE UMANE
RECOMBINANT ENTEROKINASE FOR THE PRODUCTION OF HUMAN CYTOKINES

Tesi di Laurea Magistrale di:

Sara Accili

Relatore:

Prof.ssa Tiziana Cacciamani

Sessione autunnale
Anno Accademico 2020-21

INDICE

1. ENTEROCHINASI	1
1.1 Funzione	1
1.2 Struttura	4
1.3 Sequenza amminoacidica	6
1.4 “Proteina mosaico”	8
1.5 Utilizzo in ambito biotecnologico	8
2. CHEMOCHINE	11
2.1 Struttura	11
2.2 Funzione	12
2.3 La chemochina CXCL12	13
2.3.1 Peculiarità di CXCL12	14
2.3.2 Le isoforme di CXCL12	15
2.3.3 Partner di interazione per le chemochine CXCL12	17
2.3.3.1 Recettore CXCR4	19
2.3.3.2 Recettore ACKR3	21
2.3.3.3 I glicosamminoglicani	23
2.3.4 Regolazione dell’attività di CXCL12	24
2.3.5 CXCL12 e cancro	26
2.3.5.1 Importanza della variante δ nel cancro al seno e al pancreas	27
2.3.6 CXCL12 e guarigione delle ferite	30
2.3.7 CXCL12/CXCR4 e neutrofili	31
SCOPO	33
3. MATERIALI E METODI	36
3.1 Sistema di espressione procariotico	37
3.2 Scelta del vettore	39
3.2.1 Modifiche del vettore pMCSG9	40

3.3	<i>Quantizzazione del plasmide pMCSG9 al NanoDrop</i>	40
3.4	<i>Trasformazione chimica delle cellule competenti GC-5 per la propagazione del plasmide pMCSG9</i>	41
3.4.1	<i>Preparazione del pre-inoculo e dell'inoculo</i>	43
3.5	<i>Purificazione del DNA plasmidico</i>	43
3.6	<i>Clonaggio LIC</i>	44
3.7	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	45
3.8	<i>Amplificazione dell'inserto</i>	47
3.9	<i>Digestione del plasmide</i>	49
3.10	<i>Estrazione dalle bande mediante il kit QIAGEN</i>	50
3.11	<i>Elettroforesi su gel di agarosio</i>	50
3.12	<i>Protocollo clonaggio LIC</i>	52
3.14	<i>Trasformazione chimica delle cellule competenti GC-5 con la mix-annealing</i>	53
3.15	<i>Purificazione del plasmide propagato con kit SIGMA GenElute Plasmid Miniprep Kit</i>	53
3.16	<i>Scelta di E. Coli come sistema di espressione</i>	54
3.17	<i>Trasformazione delle cellule C41(DE3) con pMCSG9-EK mediante Shock Termico</i>	55
3.18	<i>Induzione dell'espressione mediante IPTG</i>	56
3.19	<i>Autoinduzione</i>	57
3.20	<i>Purificazione dell'Enterochinasi</i>	60
3.20.1	<i>Cromatografia di affinità</i>	61
3.21	<i>Elettroforesi su gel di poliacrilammide</i>	66
3.22	<i>Dialisi</i>	69
3.23	<i>Refolding</i>	70
3.24	<i>Ultrafiltrazione</i>	71
3.25	<i>Produzione di CXCL12δ</i>	72
3.25.1	<i>Ceppo Rosetta (DE3)</i>	72
3.25.2	<i>Purificazione di CXCL12δ</i>	73
3.25.2.1	<i>Cromatografia di affinità</i>	74

4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	78
<i>4.1 Amplificazione, purificazione e quantizzazione del gene EK dal vettore pET-15b-EK_C122S_His5.....</i>	<i>78</i>
<i>4.2 Digestione, purificazione e quantizzazione del vettore pMCSG9.....</i>	<i>83</i>
<i>4.3 Clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning).....</i>	<i>85</i>
<i>4.4 Trasformazione delle cellule competenti GC-5 per la propagazione di pMCSG9-EK_C122S e sua purificazione e quantizzazione.....</i>	<i>85</i>
<i>4.5 Caratterizzazione dei cloni pMCSG9-EK_C122S.....</i>	<i>87</i>
<i>4.6 Sequenziamento.....</i>	<i>88</i>
<i>4.7 Espressione in piccola scala.....</i>	<i>90</i>
<i>4.8 Purificazione dell'Enterochinasi e valutazione della sua attività.....</i>	<i>93</i>
<i>4.9 Purificazione di CXCL12δ.....</i>	<i>104</i>
<i>4.10 Test di attività EK-CXCL12δ in piccola scala.....</i>	<i>109</i>
CONCLUSIONE.....	118
BIBLIOGRAFIA.....	121

Capitolo 1

ENTEROCHINASI

L'**Enterochinasi** (EK) o enteropeptidasi è un enzima contenuto nel succo enterico, prodotto dalle cellule della parete duodenale, in particolare gli enterociti a livello dell'orletto a spazzola [1].

1.1 Funzione

Si tratta di un enzima appartenente alla classe delle “**serina proteasi**”, che basano il loro meccanismo di catalisi sulla presenza della serina, particolarmente reattiva ed essenziale per la loro attività enzimatica.

Sono componenti coinvolte nell'idrolisi di legami peptidici presenti all'interno della struttura proteica.

In particolare, l'Enterochinasi è fisiologicamente responsabile dell'attivazione del Tripsinogeno pancreatico a Tripsina, mediante un taglio altamente specifico [6].

Questa estrema specificità è essenziale per permettere all'enzima di svolgere il suo ruolo all'inizio della cascata digestiva [5].

Infatti, dopo il taglio, cominciano una serie di reazioni proteolitiche, che a loro volta portano all'attivazione di vari enzimi digestivi.

Il pancreas produce molti di questi enzimi digestivi, il più importante dei quali è proprio la Tripsina.

Anche la Tripsina è una serina proteasi con funzione proteolitica e pertanto usa in particolare un amminoacido, la serina, per eseguire la reazione di taglio delle proteine.

Durante la digestione proteica, la Tripsina taglia specificatamente sul carbossile degli amminoacidi basici, lisina e arginina [8].

È essenziale la presenza di elevato controllo degli enzimi proteolitici in quanto le proteine rappresentano circa un quinto del materiale presente nelle nostre cellule.

Ecco perché questi enzimi vengono prodotti come precursori, che per funzionare devono essere specificatamente attivati [1].

Persino l'Enterochinasi stessa, che è in cima alla cascata enzimatica, ha bisogno a sua volta di essere attivata tramite il taglio specifico di una duodenasi.

L'Enterochinasi ha elevata specificità per la sequenza amminoacidica **DDDDK**, costituita quindi da quattro residui di aspartato seguiti da un residuo di lisina [6].

Enterochinasi e Tripsina hanno specificità simili ed entrambi gli enzimi sono in grado di attivare il Tripsinogeno.

Tuttavia, la Tripsina è un cattivo attivatore del Tripsinogeno, mentre l'Enterochinasi risulta molto più efficiente.

Infatti, la sequenza **DDDDK** è scarsamente scissa dalla tripsina stessa, probabilmente a causa della predominanza di cariche negative. Pertanto, l'auto-attivazione del tripsinogeno risulta inefficiente [6].

Al contrario, l'Enterochinasi è in grado di scindere il Tripsinogeno immediatamente dopo il residuo di lisina, con efficienza molto maggiore rispetto alla Tripsina, rilasciando il pro-peptide ammino-terminale e permettendo alla conseguente Tripsina di adottare la sua conformazione attiva [3].

Nello specifico, l'Enterochinasi catalizza l'idrolisi del legame *Lys6-Ile7* del Tripsinogeno, con rilascio dell'esapeptide N-terminale.

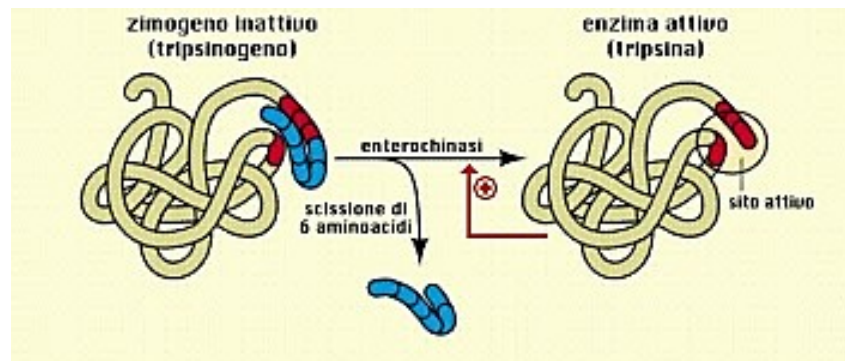


Figura 1. Attivazione del Tripsinogeno in Tripsina. (Immagine tratta da csmibio.unimi.it)

La Tripsina appena formata ha il sito attivo libero per catalizzare l'idrolisi di un singolo legame negli altri zimogeni, convertendo ciascuno in un enzima attivo.

Il processo di attivazione ha una grande amplificazione poiché una piccola quantità di Enterochinasi produce grandi quantità di Tripsina attiva e di altri enzimi digestivi [1].

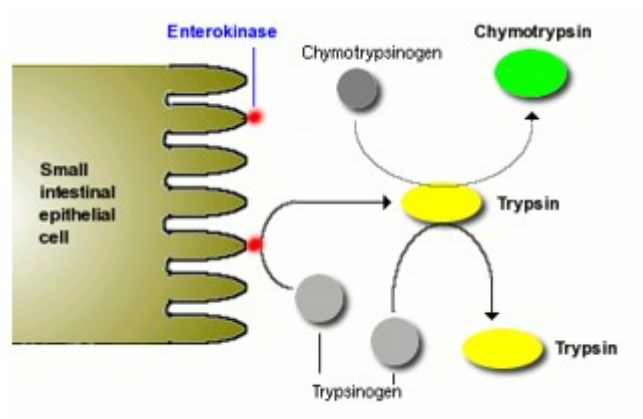


Figura 2. Schema rappresentativo della cascata enzimatica. (Immagine tratta da vivo.colostate.edu)

1.2 Struttura

Dal punto di vista strutturale, è riconducibile ad una **Tripsina α/β** , con *fold* di serina proteasi.

L'Enterochinasi consiste in due β -barrel, ciascuno costituito da sei β -strand ($\beta 1$ - $\beta 6$ e $\beta 7$ - $\beta 12$). Entrambi i β -barrel sono disposti a *chiave greca*, contenenti α -eliche al centro di ogni struttura a barile ed un' α -elica situata al C-terminale.

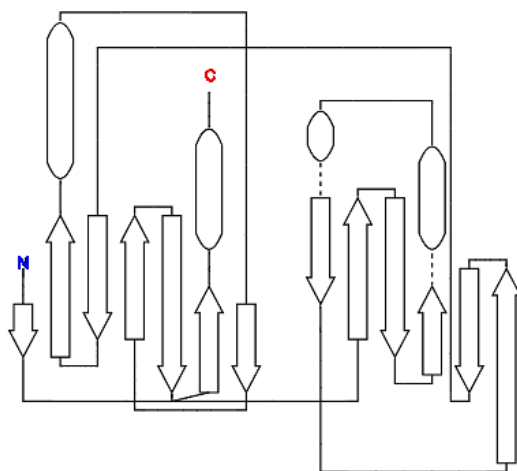


Figura 3. Topologia dell'Enterochinasi. (Immagine tratta da UniProt)

I potenziali di superficie rivelano un'equa distribuzione degli amminoacidi carichi sulla superficie della proteina, anche se la regione vicina al sito attivo ha un potenziale prevalentemente negativo [2].

Come accennato, l'Enterochinasi attiva si ottiene in seguito al taglio di una duodenasi, che scinde la proforma e produce una catena pesante N-terminale e una catena leggera C-terminale, dando origine ad una proteasi eterodimerica.

Queste catene rimangono legate insieme mediante un ponte disolfuro.

La catena pesante multi-dominio ha il ruolo di mediare l'associazione con la membrana intestinale, mentre la catena leggera è caratterizzata da un singolo dominio in cui è racchiuso il centro catalitico [5].

Per quanto riguarda il sito attivo, sono state rilevate delle componenti essenziali, che sono i residui **Asp189** e **Ser190** che ottimizzano il riconoscimento della catena laterale della lisina ed il motivo **KRRK** nel **loop 99** che conferisce carica positiva che formalmente complementa con la carica negativa della sequenza di tetra-aspartato[3].

Durante l'attivazione del Tripsinogeno, la catena laterale della Lisina si inserisce profondamente nella tasca enzimatica specifica, in fondo alla quale l'aspartato neutralizza il gruppo amminico terminale [1].

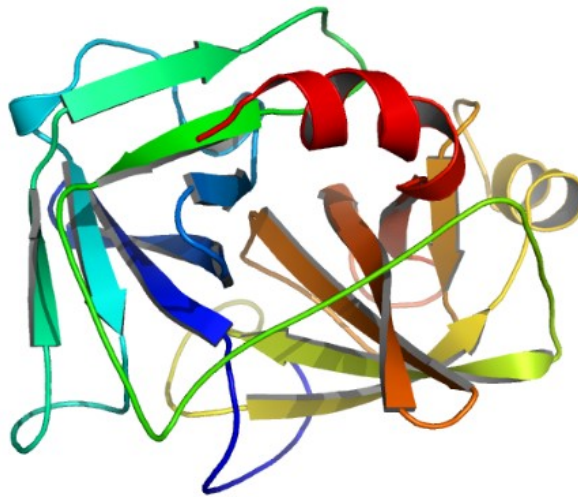


Figura 4. Struttura dell'Enterochinasi (Immagine tratta da chemwhat.it)

1.3 Sequenza amminoacidica

La sequenza amminoacidica dell'Enterochinasi è descritta in seguito, con particolare riferimento all'Enterochinasi bovina, la cui subunità catalitica è stata oggetto di studio nella presente tesi.

Il gene codificante la sequenza in questione (ID 282009, da *NCBI gene*) è localizzato sul cromosoma 1 ed è costituito da 26 esoni.

Nello specifico la sequenza evidenziata in verde rappresenta la catena leggera, mentre la restante parte corrisponde alla catena pesante, all'interno della quale la sequenza in giallo è relativa al dominio transmembrana dell'enzima.

>NP_776864.1:1-800 enteropeptidase precursor [Bos taurus]

MGSKRSVPSRHRSLTTYEVMFAVLFVILVALCAGLIAVSWLSIQGSVKDAA
FGKSHEARGTLKIISGATYNPHLQDKLSVDFKVLAFDIQQMIDDIFQSSNLK
NEYKNSRVLQFENGSIIVIFDLLFDQWVSDKNVKEELIQGIEANKSSQLVTFH
IDLNSIDITASLENFSTISPATTSEKLTTSIPLATPGNVSIECPPDSRLCADALKC
IAIDLFCDGELNCPDGSDEDNKTCATACDGRFLLTGSSGSFEALHYPKPSNN
TSAVCRWIIRVNQGLSIQLNFDYFNTYYADVLNIYEGMGSSKILRASLWSNN
PGIIRIFSNQVTATFLIQSDESDYIGFKVTYTAFNKELNNYEKINCNFEDGFC
FWIQDLNDDNEWERTQGSTFPPSTGPTFDHTFGNESGFYISTPTGPGRRER
VGLLTLPLDPTPEQAACLSFWYYMYGENVYKLSINISSDQNMECTIFQKEGN
YGQNWNYGQVTLNETVEFKVSFYGFKNQILSDIALDDISLTYGICNVSYPE
PTLVPTPPPELPTDCGGPHDLWEPNTTFTSINFPNSYPNQAFCIWNLNAQKG
KNIQLHFQEFDLNIADVVEIRDGEGDDSLFLAVYTGPGPVNDVFSTTNRMT
VLFITDNMLAKQGFKANFTTGYGLGIPEPCKEDNFQCKDGECIPLVNLCDGF
PHCKDGSDEAHCVRLFNGTTDSSGLVQFRIQSIWHVACAENWTTQISDDVC
QLLGLGTGNSSVPTFSTGGGPYVNLNTAPNGSLILTPSQQCLEDLILLQCNY
KSCGKKLVTQEVSPKIVGGSDSREGAWPVVVALYFDDQQVCGASLVSRD
WLVSAAHCVYGRNMEPSKWKA VLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYN
KRRKNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQPICLPEENQVFPPGRICSIAGWGALIY
QGSTADV LQEADVPLLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAGYEAGGV DSCQG
DSGGPLMCQENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH

1.4 “Proteina mosaico”

L'Enterochinasi possiede una complessa storia evolutiva e risulta conservata in tutti i vertebrati, dimostrando un ruolo di antica ed essenziale proteasi.

Inoltre, viene definita “*proteina mosaico*” in relazione alla presenza di diversi domini.

La catena pesante contiene cinque domini che sono correlati a quattro diversi motivi strutturali, rilevati in altre famiglie di proteine [5].

I **domini 1 e 4** sono correlati ad una ripetizione ricca di cisteina nel dominio ammino-terminale del recettore delle lipoproteine a bassa densità.

Il **dominio 2** è correlato a segmenti amminoacidici delle meprine α e β , che sono delle metallo-proteasi legate alla membrana dei glomeruli renali.

Il **dominio 3** è correlato a una serie di 120 amminoacidi ripetuti e relativi alla componente CO_r del sistema del complemento.

Il **dominio 5** possiede motivi ricchi in cisteina che si trovano anche nei recettori scavenger dei macrofagi.

Mentre, la catena leggera è omologa alle serina-proteasi simili alla Tripsina [7].

1.5 Utilizzo in ambito biotecnologico

La catena leggera dell'Enterochinasi viene spesso utilizzata in Ingegneria Genetica per separare i tag di affinità all'N-terminale delle proteine bersaglio [3].

In particolare, l'enzima ha mostrato un'ampia utilità nel taglio di proteine di fusione prodotte da *E. Coli*, che è l'organismo di prima scelta per la produzione di proteine ricombinanti grazie alla sua semplice ed economica manipolazione genetica [4]. Questo perché la proteasi è in grado di effettuare un taglio netto e pulito dopo la sequenza DDDDK.

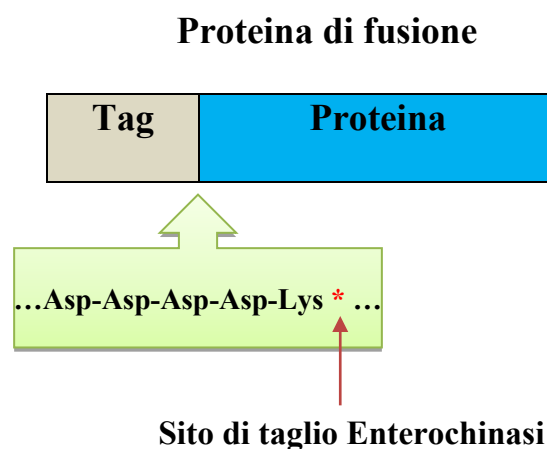


Figura 5. Rappresentazione del taglio specifico dell'Enterochinasi.

L'Enterochinasi è un potente strumento, ampiamente applicabile nelle Biotecnologie grazie all'alto grado di specificità, all'elevata efficienza proteolitica (milligrammi di Enterochinasi possono tagliare grammi di proteine ricombinanti [3]), alla tolleranza ad un'ampia gamma di condizioni di reazione ed infine non lascia residui amminoacidici indesiderati all' N-terminale in seguito al taglio.

Per quanto riguarda la tolleranza a diverse condizioni, l'enzima mostra buona attività in presenza di vari detergenti, denaturanti e in un ampio range di temperature (4-45°C) e di pH (4,5-9,5) [4].

In passato, l'uso era limitato all'Enterochinasi isolata da fonti animali, come bovini e suini.

Altro concetto, legato all'iniziale scarso utilizzo dell'enzima, è relativo ai contaminanti da proteasi, comunemente presenti anche nei cosiddetti *preparati altamente purificati* a partire dall'intestino. Queste proteasi spesso degradano i prodotti derivanti dai tagli delle proteine di fusione.

Con l'avvento della tecnologia delle proteine ingegnerizzate è stata introdotta la possibilità di ottenere Enterochinasi mediante espressione eterologa, ovvero espressione di una proteina specifica in un organismo che normalmente non la produce. L'enzima ricombinante è esente da attività proteolitiche contaminanti non specifiche e l'efficienza di taglio è superiore all'enzima di derivazione bovina [6].

Capitolo 2

CHEMOCHINE

Le **chemochine** o **citochine chemiotattiche** sono un gruppo di proteine a basso peso molecolare (8-14 kDa) implicate in numerosi processi.

Principalmente sono coinvolte nella risposta immunitaria, attivando i leucociti e dirigendo la loro migrazione nel sito di infiammazione [13].

2.1 Struttura

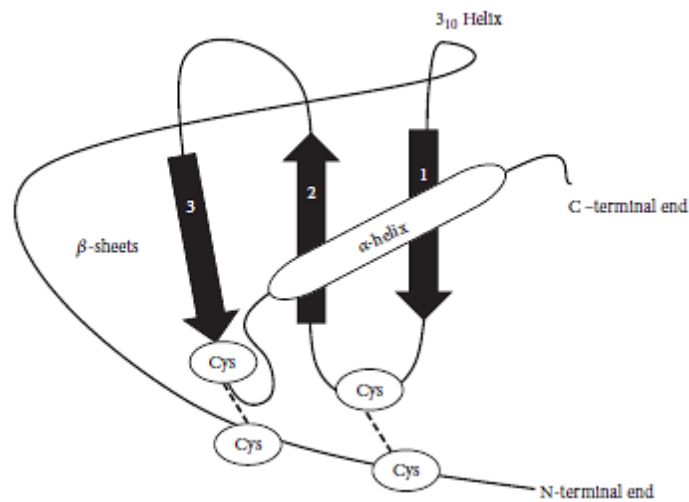


Figura 6. Rappresentazione schematica della struttura di una chemochina. (Immagine tratta da [13])

Le chemochine strutturalmente presentano tre β -strand antiparalleli, che formano un β -foglietto ai quali si sovrappone un' α -elica C-terminale.

Generalmente vi sono un totale di quattro cisteine: due all'estremità N-terminale, una al centro e una vicina all'estremità C-terminale.

La porzione che precede il primo β -foglietto consiste di 20 residui all'N-terminale, del motivo con le cisteine conservate, di un N-loop e di una singola elica 3_{10} .

Il primo legame disolfuro si verifica tra il primo residuo di cisteina conservato ed il residuo di cisteina nel loop tra il primo ed il secondo β -strand. Mentre il secondo ponte disolfuro si trova tra la seconda cisteina conservata e la cisteina posizionata nel loop del terzo β -strand. Questi ponti disolfuro danno stabilità alla struttura e capacità di associarsi con il recettore [13].

In particolare, le chemochine sono divise in quattro sottogruppi sulla base della posizione dei residui di cisteina conservati all'N-terminale.

Il più grande sottogruppo è quello delle chemochine **CC**, ovvero con due residui di cisteina conservati all'N-terminale. Le chemochine **C** possiedono, invece, un solo residuo di cisteina nella porzione ammino-terminale. Le chemochine **CXC** e **CX3C** hanno rispettivamente uno o tre diversi amminoacidi tra i due residui di cisteina conservati all'N-terminale [17].

2.2 Funzione

Funzionalmente le chemochine possono essere distinte in **infiammatorie** od **omeostatiche**, in base alla loro produzione rispettivamente **inducibile** o **costitutiva** [17].

Quelle omeostatiche sono prodotte nel timo e nei tessuti linfoidei e non hanno bisogno di essere attivate da stimoli esterni.

Le chemochine infiammatorie vengono rilasciate da diversi tipi di cellule sia della risposta immunitaria innata che adattativa. Queste ultime sono prodotte durante l'infezione o il danno e agiscono come chemio-attrattori per i leucociti, per il reclutamento dei monociti, dei neutrofili e di altre cellule effettrici dal sangue ai siti di infezione o di danno tissutale. La loro produzione è stimolata da citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina 1[13].

2.3 La chemochina CXCL12



Figura 7. Struttura di CXCL12. (Immagine tratta da Protein Data Bank)

La **chemochina CXCL12** è stata identificata per la prima volta come un prodotto delle cellule stromali del midollo osseo e di conseguenza è stata originariamente chiamata “*fattore derivato dalle cellule stromali -1*” (SDF-1).

La prima funzione identificata di CXCL12 è stata la sua attività mitogenica per i progenitori delle cellule B, da qui il nome “*fattore stimolante la crescita delle cellule pre-B*” (PBSF).

È ormai noto che questa citochina è costitutivamente espressa in molti tessuti, compresi organi immunitari primari e secondari, polmoni, fegato, timo, utero, intestino e anche nell’embrione, tanto da essere considerata una chemochina omeostatica, regolatrice del normale sviluppo e delle funzioni di non-emergenza.

Le cellule endoteliali e stromali del midollo osseo sono sorgenti costitutive di CXCL12 e la migrazione, il posizionamento e la ritenzione in nicchie delle cellule staminali ematopoietiche sono in parte mediati dalla segnalazione di CXCL12 attraverso il recettore CXCR4[15].

Tuttavia, CXCL12 può anche essere sovra-regolato in un contesto di infezione e infiammazione e quindi più correttamente dovrebbe essere definita come chemochina omeostatica/infiammatoria. È coinvolta in diversi processi patologici come le infezioni da HIV-1, la neo-vascularizzazione, la crescita tumorale, la formazione di metastasi e la chemio-resistenza [13].

2.3.1 Peculiarità di CXCL12

La chemochina CXCL12 appartiene al sottogruppo CXC, ma per diversi aspetti si distingue dagli altri membri che ne fanno parte.

Infatti, quasi tutti i geni per le chemochine CXC si trovano sul cromosoma 4q21, mentre il gene codificante CXCL12 si trova sul cromosoma 10q11.

CXCL12 è l'unica chemochina CXC caratterizzata da splicing alternativo dell'mRNA, dando origine nell'uomo alle varianti α , β , γ , δ , ϵ , θ e l'isoforma predetta *Iso-7*, ed è l'unica chemochina CXC ad essere processata più a livello post-traduzionale che tramite meccanismi trascrizionali.

Inoltre, CXCL12 appartiene ad un gruppo limitato di citochine e fattori di crescita che mostrano più del 90% di identità tra uomo e topo, sia a livello del genoma che a livello proteico e questo indica un importante ruolo biologico, che ha fornito una pressione evolutiva tale da prevenire mutazioni sulla proteina in questione. In effetti, la stabilità della struttura terziaria è dovuta alla presenza di amminoacidi conservati [17].

Altra particolarità riguarda il fatto che CXCL12 rappresenta l'unico ligando per il recettore CXCR4 [12].

2.3.2 Le isoforme di CXCL12

Le isoforme di CXCL12 finora scoperte sono sette: α , β , γ , δ , ϵ , θ e l'isoforma *Iso-7*, che rimane predetta.

Vi sono quattro esoni in totale ed i primi tre sono condivisi tra tutte le varianti di splicing, ma ognuna differisce dalle altre nella regione carbossi-terminale.



Figura 8. Porzione finale distintiva delle varie isoforme di CXCL12. (Immagine tratta da [13])

Infatti, la sequenza amminoacidica del quarto esone conferisce la lunghezza specifica di ciascuna isoforma (rispettivamente 89 aa, 93 aa, 119 aa, 149 aa, 90 aa, 100 aa e 103 aa).

```

α MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV
γ MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV
β MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV
θ MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV
δ MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV
ε MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIV
7 MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPCRFFESHYCTCLIRVSEHGATPLTQGSWV
***** . . !: ** . *

α -ARLKNNRQVCIDPKLWIQEYLEKALNK-----
γ -ARLKNNRQVCIDPKLWIQEYLEKALNKGREEKVGKKEKIGKKRQKKRKAQKRKN
β -ARLKNNRQVCIDPKLWIQEYLEKALNKRPKM-----
θ -ARLKNNRQVCIDPKLWIQEYLEKALNKIWLYGNAETSR-----
δ -ARLKNNRQVCIDPKLWIQEYLEKALNLI SAAPAGKRVIAGARLHPSPPRACPTAR
ε -ARLKNNRQVCIDPKLWIQEYLEKALNNC-----
7 LYSLSCAGGETGLREPGMVS PRVESHQEGRLGVPGPVNLGKA-----
* . . !: ! . !* !

α -----
γ -----
β -----
θ -----
δ ALCEIRLWPPPEWSWPSFGDV
ε -----
7 -----

```

Figura 9. Multi-allineamento delle sequenze amminoacidiche delle isoforme di CXCL12. (Immagine tratta da [13])

Le isoforme α , β ed ϵ differiscono per pochi amminoacidi, le isoforme δ e γ sono le più lunghe, mentre l'isoforma 7 è abbastanza diversa da tutte le altre [13].

Inoltre, la proprietà unica di esistere in sei varianti di splicing nell'uomo è legata al fatto che ciascuna variante possiede una diversa espressione, una particolare funzione ed una specifica distribuzione tissutale [17].

Isoforma α → non è presente nel sangue a causa della degradazione enzimatica a cui è sottoposta, ma è altamente espressa in tessuti come midollo osseo, pancreas, polmoni, cuore, linfonodi, timo, pelle, intestino tenue e neuroni.

Isoforma β → particolarmente correlata con il sistema vascolare, dove, grazie alle grandi differenze nel quarto esone, non viene degradata. Risulta altamente presente in organi vascolarizzati come la milza, il fegato, il midollo osseo, il pancreas, il rene e le cellule endoteliali dei micro-vasi cerebrali.

Isoforma γ → grazie alla regione C-terminale è l'isoforma con maggiore affinità per i glicosamminoglicani e con la possibilità di sfuggire all'inattivazione proteolitica. Risulta altamente espressa nel cuore e nel cervello.

Isoforma δ → è espressa nel pancreas, nel fegato, nella milza e nei polmoni.

Isoforme ϵ e θ → sono espresse nel cuore, nei reni e nel fegato [13].

2.3.3 Partner di interazione per le chemochine CXCL12

La chemochina CXCL12 risulta un fattore chiave sia in processi fisiologici che patologici [17].

Nel complesso, questa tipologia di citochine regola: il differenziamento, la distribuzione, l'attivazione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare.

CXCL12 svolge le sue funzioni interagendo specificatamente con il recettore a sette domini transmembrana accoppiato a proteina G, CXCR4, il recettore a sette domini transmembrana atipico, CXCR7 o ACKR3, e legandosi a glicosamminoglicani, GAG.

CXCL12 presenta una data percentuale di residui basici dispersi lungo l'N-terminale ed il corpo principale, che sono importanti per il legame con il recettore [12].

Le chemochine ed i loro recettori svolgono importanti ruoli nell'uomo e attraverso un gradiente di concentrazione agiscono come fattore chemiotattico che guida la migrazione delle cellule.

In questi recettori sono presenti amminoacidi idrofilici ed idrofobici, in quanto la struttura passa dall'ambiente extra-cellulare a quello intra-cellulare.

Si ha una regione N-terminale breve che consente la specificità di legame del ligando, sette domini transmembrana che portano alla formazione di tre anse extra-cellulari e tre anse intra-cellulari ed infine una regione C-terminale adatta per la regolazione del recettore e per il legame, generalmente, alla proteina G [13].

Quest'ultima innesca, dopo l'attivazione del recettore ed il cambio conformazionale, la trasduzione del segnale e successivamente la risposta cellulare.

2.3.3.1 Recettore CXCR4

Il recettore **CXCR4** è stato scoperto inizialmente come cofattore essenziale per l'entrata nella cellula del Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV-1), che tramite la glicoproteina 120 sull'envelope prende contatto con il recettore CD4 ed il co-recettore CXCR4 sulla cellula ospite.

Nello stesso periodo si è dimostrato che la chemochina CXCL12 funge da ligando naturale di questo recettore con un possibile ruolo nel bloccare l'infezione dei linfociti T da parte dei ceppi di HIV-1 [15].

Il gene codificante CXCR4 si trova sul cromosoma 2 e, basandosi sulla connessione CXCL12/CXCR4, il recettore è stato classificato come recettore per le chemochine [13].

L'importanza di CXCR4 è legata alla scoperta di un numero sempre crescente di tipi cellulari che lo esprimono sulla loro superficie. Queste cellule comprendono la maggior parte del sottogruppo di leucociti, le cellule staminali e progenitrici ematopoietiche, le cellule degli organi linfoidei come midollo osseo, timo e linfonodi, le cellule endoteliali, le cellule stromali (fibroblasti) ed epiteliali del midollo osseo, polmone, intestino tenue [17].

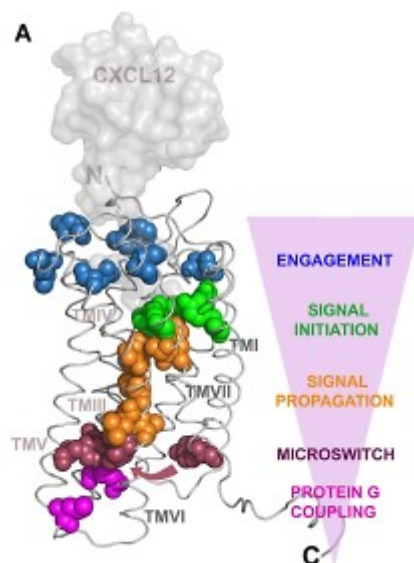


Figura 10. Rappresentazione dell'interazione CXCL12-CXCR4 e steps di avvio del segnale. (Immagine tratta da [12])

Il legame di CXCL12 alle porzioni extra-cellulari di CXCR4 induce un cambiamento conformazionale della struttura terziaria del recettore tale da indurre l'attivazione della proteina G eterotrimerica accoppiata.

La proteina G, rilasciando GDP e sostituendolo con GTP, dissocia in due componenti: il monomero alfa (caricato con GTP) e l'eterodimero beta-gamma (attivatore di effettori a valle), che sono legate alla sequenza amminoacidica **DRYLAIV** nella seconda ansa intracellulare del recettore [12].

Quindi, in seguito all'attivazione di CXCR4 viene indotta la trasduzione del segnale accoppiata a proteina G. Da qui si avvia una complessa cascata di segnali che coinvolgono diverse vie, terminando con la migrazione cellulare, l'attivazione di molecole di adesione, la chemiotassi, la trascrizione genica, la neo-vascolarizzazione, la sopravvivenza e la proliferazione cellulare.

Queste segnalazioni cellulari possono essere correlate anche allo sviluppo del cancro, in quanto CXCR4 può promuovere anche la vascolarizzazione del tumore e agire come fattore di sopravvivenza e crescita delle cellule tumorali [17].

CXCR4 esiste nella membrana plasmatica come monomero, dimero o oligomeri di ordine superiore. Inoltre, può interagire con recettori per chemochine come ACKR3, CCR5, CCR2 e altre proteine sulla superficie cellulare come CD4.

Questa ampia varietà di interazioni prevede un elevato potenziale di segnale e diversità per CXCR4 [14].

Successivamente al legame CXCL12/CXCR4, il recettore viene internalizzato e degradato nei lisosomi, portando a una minore espressione di CXCR4 sulla membrana cellulare [17].

2.3.3.2 Recettore ACKR3

ACKR3 è un recettore atipico in grado di legare CXCL11 e CXCL12 con elevata affinità. In particolare, il legame con CXCL12 avviene con una affinità dieci volte superiore a quella per CXCR4 [13]. In questo modo ACKR3 partecipa attivamente al mantenimento dei gradienti CXCL12, che hanno una importanza critica per la migrazione delle cellule.

Il gene per ACKR3 è localizzato sul cromosoma 2 ed è espresso su molti tipi di cellule, tra cui le cellule ematopoietiche, le cellule progenitrici neuronali e le cellule endoteliali. È altamente espresso sulla superficie cellulare dei linfociti T, durante i

processi di chemiotassi mediati da CXCL12. Questo meccanismo si traduce in diversi aspetti biologici, come la regolazione della risposta immunitaria e la migrazione di linfociti T, di cellule staminali e di cellule progenitrici neurali.

La trasduzione del segnale indotta da ACKR3 non viene avviata attraverso la classica proteina G, ma inizia con la β -arrestina, per questo motivo è classificato come recettore atipico per le chemochine [17].

Infatti, non contiene il motivo canonico DRYLAIV, coinvolto nell'accoppiamento con la proteina G, ma contiene la sequenza **DRYLSIT** [12].

Oltre alle sue proprietà di segnalazione, ACKR3 ha principalmente una funzione di scavenging e rimuove CXCL12 dall'ambiente.

Il sequestro risulta molto efficiente in quanto, a differenza del recettore CXCR4, il recettore ACKR3 una volta internalizzato non viene eliminato, ma viene riciclato sulla membrana plasmatica. Si tratta di un recettore che viaggia continuamente tra membrana plasmatica e citoplasma.

Alcuni ritengono che questo recettore abbia un ruolo pro-tumore perché induce migrazione cellulare e proliferazione. In effetti, l'attivazione di ACKR3 media l'aumento della sopravvivenza e dell'adesione cellulare, importanti fattori se si considera la stimolazione della crescita del tumore.

Altri invece riconoscono un ruolo antitumorale perché il recettore può impedire il legame della chemochina con CXCR4, mediante lo scavenging di CXCL12 [13].

2.3.3.3 I glicosamminoglicani

Importanti partner di interazione per le chemochine, oltre ai loro recettori, sono i **glicosamminoglicani (GAG)**, come l'eparina e l'eparan solfato.

Queste componenti giocano un ruolo importante nell'evitare la degradazione delle chemochine, nello stabilizzare il legame al recettore e nella generazione di gradienti di chemochine. Quindi si tratta di componenti critici per l'attività chemiotattica delle chemochine [17].

I glicosamminoglicani sono polimeri lunghi e non ramificati di unità disaccaridiche solfatate cariche negativamente e con un'enorme eterogeneità.

Per essere biologicamente attivo, CXCL12, inizialmente secreto come pro-peptide, viene sottoposto alla rimozione proteolitica di 21 amminoacidi presenti all'estremità N-terminale. Questa forma monomerica matura è instabile a livello ematico e tende al legame con i glicosamminoglicani per sfuggire alla degradazione proteolitica [13].

Il legame tra queste due componenti favorisce l'omodimerizzazione o l'eterodimerizzazione di CXCL12, proteggendo l'N-terminale dal troncamento e dalla inattivazione e in generale proteggendo la chemochina dalle modifiche post-traduzionali [17].

2.3.4 Regolazione dell'attività di CXCL12

Considerato che CXCL12 è una chemochina cruciale in molti processi omeostatici, quali neurogenesi, embriogenesi, angiogenesi e linfopoiesi, e svolge un ruolo anche nei processi infiammatori, la sua attività viene strettamente controllata.

L'espressione e l'attività di CXCL12 sono regolate principalmente da tre fattori [17]:

- L'**ipossia** è una componente caratteristica degli stadi di infiammazione ed induce l'espressione di CXCL12 da parte di cellule endoteliali e fibroblastiche. CXCL12 è continuamente prodotta da diversi tipi di cellule, ma in condizioni di ipossia e arresto della crescita vi è un aumento di espressione. Ad esempio, è necessario aumentare la produzione di CXCL12 per aumentare l'angiogenesi, per aiutare la guarigione dei tessuti e per la riparazione delle ferite. In queste situazioni il fattore-1 inducibile dall'ipossia (HIF-1) sovra-regola la produzione di CXCL12 da parte delle cellule endoteliali, con conseguente maggiore attrazione delle cellule progenitrici. Questa sovra-regolazione per ipossia si verifica anche durante lo sviluppo del cancro, promuovendo l'angiogenesi.
- Il **recettore atipico ACKR3** è in grado di funzionare da scavenger, influenzare il gradiente delle chemochine e ridurre l'infiammazione. Infatti, sequestra ed internalizza CXCL12 per consentire l'attivazione di percorsi a valle. Dopo che CXCL12 è stata internalizzata dal recettore, viene digerita a livello lisosomiale. Si ipotizza che ACKR3 promuova la crescita del tumore

e la formazione di metastasi eliminando CXCL12 dal microambiente tumorale. In tal modo, le cellule tumorali CXCR4+, rimangono reattive a CXCL12 e possono passare dal tumore primario alla metastatizzazione in altri organi che esprimono CXCL12.

- Per quanto riguarda le **modificazioni post-traduzionali**, che alterano la funzione di CXCL12, queste coinvolgono modificazioni chimiche ed enzimatiche, come la rimozione proteolitica di aminoacidi all’N- o C-terminale, la citrullinazione di residui di arginina o la nitratura di residui di tirosina, tutte modifiche che riducono l’attività di CXCL12.

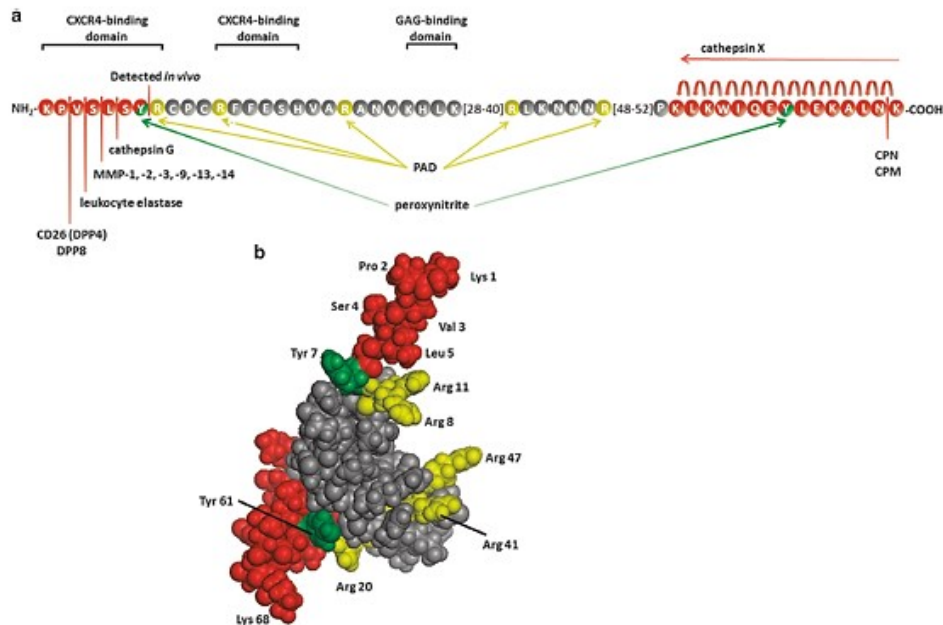


Figura 11. Residui coinvolti nelle modificazioni post-traduzionali di CXCL12. (Immagine tratta da [17])

2.3.5 CXCL12 e cancro

Sono stati effettuati molti studi per comprendere il ruolo pro-tumorale o anti-tumorale di CXCL12. In particolare, sembra promuovere la proliferazione e l'invasione delle cellule tumorali [14].

Tuttavia, esistono ancora discrepanze per quanto riguarda i risultati degli esperimenti e ciò è dovuto all'esistenza di almeno sei forme di splicing di CXCL12, ciascuna con ruoli differenti.

Recentemente, la **via di segnalazione CXCL12/CXCR4** è emersa come potenziale bersaglio terapeutico nei confronti del tumore umano visto il suo ruolo critico nell'iniziazione e nella progressione del tumore, attivando molteplici vie di segnalazione.

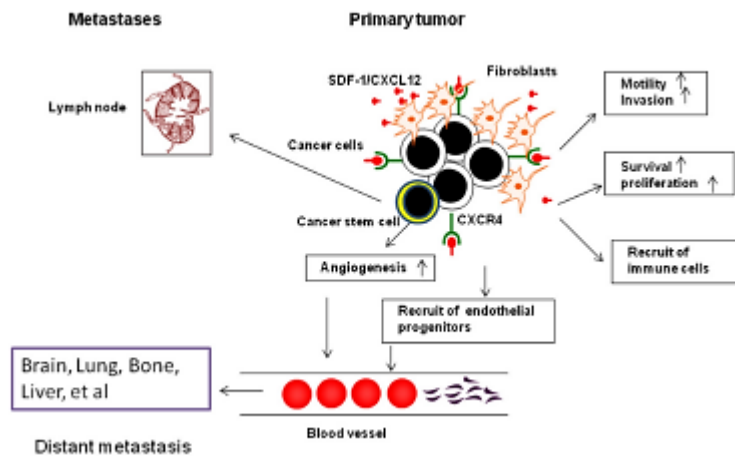


Figura 12. Schema esplicativo dell'importanza dell'asse CXCL12/CXCR4 nello sviluppo del tumore. (Immagine tratta da [14])

L'espressione di CXCR4 sulle cellule di diverse neoplasie implica che la via CXCL12/CXCR4 possa influenzare la biologia del cancro e svolga un ruolo

fondamentale nella metastatizzazione di cellule tumorali CXCR4+ agli organi che esprimono CXCL12.

Inoltre, il microambiente del midollo osseo facilita la sopravvivenza, il differenziamento e la proliferazione delle cellule ematopoietiche normali, maligne e di metastasi ossee di cellule tumorali epiteliali.

Fattori prodotti dal midollo osseo, come CXCL12 e l'interleuchina 6, mediano la diffusione, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali e l'adesione mediata da integrine sequestra le cellule tumorali in questa nicchia.

La via CXCL12/CXCR4 è responsabile della ritenzione di componenti nel midollo osseo nella leucemia linfoide acuta e nella leucemia mieloide acuta.

Inoltre, viene indotta una resistenza ai farmaci dal microambiente piuttosto che dai cambiamenti genetici ed epigenetici indotti dai farmaci. Quindi è una forma di **farmacoresistenza de novo**, in cui il midollo osseo fornisce protezione alle cellule tumorali da agenti chemioterapici [19].

L'interruzione del legame CXCL12/CXCR4 è essenziale per l'uscita di cellule ematopoietiche staminali e progenitrici dal midollo osseo in circolazione.

Sono stati prodotti degli antagonisti di CXCL12/CXCR4 che hanno mostrato risultati incoraggianti nell'attività antitumorale [14].

2.3.5.1 Importanza della variante δ nel cancro al seno e al pancreas

Quasi tutti i geni umani subiscono splicing alternativo, aumentando sostanzialmente la diversità strutturale e funzionale delle proteine.

L'analisi di diversi tipi di cancro ha dimostrato ampie perturbazioni nello splicing durante l'insorgenza del tumore e lo sviluppo di metastasi, dimostrando come uno splicing alterato sia fondamentale per la malignità.

Tutte le isoforme di CXCL12 risultano correlate con l'insorgenza e lo sviluppo del tumore.

In particolare, l'**isoforma δ** presenta un'importanza clinica non indifferente. Questa variante di CXCL12 non è ben caratterizzata in letteratura e risulta poco correlata con il pattern di espressione delle altre isoforme.

La particolare chemochina ed i suoi recettori CXCR4 e ACKR3 comprendono un'asse di segnalazione fortemente legata alla crescita e metastatizzazione del **cancro al seno**. Sono espressi alti livelli di CXCL12 nei comuni siti di metastasi del cancro al seno, come polmone, fegato, ossa e cervello [18].

Studi effettuati su modelli murini di cancro suggeriscono che i gradienti di questa chemochina guidano l'invasione locale delle cellule tumorali e successivamente l'invasione in sedi secondarie.

Si è notato che l'espressione delle varie chemochine risulta diminuita nel tessuto tumorale rispetto a quello sano. Allo stesso modo CXCR7 risulta sotto-regolato nel cancro, mentre CXCR4 risulta sovra-regolato.

Negli esiti clinici si è visto che una bassa espressione di CXCL12 δ risulta connessa con una peggiore sopravvivenza generale.

Inoltre, si è evidenziato, sia nel cancro al seno che nel cancro al pancreas, un silenziamento epigenetico del promotore CXCL12 nelle cellule tumorali con

maggiore potenziale metastatico. La riespressione di CXCL12 limita la malattia metastatica, in quanto porta ad una significativa diminuzione della crescita del tumore e della migrazione, con aumento di sopravvivenza [13].

Per quanto riguarda l'**adenocarcinoma duttale pancreatico** è uno dei tumori gastrointestinali più aggressivi.

L'elevata mortalità è legata alla mancanza di marcatori diagnostici per la malattia nelle fasi iniziali. Infatti, la patologia viene spesso diagnosticata nella fase avanzata.

Inoltre, si tratta di un tumore che presenta una elevata resistenza ai farmaci antitumorali [10].

Ultimamente ci si è soffermati sul microambiente del tumore al pancreas, che è composto da una grande porzione di stroma, che circonda le cellule tumorali.

Per mantenere un ambiente favorevole alla sopravvivenza delle cellule tumorali, le cellule stromali secernono componenti extra-cellulari, come le citochine.

Nel tumore al pancreas, la chemochina CXCL12 è un messaggero chiave nella comunicazione tra cellule tumorali e cellule stromali.

In particolare, i fibroblasti associati al cancro, che rappresentano il 50% dello stroma tumorale, vengono attivati da molecole rilasciate dalle cellule tumorali, in particolare le interleuchine 6 e 10 e diversi fattori di crescita. Una volta attivati sono in grado di rilasciare le chemochine CXCL12, che legano i propri recettori altamente espressi sulla superficie delle cellule tumorali.

Questo legame permette l'attivazione di numerose vie di segnalazione, che supportano la crescita del tumore, l'invasione, la resistenza alla terapia farmacologica, e fornisce possibili nicchie protettive nei confronti del sistema immunitario e permissive per lo sviluppo di metastasi.

Anche in questo caso la variante δ di CXCL12 ha mostrato un ruolo cruciale nella progressione del cancro [13].

2.3.6 CXCL12 e guarigione delle ferite

La compromissione della chiusura delle ferite è un problema medico crescente, associato a malattie metaboliche ed invecchiamento.

Una ferita aperta nella pelle può causare gravi disagi e permettere l'ingresso di batteri invasori.

Durante la fase infiammatoria di guarigione della ferita, le cellule immunitarie si accumulano in risposta a segnali di allarme, come citochine e chemochine rilasciate dalle cellule danneggiate o attivate.

Le cellule immunitarie hanno un ruolo importante nella guarigione delle ferite, seguendo le istruzioni del microambiente.

La chemochina CXCL12 è associata ad effetti benefici in ferite cutanee e lega CXCR4, espresso da cellule immunitarie e cheratinociti.

Macrofagi e neutrofili rappresentano le principali popolazioni di cellule immunitarie nel sito della ferita, dove sono importanti sia per contrastare l'invasione di

microrganismi sia per aiutare il processo di guarigione secernendo ulteriori chemochine, fattori di crescita ed enzimi.

È stato effettuato un esperimento somministrando localmente alle ferite dei lattobacilli ingegnerizzati per rilasciare CXCL12.

Ciò che è stato osservato è stato un miglioramento della chiusura della ferita, con aumento della proliferazione di cellule dermiche e dei macrofagi, che hanno portato ad un aumento del fattore TGF- β .

TGF- β è una molecola segnale centrale nel ripristino dei tessuti, in quanto stimola la chemiotassi, l'angiogenesi, la deposizione di matrice extracellulare. Di conseguenza, i macrofagi alimentano il ripristino dei tessuti, essendo la principale fonte di TGF- β .

Ciò crea un rilascio prolungato e una maggiore biodisponibilità di chemochine all'interno della ferita. Con la sovra-espressione locale di CXCL12 le cellule immunitarie che guidano la guarigione sono state rafforzate e il processo è stato accelerato [16].

2.3.7 CXCL12/CXCR4 e neutrofili

CXCL12 è un mediatore critico per la mobilitazione dei neutrofili dal midollo osseo al flusso sanguigno, in condizioni infiammatorie, e successivamente per il ritorno al midollo osseo, milza, polmoni o al fegato per apoptosi e *clearance* al termine della loro vita.

I neutrofili sono attori essenziali della risposta immunitaria e la loro funzione è strettamente dipendente dal loro traffico.

Infatti, in condizioni omeostatiche hanno una breve emivita e un numero costante mantenuto per garantire un reclutamento tempestivo durante l'infiammazione.

Le chemochine hanno un ruolo nel differenziamento, eterogeneità ed attivazione dei neutrofili.

I neutrofili rispondono alle chemochine mediante il legame di queste ultime ai recettori, prevalentemente del tipo CXC, presenti sulla loro superficie cellulare.

Vi è il recettore CXCR4, essenziale per il ciclo vitale dei neutrofili, che riconosce le chemochine CXCL12.

CXCL12 è costitutivamente prodotta dalle cellule stromali del midollo osseo e fornisce un segnale di ritenzione per i progenitori dei neutrofili e per i neutrofili immaturi ed un segnale di ritorno per i neutrofili invecchiati CXCR4+.

In condizioni normali si hanno i neutrofili circolanti che esprimono bassi livelli di CXCR4, che è invece sovra-regolato nei neutrofili senescenti prima dell'apoptosi, promuovendo il loro lento ritorno al midollo osseo e ad altri organi per la clearance.

L'interazione CXCL12/CXCR4 mantiene un ampio pool di neutrofili nel midollo osseo. Ciò è dimostrato da un esperimento di delezione genetica di CXCR4 in cellule mieloidi murine, che risulta in un esaurimento del pool del midollo osseo e nel concomitante aumento dei neutrofili circolanti [11]. Al contrario, la WHIM, che porta ad una mutazione con guadagno di funzione, produce una neutropenia cronica per aumento della ritenzione dei neutrofili nel midollo osseo [15].

SCOPO

L'**Enterochinasi** o enteropeptidasi è una serina proteasi, responsabile di una scissione specifica dei suoi substrati in seguito al riconoscimento della sequenza *(Asp)⁴ Lys*.

Grazie alla sua specificità e alla sua modalità di taglio, l'enzima è largamente utilizzato in Ingegneria Genetica come strumento per la produzione di proteine ricombinanti, in quanto il taglio della catena polipeptidica avviene immediatamente a valle della sequenza riconosciuta e non lascia residui amminoacidici aggiuntivi. Questa caratteristica risulta molto utile nel caso in cui le proteine ricombinanti necessitano, per la loro attività, il mantenimento dell'estremità N-terminale originale.

Per le applicazioni biotecnologiche, di particolare interesse è la catena leggera, che contiene il dominio catalitico coinvolto nel riconoscimento e nel taglio del substrato. Per questo motivo diversi ricercatori hanno clonato il dominio catalitico sia dell'Enterochinasi umana sia dell'Enterochinasi bovina, ma l'espressione in larga scala, tentata con diversi organismi, non è ancora molto efficiente e quindi il costo dell'enzima ricombinante è elevato.

Il progetto di tesi, svolto presso il **New York – Marche Structural Biology Center (NY-MaSBiC)**, si è incentrato sulla produzione della catena leggera dell'Enterochinasi bovina per via ricombinante in *E. Coli*.

Grandi quantità di questo enzima sono necessarie per il completamento di un progetto sulla produzione delle isoforme della chemochina CXCL12.

Le chemochine sono già state clonate come prodotto di fusione con la MBP, che ha permesso la produzione in forma solubile, utilizzando un vettore pMCSG9 modificato.

La modifica del vettore ha permesso la sostituzione del sito riconosciuto dalla proteasi TEV con quello riconosciuto dall'Enterochinasi, in modo da produrre le chemochine con la loro specificità N-terminale, necessaria per il riconoscimento dei recettori e quindi indispensabile per la loro funzione.

Tra le sette isoforme di CXCL12 finora individuate, il lavoro di tesi si è incentrato sulla δ , che risulta molto poco descritta in letteratura, con un profilo di espressione che la distingue dalle altre isoforme ed una particolare connessione con la progressione del cancro.

La **CXCL12 δ** è stata prodotta per via ricombinante, ma in modo poco efficiente rispetto alle altre isoforme, poiché richiedeva uno step aggiuntivo nella purificazione e precipitava dopo il taglio per la rimozione del Tag. Quindi, il lavoro per questa tesi si è concentrato sulla ottimizzazione della sua purificazione e la proteina prodotta è stata utilizzata per determinare l'attività dell'Enterochinasi *home-made*.

Facendo riferimento alle informazioni presenti in letteratura sono state valutate le strategie di clonaggio, di espressione e di purificazione più idonee all'ottenimento di proteine correttamente foldate e funzionanti.

La produzione della chemochina CXCL12 δ ricombinante, non ancora descritta in letteratura, apre la strada a numerose applicazioni, *in primis* la produzione di anticorpi specifici per questa isoforma, necessari per chiarire il suo coinvolgimento nei processi sia fisiologici sia patologici all'interno dell'organismo.

Una volta definito il suo ruolo, la proteina ricombinante funzionalmente attiva potrebbe essere utilizzata per scopi terapeutici.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

Una delle applicazioni sempre più in uso nell'ambito biotecnologico è la produzione di **proteine ricombinanti**, ovvero proteine prodotte sfruttando la tecnica della ricombinazione del DNA, e sono generalmente prodotte in un organismo eterologo.

L'**espressione eterologa** è un processo che permette l'espressione di proteine specifiche in un organismo che normalmente non le produrrebbe.

Per ottenere proteine ricombinanti occorre clonare il gene codificante la proteina di interesse in specifici vettori di espressione che contengano i segnali necessari per la sua trascrizione e traduzione.

Dopo aver inserito la sequenza di DNA nel vettore, occorre trasformare, ossia inserire il vettore all'interno del sistema cellulare prescelto.

Sono impiegati: batteri, lieviti, cellule di mammifero o insetto. La scelta del sistema cellulare dipende dal tipo di proteina ricombinante che si vuole ottenere.

I **batteri**, come *E. Coli*, sono facilmente manipolabili, economici, modificabili in tempi rapidi. Tuttavia, le proteine prodotte nei batteri sono prive delle corrette modificazioni post-traduzionali.

I **lieviti**, come *Pichia pastoris* o *Saccaromices cerevisiae*, sono utilizzati perché hanno basse esigenze colturali, sono veloci nella crescita e facili da manipolare geneticamente. Hanno inoltre la capacità di effettuare alcune modifiche post-

traduzionali semplici come la glicosilazione. Tuttavia, mancano di alcuni “pathway” di modificazione post-traduzionale che possono essere importanti quando la proteina ricombinante è di origine animale.

Alcune linee cellulari di **insetto** offrono molti vantaggi come cellule ospiti per la produzione di proteine ricombinanti, tra cui il raggiungimento di densità cellulari elevate. Tuttavia, vi sono anche svantaggi, ad esempio la limitata capacità di processamento di determinati tipi di proteine e l’accumulo di proteine insolubili all’interno delle cellule.

Le **cellule di mammifero** possono essere gli ospiti preferiti per la produzione di proteine ricombinanti. Tuttavia, la coltivazione di cellule di mammifero è lenta, costosa e difficilmente consente l’ottenimento di proteine ad alta resa.

3.1 Sistema di espressione procariotico

Per far esprimere una proteina in un batterio serve una molecola di DNA circolare, definita vettore o plasmide, che possa essere efficientemente replicata all’interno della cellula ospite.

La molecola di DNA deve essere circolare, come il genoma del batterio, per non essere degradata dai meccanismi di difesa dell’ospite contro il DNA estraneo, e deve contenere un’**origine di replicazione** simile a quella del suo ospite per garantire la replicazione del DNA e determinare il numero di copie del gene clonato.

Affinché il vettore venga mantenuto efficacemente all'interno della cellula ospite, questo deve conferire un vantaggio ai batteri che lo acquisiscono: in genere la capacità di sopravvivere in presenza di un antibiotico altrimenti nocivo per l'ospite. Il **marker di selezione** è la componente del vettore che conferisce la resistenza all'antibiotico.

Il vettore contiene una sequenza con funzione di **promotore** e una sequenza che consiste in un segnale di riconoscimento per i ribosomi, **RBS**, sufficienti a garantire rispettivamente la trascrizione (generalmente inducibile e quindi possibile solo quando viene aggiunto un induttore specifico) e la traduzione del gene di interesse localizzato a valle.

Ovviamente nel vettore devono essere presenti anche il **terminatore di trascrizione** ed il **codone di stop**, a valle del gene di interesse, per porre fine a trascrizione e traduzione.

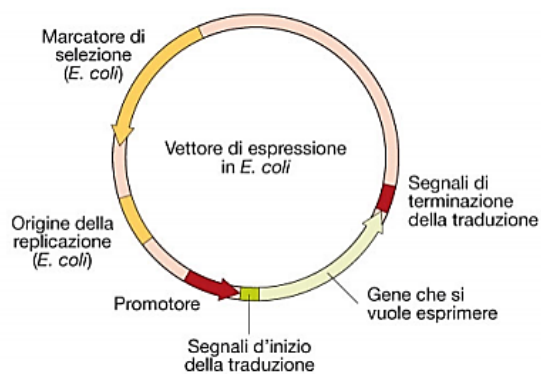


Figura 13. Rappresentazione del vettore di espressione. (Immagine tratta da "Biologia Molecolare", Amaldi, Benedetti, Pesole, Plevani, 2011, Casa Editrice Ambrosiana)

3.2 Scelta del vettore

Il plasmide utilizzato in laboratorio sia per il processo di clonaggio che per l'espressione è il **pMCSG9**.

Questo plasmide contiene una serie di elementi essenziali:

- Il promotore forte T7;
- L'operone Lac per consentire l'espressione inducibile;
- Le sequenze RBS (ribosome binding site) per la traduzione;
- Il tag di istidine per la purificazione della proteina di interesse;
- MBP (maltose binding protein), utilizzata come ulteriore tag in quanto agisce come chaperone facilitando il *fold*ing della proteina ricombinante;
- Il sito di taglio per la proteasi TEV;
- Il sito di clonaggio LIC;
- Il codone di STOP;
- Il terminatore T7.

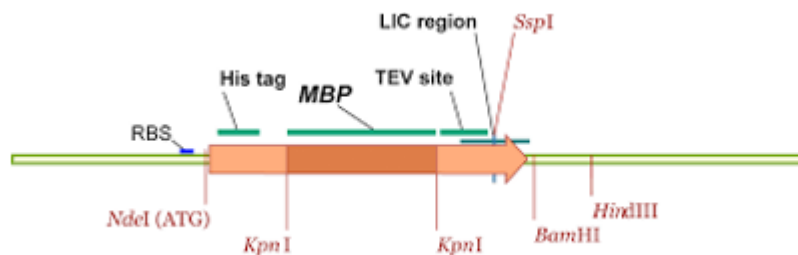


Figura 14. Alcuni elementi essenziali del vettore pMCSG9. (Immagine tratta da [25])

3.2.1 Modifiche del vettore pMCSG9

Il taglio della proteasi **TEV** consente la purificazione della proteina ricombinante, separandola dal tag. In particolare, la proteasi TEV riconosce il sito di taglio all'interno della sua sequenza bersaglio e di conseguenza lascia all'N-terminale della proteina ricombinante almeno due residui amminoacidici.

Le chemochine CXCL12 e l'Enterochinasi hanno bisogno dell'N-terminale naturale intatto per poter svolgere la loro funzione. Di conseguenza, il sito di riconoscimento per la TEV è stato sostituito con quello per l'**Enterochinasi**, che, in seguito al taglio della sequenza specifica, lascia un N-terminale identico all'originale, senza residui aggiuntivi.

3.3 Quantizzazione del plasmide pMCSG9 al NanoDrop

Il **NanoDrop** è uno spettrofotometro UV-VISIBILE, che permette di rilevare l'intero spettro tra 220 e 750 nm.

La concentrazione di dsDNA viene calcolata utilizzando la legge di *Lambert-Beer*. La legge correla la quantità di luce assorbita da una sostanza con la sua concentrazione, con la sua natura chimica e con lo spessore del mezzo attraversato.

Il volume di campione necessario per la lettura è piuttosto esiguo (1 µl), pertanto è possibile determinare la concentrazione anche di campioni presenti in quantità ridotta.

Per determinare la purezza dell'acido nucleico (lettura a 260 nm) vengono utilizzati i seguenti rapporti:

- rapporto **A260/A280** → indice della contaminazione da proteine. Per il DNA il rapporto deve essere 1.6-1.8 mentre per l'RNA 1.8-2.0, rapporti superiori indicano una contaminazione da proteine.
- rapporto **A260/A230** → indice della contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi). Il valore ottimale di questo rapporto è circa 2.2, rapporti inferiori indicano contaminazioni da solvente.

In seguito all'analisi al NanoDrop, il plasmide pMCSG9 è risultato essere 90 ng/μl.

Diluito successivamente 1:10 per ottenere 9 ng/μl.

Questo perché la trasformazione plasmide-cellula competente risulta efficiente quando il plasmide è nell'ordine 0,1-10 ng/μl.

3.4 Trasformazione chimica delle cellule competenti GC-5 per la propagazione del plasmide pMCSG9

Le **cellule GC-5** sono cellule competenti, ovvero cellule idonee ad accettare materiale genetico. Queste cellule sono state prelevate da -80°C e scongelate in ghiaccio.

In particolare, sono stati aliquotati 50 μl di cellule e 2 μl di plasmide, in quanto la proporzione da mantenere per la trasformazione è 1 μl di plasmide ogni 20 μl di cellule.

La trasformazione è stata effettuata mediante **Shock Termico**:

- In ghiaccio per 15-30 minuti;

- Shock Termico a 42°C per 45 secondi in bagnetto termostato;
- In ghiaccio per 2 minuti;
- Aggiunta di 450 ul di SOC medium (diluizione 1:10), che essendo un brodo ricco aiuta le cellule nella fase di recupero post-trasformazione;
- Incubazione a 37°C per 1 ora a 300 RPM;
- Inoculazione dei cloni trasformati in terreno solido LB+Amp100 (ampicillina 100 µg/µl);
- Incubazione statica over night a 37°C.

Le cellule in grado di crescere nel terreno contenente ampicillina sono quelle con il plasmide pMCSG9, che conferisce la resistenza all'antibiotico.

Terreni utilizzati:

SOC medium	LB agar	LB Luria-Broth-Lennox Medium
2% Tryptone	1% Tryptone	1% Tryptone
0,5% Yeast Extract	0,5% Yeast Extract	0,5 % Yeast Extract
10 mM NaCl (Stock 5M)	1% NaCl	1% NaCl
2,5 mM KCl (Stock 1M)	1,5% Agar	
20 mM MgSO4 (Stock 1M)		
10 mM MgCl2 (Stock 1M)		
20 mM Glucose (Stock 1 M)		

3.4.1 Preparazione del pre-inoculo e dell'inoculo

Per il pre-inoculo, è stata prelevata una colonia isolata dalla piastra contenente i cloni che hanno acquisito il plasmide pMCSG9, è stata trasferita in 2 ml di LB+Amp100 ed incubata a 37°C a 200 RPM, over day.

Per l'inoculo, sono stati prelevati 50 µl dal pre-inoculo, trasferiti in 50 ml di LB+Amp100 ed incubati a 37°C a 200 RPM, o.n.

In questo modo si aumenta la quantità di cellule e conseguentemente di plasmide.

3.5 Purificazione del DNA plasmidico

Il campione post-incubazione è stato centrifugato a 4500 RPM per 20 minuti, è stato eliminato il sopranatante, ottenendo in questo modo il pellet, mantenuto in ghiaccio.

Per la purificazione del plasmide è stato utilizzato il kit *QIAGEN*.

Questo approccio si basa sulla lisi delle cellule in condizioni alcaline con conseguente denaturazione del DNA, seguita da rapida rinaturazione. In questo modo il DNA batterico forma aggregati insolubili, mentre il DNA plasmidico rimane in soluzione. Successivamente il DNA plasmidico viene purificato mediante assorbimento su membrana di silice in adeguate condizioni di forza ionica.

In seguito alla procedura di purificazione è stata effettuata la lettura al NanoDrop:

pMCSG9 = 135 ng/µl

3.6 Clonaggio LIC

La sigla LIC sta per “**Ligation Independent Cloning**”. Si tratta di una tecnica economica ed alternativa al clonaggio con enzimi di restrizione e ligasi.

In particolare, il vettore e l'inserto si modificano con delle estremità a singolo filamento da 18-22 nt in grado di appaiarsi tra loro: il vettore possiede già delle sequenze LIC che vengono esposte in seguito al taglio con un enzima di restrizione, mentre per l'inserto si generano delle estremità LIC mediante l'amplificazione con dei primer, che contengono le sequenze LIC.

Per generare le estremità a singolo filamento, la componente essenziale in questo approccio è la T4 DNA polimerasi che possiede sia attività polimerasica 5' → 3' sia attività esonucleasica 3' → 5'.

In assenza di nucleotidi prevale l'attività esonucleasica e se è disponibile un solo dNTP, l'enzima rimuove tutti i nucleotidi eccetto quello presente. Per questo, le sequenze LIC sono formate da soli tre nucleotidi e le estremità LIC sono delimitate dalla presenza di un nucleotide specifico (es. G per la sequenza LIC del vettore e C per la sequenza LIC dell'inserto)

Lavorando su questa peculiarità si possono produrre delle estremità sporgenti complementari tra vettore ed inserto, che si appaieranno e una volta all'interno della cellula verranno legate covalentemente.

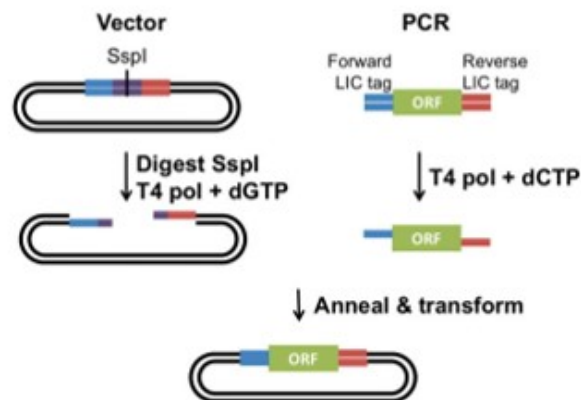


Figura 15. Rappresentazione semplificata della LIC.

3.7 Polymerase Chain Reaction

La **PCR** è una tecnica di biologia molecolare per replicare ripetutamente (amplificare), in modo estremamente selettivo, un tratto definito di DNA.

Attraverso questa reazione, a partire da un singolo frammento di DNA, che fa da stampo, si possono generare miliardi di frammenti identici a quest'ultimo molto rapidamente.

La reazione è catalizzata dall'enzima DNA polimerasi, che per funzionare ha bisogno di un innesco, il primer.

La DNA polimerasi a partire dall'innesco incorpora un nucleotide dopo l'altro, secondo la complementarità delle basi del filamento stampo, muovendosi in direzione $5' \rightarrow 3'$.

Gli step prevedono una **fase di denaturazione**, con una temperatura compresa tra $94-99^{\circ}\text{C}$ in modo che i due filamenti di DNA vengano separati.

La temperatura viene poi abbassata fino a circa 50-60°C per permettere il legame dei primer alle regioni loro complementari sui filamenti di DNA denaturati, **fase di annealing**.

Infine, la temperatura viene alzata a 72°C al fine di massimizzare l'azione della DNA polimerasi, che determina la **fase di allungamento** dei primer legati, usando come stampo il filamento singolo di DNA.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 25-35 volte.

Dopo il primo ciclo, da una singola molecola di DNA se ne originano due, dopo il secondo ciclo da queste se ne originano quattro, dopo il terzo se ne originano otto e così via.

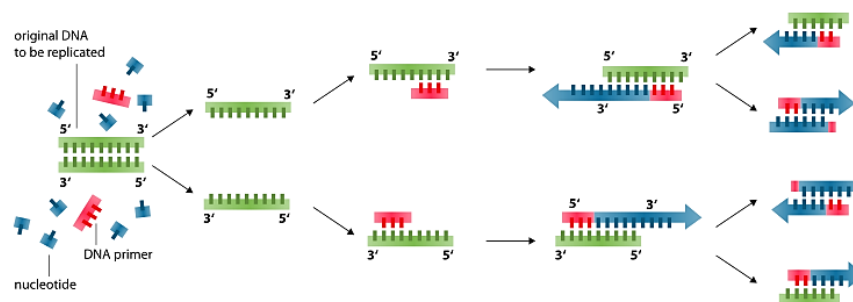


Figura 16. Rappresentazione semplificata della PCR. (Immagine tratta da genomeup.com)

L'intero processo è molto rapido in quanto ciascun ciclo dura solo pochi minuti e per essere realizzato si utilizza un **Termociclature**, ovvero uno strumento in grado di programmare nel tempo, in modo automatico, la temperatura.

La reazione di PCR ha luogo in microprovette, che vengono inserite all'interno del Termociclature.

In ciascuna microprovetta vengono introdotti i seguenti reagenti:

- DNA stampo da riprodurre;
- Deossiribonucleotidi trifosfati, dNTP, per costruire i nuovi filamenti;
- Opportuni primer, costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari agli estremi 3' dei due filamenti del segmento da riprodurre;
- DNA polimerasi termoresistente;
- Buffer per mantenere il pH stabile e per costituire l'ambiente adatto alla reazione;
- Altri elementi di supporto, come gli ioni magnesio, indispensabili per il corretto funzionamento della DNA polimerasi;
- Acqua per portare a volume la soluzione.

3.8 Amplificazione dell'inserto

La sequenza codificante l'Enterochinasi (EK) viene amplificata dal vettore **pET15b-EK_C122S_His5**, che non consente di ottenere un buon prodotto, in quanto non contiene la Maltose Binding Protein (MBP) e favorisce la formazione di corpi di inclusione.

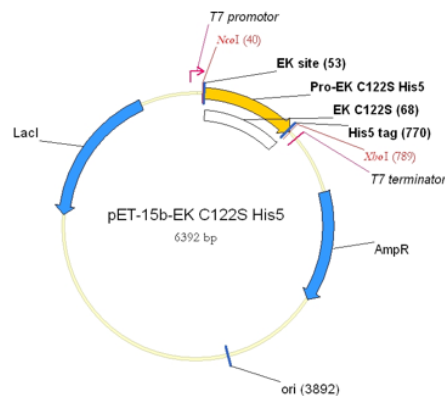


Figura 17. Mappa del vettore pET-15b-EK_C122S_His5 (Immagine tratta da addgene.org)

Di conseguenza, è stato utilizzato il pET15b-EK_C122S_His5 come stampo per l'amplificazione della sequenza codificante EK, utilizzando dei primer LIC.

È stata sfruttata l'attività di una Taq polimerasi particolare, la **KOD**, meno efficiente in termini di reazione, ma più fedele in quanto introduce un minor numero di errori.

	A	B	C
Diluizione	1:10	1:100	1:1000
pET-15b-EK_C122S_His5	2µl	2 µl di A	2 µl di B
H ₂ O PCR grade	18 µl	18 µl	18 µl

Tabella 1. Schema di diluizione seriale del plasmide pET-15b-EK_C122S_His5.

Reagenti	Quantità
Buffer Cut Smart	20 µl
dNTP	20 µl
Mg	12 µl
H ₂ O PCR grade	122 µl
Primer Fw	6 µl
Primer Rev	6 µl
KOD	4 µl

Tabella 2. Protocollo di amplificazione.

Il tutto diviso in tre provette, rispettivamente con aggiunta di 2 µl di A, B e C.

- Step di denaturazione 94°C
- Step di annealing 54°C

- Step di allungamento 72°C
- Per 35 cicli

Analisi del risultato su gel di agarosio all'1,5% ed estrazione del DNA dalle bande mediante il kit *QIAGEN*.

3.9 Digestione del plasmide

Reagenti	Quantità
pMCSG9	6 µl
Buffer Cut Smart	6 µl
H ₂ O	45 µl
Enzima di restrizione SspI	1 µl

Tabella 3. Protocollo di digestione.

- Digestione a 37°C per 1 ora e 30 minuti;
- Inattivazione a 70°C per 20 minuti.

Analisi del risultato su gel di agarosio allo 0,5% ed estrazione delle bande con kit *QIAGEN*.

SspI cut site:



3.10 Estrazione dalle bande mediante il kit QIAGEN

Come sottolineato precedentemente, sia l'inserto amplificato che il vettore digerito sono stati purificati tramite il kit *QIAGEN*, che prevede la presenza di provette contenenti membrane a scambio anionico.

Il metodo è basato sulla proprietà degli acidi nucleici di adsorbirsi alla silice, a differenza delle proteine e di altri composti organici. In questo modo si sfrutta l'interazione tra le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA e le cariche positive della membrana costituita da gel di silice.

Gli step sono essenzialmente: legame, lavaggio ed eluizione.

3.11 Elettroforesi su gel di agarosio

È una tecnica che consente di separare molecole cariche grazie all'applicazione di un campo elettrico. Il DNA, carico negativamente, migra verso il polo positivo (anodo).

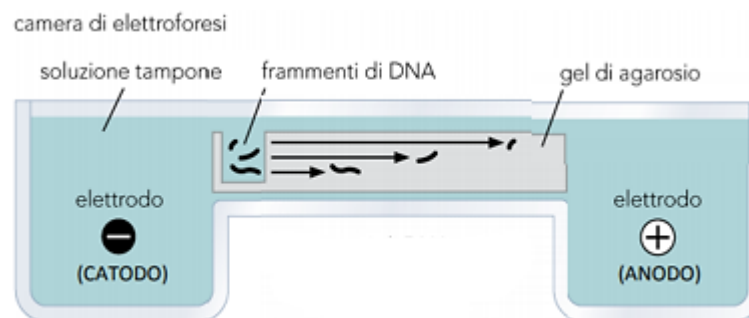


Figura 18. Elementi di una camera per elettroforesi. (Immagine tratta da elettroforesi.weebly.com)

La velocità di migrazione dipende da:

- Dimensione e conformazione del DNA, in quanto superavvolto è più compatto e migra più velocemente, circolare è più ingombrante e fa fatica a muoversi all'interno dei pori del gel e lineare rappresenta una via di mezzo;
- Concentrazione di agarosio nel gel, dove l'agarosio è un polimero lineare che forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata e questa concentrazione determina il potere risolutivo del gel;
- Voltaggio applicato (circa 5 Volt/cm);
- Presenza di Bromuro di Etidio, un colorante fluorescente intercalante che consente di visualizzare il DNA;
- Composizione/forza ionica del buffer utilizzato.

Per la preparazione bisogna sciogliere la quantità desiderata di agarosio in un volume adatto di tampone (**TBE**, Tris Borato EDTA o **TAE**, Tris Acetato EDTA), far bollire, aggiungere il Bromuro di Etidio (in alternativa il **SYBER Safe DNA gel stain**) e versare nell'apposito apparato per la corsa elettroforetica.

Successivamente si carica nei pozzetti la reazione alla quale sia stato aggiunto un colorante (ad esempio il **Loading Dye Purple NEB**) e si procede con la corsa elettroforetica fornendo energia elettrica.

Avvenuta la corsa sarà possibile visualizzare il DNA illuminando con raggi UV.

La visualizzazione viene accompagnata da un marcatore di dimensioni (**Standard**, che viene fatto correre sul gel insieme ai campioni) costituito da frammenti di DNA

aventi dimensioni note, in modo tale da determinare la dimensione del DNA campione.

3.12 Protocollo clonaggio LIC

	Vettore	Inserito
Vettore pMCSG9	5 μ l	/
Inserito EK_C122S	/	3,2 μ l
Buffer Cut Smart	1 μ l	1 μ l
dGTP	1 μ l	/
dCTP	/	1 μ l
T4 DNA polimerasi	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	2 μ l	3,8 μ l

Tabella 4. Protocollo di clonaggio LIC.

- Temperatura ambiente per 1 ora;
- 75°C per 20 minuti;
- Ghiaccio;
- Spinn.

Mix-annealing:

- Unione di 2 μ l vettore e di 2 μ l inserto;
- Temperatura ambiente per 30 minuti;
- Aggiunta di 1 μ l di EDTA;
- Attesa 2 minuti;
- Acqua sterile per diluire e portare a volume 10 μ l.

3.14 Trasformazione chimica delle cellule competenti GC-5 con la mix-annealing

Sono stati uniti 2 μ l di **mix-annealing** e 20 μ l di cellule competenti **GC-5**.

È stato eseguito il protocollo classico di trasformazione chimica con incubazione a 37°C a 400 RPM per 1 ora.

Successivamente il campione è stato seminato delicatamente su terreno solido LB+Amp100 e lasciato in incubazione statica a 37°C o.n.

Trascorso il tempo necessario, sono state recuperate le piastre contenenti i cloni che hanno acquisito il vettore LIC, sono state prelevate delle colonie e stemperate in falcon con 5 ml di LB+Amp60 e lasciate in incubazione a 37°C o.n. a 180 RPM.

Il giorno seguente, il contenuto delle falcon è stato centrifugato a 4000 RPM per 5 minuti al fine di ottenere pellet non troppo compatti.

3.15 Purificazione del plasmide propagato con il kit SIGMA GenElute Plasmid MiniprepKit

Una volta propagato il plasmide pMCSG9 contenente il gene per l'Enterochinasi (pMCSG9-EK_C122S) è stata eseguita la purificazione, in maniera tale da avere il vettore pronto per il successivo step di trasformazione di cellule adibite all'espressione.

3.16 Scelta di E. Coli come sistema di espressione

Tra i molti sistemi disponibili per la produzione di proteine eterologhe, il batterio Gram negativo *E. Coli* è uno dei più utilizzati per la sua capacità di crescere rapidamente ad alta densità su terreni poco costosi, per i suoi meccanismi genetici ampiamente conosciuti e per la disponibilità di un gran numero di vettori di clonaggio e di ceppi mutanti ospiti.

Recentemente sono stati introdotti sul mercato la serie di vettori **pET** per l'espressione di proteine ricombinanti in cellule batteriche.

Nel sistema pET, il gene bersaglio viene posto a valle del promotore del fago T7 ed il gene codificante l'RNA polimerasi del fago T7, che possiede una maggiore attività trascrizionale rispetto all'RNA polimerasi nativa di *E. Coli*, è integrato nel cromosoma della cellula ospite. In particolare, si tratta di un ospite lisogenizzato del frammento fagico DE3, che codifica per la polimerasi T7 del batteriofago T7. Il gene per la T7 polimerasi è sotto il controllo del promotore Lac, inducibile con l'IPTG.

L'espressione del gene di interesse è indotta dall'aggiunta di isopropylthio- β -galactoside (**IPTG**) al mezzo di coltura batterico e culmina con la trascrizione e traduzione del gene bersaglio.

La T7 RNA polimerasi presenta un così elevato grado di processività e selettività per il suo promotore, che incanala la gran parte delle risorse della cellula batterica verso l'espressione della proteina ricombinante, i cui i livelli possono raggiungere il 50% delle proteine cellulari totali dopo poche ore di induzione.

Il ceppo di *E. Coli* utilizzato per la trasformazione e la successiva espressione del costruito è **C41(DE3)**.

C41(DE3) deriva dall'antenato BL21(DE3), che presenta il gene codificante la T7 polimerasi, la cui espressione è controllata dalla presenza di IPTG, che lega il promotore Lac.

Si ritiene che il ceppo derivato, C41, abbia subito delle mutazioni in quattro diverse regioni.

Queste mutazioni, nel complesso, hanno migliorato l'espressione di proteine ricombinanti in C41.

3.17 Trasformazione delle cellule C41(DE3) con pMCSG9-EK_C122S mediante Shock Termico

Sono stati uniti 2 µl di **pMCSG9-EK_C122S** e 20 µl di cellule **C41(DE3)** e sono stati sottoposti alla trasformazione chimica descritta precedentemente con una successiva incubazione di 1 ora a 37°C a 400 RPM.

Trascorso il tempo necessario sono stati preparati il pre-inoculo e l'inoculo.

È importante avere sotto controllo la crescita cellulare, non solo valutando ad occhio la torbidità del brodo, ma facendo delle misurazioni mediante lo spettrofotometro (lettura a 600 nm) ad intervalli regolari, così da valutare se la densità cellulare sia adeguata al successivo passaggio di induzione dell'espressione.

3.18 Induzione dell'espressione mediante IPTG

Per indurre le cellule con IPTG bisogna avere un **OD** (optical density) intorno a 0.5-0.6 (per *E. Coli* un valore di densità ottica pari a 1 corrisponde a circa 8×10^8 cellule per millilitro di soluzione).

Questi valori permettono di monitorare le fasi di crescita batterica, in maniera tale da valutare quando si è nella fase esponenziale.

La fase esponenziale è caratterizzata da una rapida riproduzione batterica che procede in progressione geometrica.

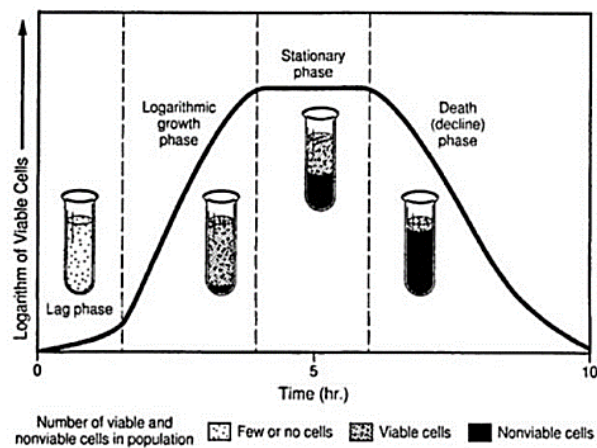


Figura 19. Fasi della curva di crescita batterica. (Immagine tratta da microbiology.weebly.com)

L'isopropylthio- β -galactoside (IPTG) è un analogo non idrolizzabile dell'allolattosio, che induce l'espressione del gene sotto il controllo del promotore Lac, il gene della T7 RNA polimerasi.

La polimerasi a sua volta lega il promotore T7 al cui seguito vi è il gene di interesse, del quale viene indotta la trascrizione.

Per l'induzione le colture sono state lasciate in incubazione per circa 3 ore e successivamente è stata effettuata una misurazione allo spettrofotometro dell'OD₆₀₀. Da qui, sono state prelevate delle aliquote, utilizzate per fare un confronto, in SDS-PAGE, dell'indotto ed il non indotto (aliquote prelevate precedentemente all'induzione).

Questo confronto permette di analizzare l'eventuale produzione della proteina in seguito all'induzione con IPTG e la sua assenza precedentemente all'aggiunta dell'isopropylthio- β -galactoside.

La restante parte delle cellule viene raccolta per centrifugazione, in modo tale da ottenere dei pellet.

3.19 Autoinduzione

L'espressione di proteine eterologhe in *E. Coli* si può ottenere con diversi plasmidi e ceppi ospiti. I sistemi basati sull'operone Lac, come pET, pGEM e pQE rappresentano in questo momento gli strumenti più utilizzati.

Molto spesso le proteine esogene espresse in *E. Coli* mostrano problemi legati alla loro composizione amminoacidica e/o alla loro funzione, inducendo la formazione di corpi di inclusione o tossicità per l'ospite.

In alternativa all'utilizzo dei vettori che contengono promotori fortemente regolati e ceppi di *E. Coli* che tollerano meglio situazioni di stress, un recente e promettente approccio è lo sviluppo del **sistema di autoinduzione** per l'espressione di proteine ricombinanti, introdotto da Studier [19].

Questo approccio si basa sia sul fatto che i batteri, durante la loro crescita, possono fare un uso selettivo di diverse fonti di carbonio sia sulla regolazione negativa, frequentemente osservata, nella repressione catabolica [20].

In particolare, in *E. Coli*, nei sistemi di espressione derivati dall'operone Lac, il glucosio può agire sia come substrato di crescita sia come repressore catabolico dei geni sotto il controllo dell'operone Lac. Infatti, in ceppi ospiti con l'appropriato genotipo (LacY per la lattosio permeasi, che permette l'internalizzazione del lattosio, lacZ per la β -galattosidasi, che converte il lattosio in allolattosio, l'induttore naturale dell'operone Lac), l'esaurimento del glucosio nel mezzo colturale, attiva l'espressione genica per la metabolizzazione di una fonte di carbonio alternativa. Così il consumo di lattosio può sopperire sia la crescita cellulare sia l'espressione della proteina ricombinante dai promotori che sottostanno al controllo negativo dell'operone Lac [21].

Questi principi sono stati verificati nell'uso del lattosio come induttore dell'espressione del sistema pET in fermentazioni fed-batch in sistemi "high-cell density" e affiancati anche alla produzione di proteine marcate con ^{15}N -selenmetionina [22].

Per applicazioni "high-throughput" e non solo, il metodo di autoinduzione ha molti vantaggi rispetto al metodo classico di induzione, tra cui l'evitare un'induzione troppo forte e l'apparente tossicità associata all'utilizzo di un induttore chimico come l'IPTG, la possibilità di formulare diversi tipi di terreni per ottenere il livello desiderato di crescita prima dell'espressione, la semplificazione delle operazioni di

manodopera per un sistema di espressione con un'induzione della proteina legata alla crescita [19,21,23].

Dal punto di vista pratico, le colture trasformanti (pre-inoculi) devono raggiungere la saturazione in un terreno che blocca l'attivazione del p-Lac e per ottenere l'induzione basta cambiare terreno di coltura.

Sono state sviluppate diverse formulazioni per mezzi colturali per la crescita batterica a saturazione. Alcuni di essi permettono il mantenimento dello stato non indotto, altri invece definiscono le condizioni ottimali per la crescita e l'autoinduzione.

Al NY-MaSBiC il sistema di autoinduzione viene utilizzato per la produzione della proteasi TEV [24] e gli stessi terreni sono stati usati per testare l'espressione della recEK_C122S.

Terreno pre-inoculo (100 ml) LB-MOD	Terreno per induzione (500 ml) TB-MOD
1% Tryptone	12% Tryptone
0,5% Yeast Extract	24% Yeast Extract
1% NaCl	25 mM Tampone Fosfato pH 7.2
25 mM Tampone Fosfato pH 7.2	0,8% Glicerolo
0,4% Glicerolo	0,375% Acido Aspartico
0,1875% Acido Aspartico	0,5% Lattosio
Antibiotico adeguato	0,015% Glucosio
	2 mM MgSO ₄
	Antibiotico adeguato

In generale una colonia viene incubata in 5 ml di LB-MOD per tutto il giorno a 37°C in agitazione. Successivamente i 5 ml vengono versati in 45 ml di LB-MOD per il pre-inoculo, che deve raggiungere la saturazione.

Dopo aver controllato la crescita e verificato la saturazione, i 50 ml di pre-inoculo vengono inoculati in 500 ml di TB-MOD per l'autoinduzione che avverrà in 24-48 ore a 30°C in agitazione.

3.20 Purificazione dell'Enterochinasi

I pellet, conservati a -80°C, sono stati scongelati in ghiaccio in circa 30 minuti e sono stati risospesi in un adeguato Buffer di Lisi.

Il Buffer di Lisi contiene diverse componenti, tra cui il **Lisozima**, che provoca la lisi della membrana cellulare, e la **Benzonasi**, che è in grado di scindere il DNA.

Lo step di lisi è stato eseguito mediante una tecnica chiamata **Sonicazione**, che consiste nel sottoporre all'azione degli ultrasuoni sospensioni cellulari, per provocare la rottura delle membrane biologiche e recuperare il contenuto intracellulare.

Una volta effettuata sonicazione, i lisati sono stati diluiti 1:1 con l'Equilibration Buffer e centrifugati a 12000 g per 15 minuti a 4°C, raccogliendo il sopranatante.

In seguito, all'equilibratura della resina con 20 ml di Equilibration Buffer, questa è stata risospesa con il sopranatante e lasciata in lenta agitazione a 4°C sul tamburo rotante o.n., favorendo in questo modo il binding per la successiva cromatografia di affinità.

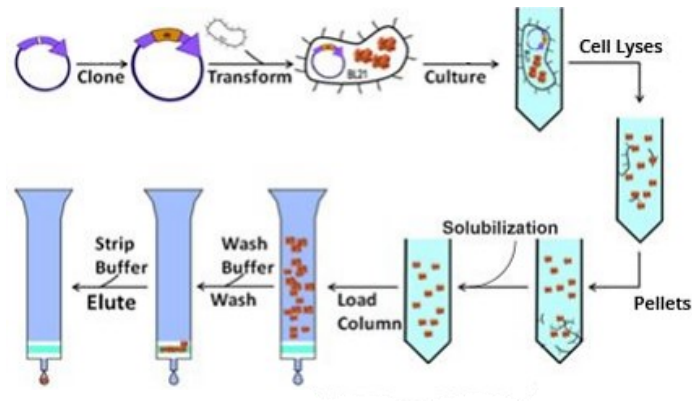


Figura 20. Schema di produzione e purificazione di proteine ricombinanti. (Immagine tratta da elearning.unite.it)

3.20.1 Cromatografia di affinità

La cromatografia consiste nello sfruttare la diversa attitudine di ogni molecola nel distribuirsi fra due fasi differenti.

Una fase viene immobilizzata su di un supporto (es. colonna) ed è perciò detta fase stazionaria, l'altra viene fatta scorrere sulla prima ed è la fase mobile.

Per la purificazione dell'Enterochinasi è stata utilizzata la cromatografia di affinità, ovvero una tecnica che sfrutta una matrice che espone il ligando specifico per il tag fuso con la proteina di interesse.

Nel momento in cui si aggiunge il lisato proteico, avviene un legame specifico reversibile tra la matrice e la proteina ricombinante che espone il tag.

Le altre proteine, che non presentano l'opportuno tag, non si legano e vengono eliminate tramite lavaggio.

Una volta effettuato il lavaggio, si aggiunge una componente con elevata affinità per il ligando presente sulla matrice, il competitore, che favorisce il distacco della proteina ricombinante, che viene così eluita in maniera selettiva.

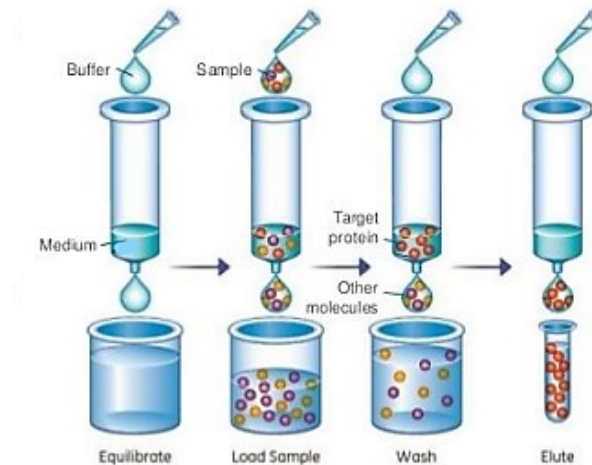


Figura 21. Rappresentazione degli step per la cromatografia di affinità. (Immagine tratta da elearning.unite.it)

In particolare, si parla della cromatografia di affinità per metalli (**IMAC**), dove la fase stazionaria è rappresentata da una resina a base di sefarosio, ovvero agarosio cross-linked modificato con acido iminodiacetico in grado di chelare ioni metallici, caricata con il nichel e la fase mobile è rappresentata dal lisato cellulare contenente la proteina ricombinante.

L'Enterochinasi in ragione della presenza di istidine ha affinità per lo ione metallico legato sulla matrice.

Di conseguenza, il nichel immobilizzato lega selettivamente i residui di istidina presenti come tag della proteina ricombinante.

Come competitore viene utilizzato l'imidazolo, che essendo strutturalmente molto simile al gruppo che nell'istidina è responsabile del legame con lo ione nichel, favorisce la fase di eluizione della proteina di interesse.

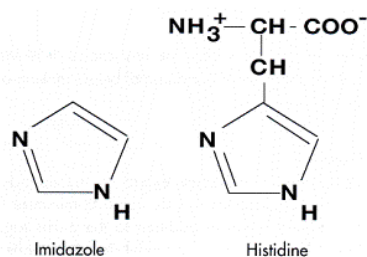


Figura 22. Confronto delle strutture dell'imidazolo e dell'istidina. (Immagine tratta da www.yfp.elisacorteggiani.com)

Quindi, in seguito al binding, o.n. la sospensione è stata inserita in una colonna per la cromatografia di affinità e, successivamente alla sedimentazione della resina, è stato fatto fluire tutto il volume del materiale non legato.

Sono stati effettuati due lavaggi, W1 e W2, per eliminare le proteine contaminanti.

Infine, è stata eseguita l'eluizione della proteina di interesse EK mediante l'Elution Buffer, con l'aiuto di una siringa in maniera tale da rallentare il flusso e favorire l'azione competitiva dell'imidazolo.

Solo dopo aver tracciato il profilo di eluizione della cromatografia, è stato possibile valutare quali e quante frazioni riunire.

Un'analisi preliminare è stata fatta tramite la lettura a 280 nm con il NanoDrop, ma successivamente è stata effettuata una più attenta analisi delle proteine eluite in SDS-PAGE.

Fatte le opportune valutazioni, sono state scelte le frazioni da riunire e sono state sottoposte a ulteriori step di dialisi, *refolding* e concentrazione.

Soluzioni utilizzate per la purificazione dell'Enterochinasi ricombinante:

Stock Solution:
500 ml di 1M Tris/HCl pH 8.2
500 ml di 2M NaCl

Equilibration Buffer (500 ml)
25 mM Tris/HCl pH 8.2
150 mM NaCl

Buffer di Lisi completo
Buffer di Lisi
MgCl 1 M
Lisozima
Benzonasi

Wash 1 (W1)
25 mM Tris/HCl pH 8.2
150 mM NaCl

Wash 2 (W2)
25 mM Tris/HCl pH 8.2
200 mM NaCl
10 mM Imidazolo

Elution Buffer (E)
25 mM Tris/HCl pH 8.2
100 mM NaCl
0,5 M Imidazolo

3.21 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Si divide in elettroforesi nativa, in cui le proteine si muovono in funzione della loro massa e della loro carica netta, ed elettroforesi denaturante in presenza di SDS (SDS-PAGE, Sodium-Dodecyl-Sulphate-Polyacrilamide-Gel-Electrophoresis), dove le proteine uniformemente dotate di carica negativa (tramite SDS) si muovono in base alla loro massa.

L'SDS provoca la destabilizzazione della struttura terziaria della proteina denaturandola e conferisce una carica netta negativa rendendo trascurabile la carica della proteina nativa. Il risultato è che la proteina assume una forma linearizzata ed una carica negativa approssimativamente proporzionale alla sua massa, in modo che il rapporto carica/massa sia essenzialmente identico per proteine diverse.

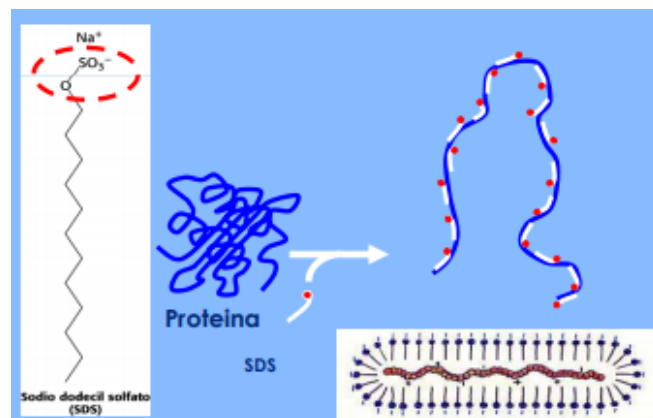


Figura 23. Struttura dell'SDS e schema di formazione del complesso SDS-proteina. (Immagine tratta da math.unife.it)

La separazione dei complessi SDS-proteine, quando sottoposti ad un campo elettrico, avviene quindi in base agli effetti di setaccio molecolare dovuto alle

dimensioni dei pori del gel. Ciò fa sì che proteine più piccole si muovano rapidamente attraverso il gel, mentre quelle di dimensioni maggiori siano più lente.

I gel di poliacrilammide vengono preparati facendo copolimerizzare acrilamide con metilen-bisacrilammide, un agente cross-linkante, in presenza di persolfato di ammonio (APS) allo 0,1-0,3% e un catalizzatore come il TEMED.

Questa polimerizzazione si fa avvenire all'interno dello spazio compreso tra due vetri, in modo da ottenere una matrice piatta con spessore che varia da 0,75 mm a 1,5 mm.

La porosità del gel dipende dalla concentrazione di acrilamide e al crescere di questa concentrazione la dimensione dei pori decresce.

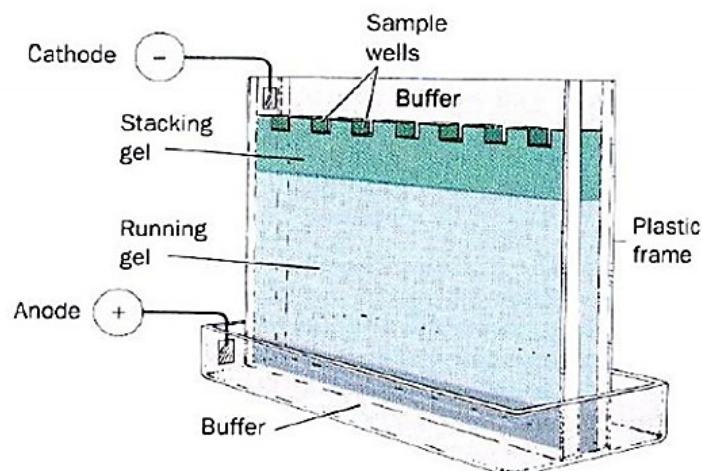


Figura 24. Componenti del gel e della camera di elettroforesi. (Immagine tratta da m.docente.unife.it)

Il gel presenta due componenti:

- *Running gel*, che è la matrice in grado di separare le singole macromolecole;
- *Stacking gel*, che si aggiunge circa 1 ora dopo la deposizione del *running gel* e sul quale si inserisce il pettine per la formazione dei pozzetti.

Dopo la polimerizzazione del gel, si rimuove il pettine, lasciando nello *stacking* una serie di pozzetti pronti per il caricamento dei campioni.

La preparazione dei campioni prevede:

- SDS, che denatura le proteine e conferisce la stessa densità di carica negativa;
- Glicerolo, per favorire un'adeguata discesa dei campioni nei pozzetti;
- Ditiotreitolo e β -Mercaptoetanololo per la rottura di eventuali ponti disolfuro;
- Blu di Bromofenolo, che visualizza i campioni e va a costituire il fronte di migrazione;
- Bollitura a 95°C per 10 minuti, che accelera la completa denaturazione.

Si procede con la corsa elettroforetica, applicando una differenza di potenziale, e si ottiene una separazione delle singole componenti in base alla loro mobilità elettroforetica.

Successivamente, dato che le proteine non sono direttamente visibili, si effettua una colorazione.

Il gel viene essenzialmente immerso nel colorante *Blue Coomassie*, che si lega alle proteine tramite forze di *Van der Waals* e legami ionici tra i gruppi sulfonici del colorante ed i gruppi amminici delle proteine.

Trascorso il tempo necessario alla colorazione si procede con la decolorazione, effettuata tramite una soluzione di acido acetico e metanolo.

Per determinare la massa molecolare della proteina si fa un confronto della sua mobilità con quella di una serie di proteine “standard” (fatte correre sullo stesso gel) di cui si conosce la massa molecolare.

3.22 Dialisi

La dialisi è una tecnica di filtrazione che permette di scambiare sostanze disciolte in un liquido utilizzando una membrana semipermeabile, che consente selettivamente il passaggio di alcune molecole sulla base della loro dimensione.

Il passaggio selettivo è legato ai pori presenti sulla membrana che ne determinano uno specifico *cut-off*.

Il processo viene eseguito immergendo il tubo da dialisi, con all'interno il campione, in un adeguato tampone di dialisi, ponendo il tutto in agitazione.

Il moto delle sostanze è di tipo diffusivo, ovvero è dovuto essenzialmente alla differenza di concentrazione dei soluti tra i solventi nei due compartimenti e cessa una volta giunti all'equilibrio.

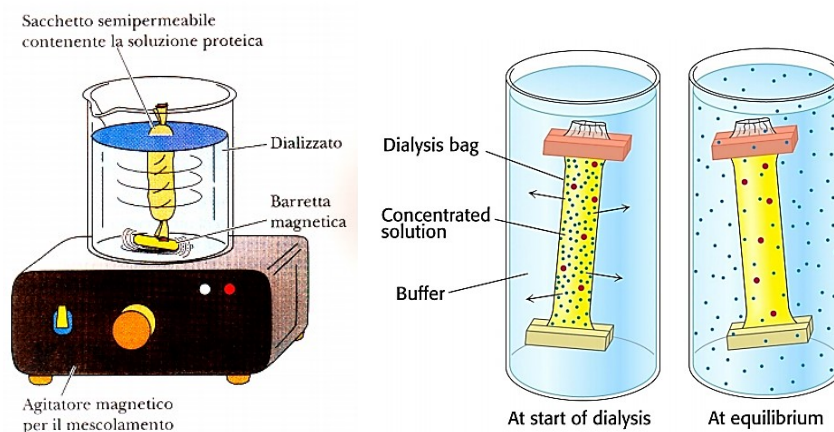


Figura 25. Rappresentazione del processo di dialisi. (Immagini tratte da omero.farm.unipi.it e da microbiologiaitalia.it)

Tampone di dialisi per EK
20 mM Tris/HCl pH 7.4 (0,5M)
50 mM NaCl (2M)
10% Glicerolo

3.23 Refolding

Per aiutare la proteina a ripiegarsi nella sua conformazione nativa, in maniera tale da garantirne l'attività, è stata preparata una soluzione per il *refolding*.

Considerando che il corretto ripiegamento della proteina si ottiene più efficientemente aggiungendo goccia a goccia la soluzione di *refolding*, è stata utilizzata la pompa peristaltica.

Il campione durante il processo è stato posto in agitazione a temperatura ambiente.

<i>Refolding Buffer</i>
Acido Aspartico sciolto in acqua con aggiunta di NaOH 5M → pH 7.5
Tris/HCl 0.5M pH 7.5
GSSG 10 mM
GSH 100 mM
EDTA 0,5 M
H ₂ O

3.24 Ultrafiltrazione

L'ultrafiltrazione è una tecnica che permette una purificazione e una concentrazione ultrarapida della proteina, con un recupero elevato.

Gli apparati di ultrafiltrazione possiedono una membrana selettiva per diversi pesi molecolari.

Durante la centrifugazione, il solvente e le sostanze a più basso peso molecolare passano dal comparto superiore a quello inferiore, attraversando la membrana semi-permeabile.

Mentre, i soluti con un peso molecolare superiore al **MWCO** (*Molecular-Weight Cut Off*) della membrana restano intrappolati nel comparto superiore, concentrandosi in funzione del tempo di centrifugazione.

Lo stesso apparato può essere utilizzato per allontanare l'imidazolo in eccesso. Infatti, aggiungendo una quantità opportuna di tampone senza imidazolo, centrifugando e ripetendo la stessa operazione almeno tre volte, si può assumere che la concentrazione di imidazolo nel campione sia minore di 10 mM.



Figura 26. Apparato per ultrafiltrazione. (Immagine tratta da biosigma.it)

3.25 Produzione di CXCL12 δ

Per quanto riguarda la chemochina **CXCL12 δ** , il clonaggio e la sua produzione erano stati fatti in precedenza al NY-MaSBiC.

Tutte le isoforme di questa chemochina erano state clonate in pMCSG9, ingegnerizzato mediante la sostituzione del sito TEV con il sito per EK, in modo da ottenere l'estremità N-terminale senza residui aggiuntivi.

La purificazione ottenuta con la cromatografia IMAC richiedeva uno step aggiuntivo e la resa finale non era ottimale. Inoltre, tutte le isoforme di CXCL12 prodotte con la MBP, come partner di fusione, richiedevano grandi quantità di EK per la loro produzione.

3.25.1 Ceppo Rosetta (DE3)

Il ceppo dedicato all'espressione del costrutto di CXCL12 δ è **Rosetta (DE3)**.

Il ceppo è stato creato, in quanto alcune proteine eucariotiche usufruiscono di codoni usati raramente nei sistemi procariotici.

Il ceppo compensa la normale carenza di tRNA che riconoscono codoni rari in sistemi procariotici, ciò per migliorare la lettura di proteine ricombinanti espresse in *E. Coli*.

I geni codificanti i tRNA carenti sono presenti sullo stesso plasmide che trasporta il gene per il lisozima T7.

I ceppi Rosetta consentono così di ottenere buoni livelli di espressione di proteine i cui geni contengono codoni rari di *E. Coli*.

Le caratteristiche di Rosetta:

- Presenza di mutazioni su diverse proteasi, riducendo gli eventi proteolitici a carico delle proteine ricombinanti;
- Presenza della cassetta di espressione DE3, dunque presenza nel cromosoma di una copia del gene codificante l'RNA polimerasi T7, sotto il controllo del promotore Lac;
- Espressione proteica sotto il controllo del promotore T7;
- Presenza del plasmide pLysS e quindi del gene che codifica il lisozima T7, che lega l'RNA polimerasi T7 inibendo la trascrizione guidata da questo enzima.

Ciò fornisce uno stretto controllo della RNA polimerasi T7, riducendo l'espressione basale di geni bersaglio. Questo è importante quando la proteina ricombinante da esprimere è tossica.

In seguito all'induzione con IPTG, la produzione di elevati livelli dell'RNA polimerasi T7 sopprime ogni inibizione da parte del lisozima T7.

3.25.2 Purificazione di CXCL12 δ

Sono stati prelevati i pellet a -80°C ed è stato effettuato uno scongelamento di circa 30 minuti.

Successivamente i pellet sono stati risospesi nel Binding Buffer, seguendo il rapporto di 10 ml di Binding Buffer ogni grammo di pellet.

La lisi delle cellule è stata effettuata mediante il processo di sonicazione, ripetuto due volte.

La soluzione è stata poi centrifugata a 12000 g per 20 minuti a 4°C, con la raccolta del soprannatante.

3.25.3 Cromatografia di affinità

Con le chemochine è stata eseguita sempre una cromatografia di affinità, ma basata sul tag MBP piuttosto che sull'His-tag.

La proteina legante il maltosio (**MBP**) è uno dei partner di fusione più utilizzati per la produzione di proteine ricombinanti nelle cellule batteriche.

Con un semplice passaggio di affinità su colonna amilosio-agarosio, il risultato è una proteina che è spesso pura al 70-90%.

Inoltre, la MBP fornisce, come partner di fusione, un alto grado di traduzione e facilita il corretto ripiegamento e solubilità della proteina bersaglio [9].

In pratica, la proteina di fusione contenente il tag MBP viene caricata su una colonna contenente una matrice di agarosio dove è cross-linkato l'amilosio (per il quale il tag ha affinità).

Una volta avvenuto il legame ed effettuati gli opportuni lavaggi per eliminare i contaminanti, si può procedere con l'eluizione in presenza di un eccesso di competitore: maltosio 10 mM.

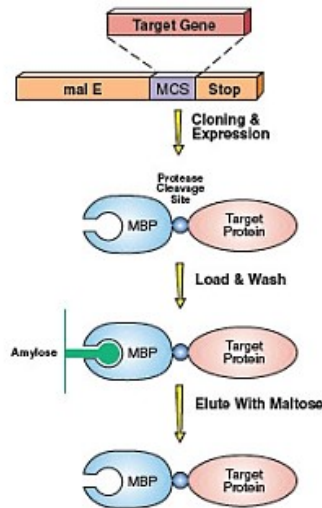


Figura 27. Rappresentazione della cromatografia di affinità basata sulla MBP. (Immagine tratta da elearning.unimib.it)

Quindi, la resina MBR (precedentemente equilibrata con 20 ml di Binding Buffer) e il sopranatante sono stati uniti in una falcon e posti in agitazione su tamburo rotante a 4 °C per 2 ore.

Trascorso il tempo necessario, sono stati trasferiti nella colonna per cromatografia, lasciando alla resina il tempo di sedimentare.

Il vero e proprio processo di cromatografia inizia col passaggio del flow through attraverso la colonna, ovvero di tutte le componenti non in grado di interagire con la matrice della resina.

È stata poi aggiunta una quantità opportuna di soluzione di lavaggio (Binding Buffer), per rimuovere ulteriori componenti aspecifiche.

Infine, è stato aggiunto l'Elution Buffer, al fine di garantire il distacco della proteina di interesse.

Un'analisi preliminare dell'andamento della purificazione è stata eseguita tramite la lettura a 280 nm con il NanoDrop e successivamente è stata effettuata una più attenta analisi delle proteine eluite in SDS-PAGE.

Fatte le opportune valutazioni, sono state scelte le frazioni da riunire e sono state sottoposte a ulteriori step di dialisi e concentrazione.

Soluzioni utilizzate per la purificazione di CXCL12 δ ricombinante:

Binding Buffer
20 mM Tris/HCl pH 7.4 (0,5M)
150 mM NaCl (2M)
1 mM EDTA (0,5M)
5 mM β -Mercaptoetanolo
0,1 mM PMSF (0,1M)

Elution Buffer
Binding Buffer
10 mM Maltosio

Tampone di dialisi per CXCL12
20 mM Tris/HCl pH 7.4 (0.5M)
100 mM NaCl (5M)
5% Glicerolo

Capitolo 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Amplificazione, purificazione e quantizzazione del gene EK dal vettore pET-15b-EK_C122S_His5

Per la produzione dell'Enterochinasi bovina, ovvero del dominio catalitico dell'enzima (catena leggera), è stato utilizzato il vettore pET-15b-EK_C122S_His5 [3]. Come descritto dagli autori, questo plasmide (mostrato in Figura 28) è in grado di esprimere il dominio catalitico dell'Enterochinasi bovina (recEK_C122S) in *E. Coli* sotto forma di corpi di inclusione [4].

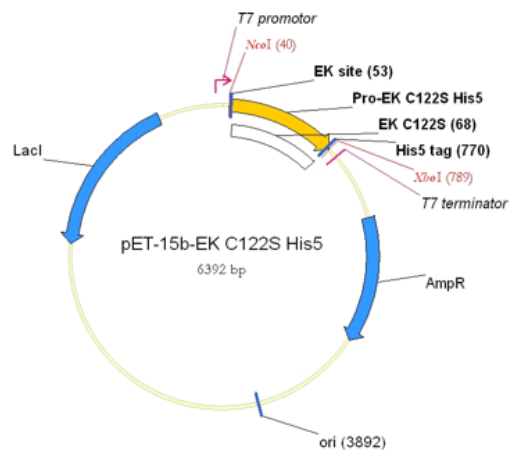


Figura 28. Mappa del vettore p ET-15b-EK_C122S_His5. (Immagine tratta da addgene.org)

I corpi di inclusione non sono altro che aggregati proteici insolubili ed inattivi correlati con un alterato *folding* della proteina di interesse. In particolare, i

procarioti non riescono ad esprimere le serina proteasi in forma solubile perché tali proteine possiedono diverse cisteine, che non sono in grado di formare adeguatamente ponti disolfuro nell'ambiente riducente del citosol [3].

L'utilizzo di questo vettore, secondo il protocollo pubblicato da *Skala et al.* prevedeva la successione di sei step (come illustrato in Figura 29), partendo dall'espressione e dall'isolamento dei corpi di inclusione, seguiti dagli step 3 e 4, che rappresentano un difficile approccio di *refolding*, prima di arrivare alla cromatografia a scambio ionico (IEC) e alla successiva cromatografia di affinità, che può essere condotta con due resine diverse, una classica cromatografia di affinità per la coda di cinque istidine, presente al C-terminale del costrutto, oppure una resina di affinità che contiene benzamidina (BENAC), un inibitore reversibile delle proteasi serina dipendenti.

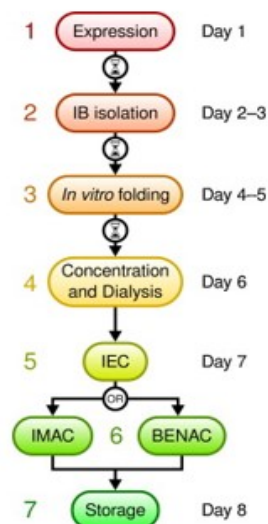


Figura 29. Schema della produzione di Skala W. et al. (Immagine tratta da [3])

Inizialmente, questo protocollo è stato testato, ma l'approccio del *refolding per diluizione infinita* (step 4) ha determinato un recupero della proteina ricombinante decisamente basso.

L'ideale per far fronte alla scarsa solubilità di questo tipo di proteine è agire su due fronti:

- 1) aggiungere un partner di fusione N-terminale che possa garantire una certa solubilità alla proteina ricombinante con la quale è fuso;
- 2) utilizzare ceppi di *E. Coli* alternativi.

L'utilizzo di un tag adeguato è una soluzione ai corpi di inclusione più immediata rispetto a soluzioni alternative, quali l'utilizzo di agenti denaturanti, come urea e guanidina, per la purificazione dei corpi di inclusione. Questi agenti richiedono comunque uno step di rinaturazione, se è necessario ottenere l'enzima attivo.

Per quanto riguarda il primo punto, in letteratura sono stati riportati diversi costrutti contenenti la recEK fusa con la GST e con la Tiorredossina, con risultati non ottimali.

Quindi si è pensato di utilizzare la Maltose Binding Protein (proteina legante il maltosio), proteina periplasmatica codificata dal gene *mal E* di *E. Coli*, nota per la sua propensione a generare un prodotto solubile [9], presente nel vettore pMCSG9.

Il pMCSG9, oltre alla presenza della MBP, ha tutta una serie di caratteristiche che lo rendono un ottimo vettore di clonaggio ed espressione. Queste caratteristiche sono descritte nel capitolo "MATERIALI E METODI" (M.M).

Questo vettore permette il clonaggio LIC, quindi è stato necessario disegnare dei primer adeguati al clonaggio in pMCSG9 del costrutto recEK_C122S presente in pET-15b-EK_C122S_His5.

Primer LIC per recEK_C122S in pMCSG9:

Fw **TACTTCCAATCCAATGCCATGGGCCCTATAGATGAC**

Rev **TTATCCACTTCCAATGTTAATGATGATGATGATGTAGAAAAC**

I primer LIC sono essenzialmente dei primer più lunghi del normale, in quanto una parte della sequenza serve per l'appaiamento specifico con il gene ed un'altra porzione serve a produrre delle estensioni complementari necessarie per il clonaggio in pMCSG9 (in grassetto).

Per ottimizzare l'amplificazione del frammento di recEK_C122S da clonare in pMCSG9 sono state preparate delle diluizioni seriali del vettore pET-15b-EK_C122S_His5 (stock 187 ng/μl), indicate in Figura 30 come campioni A, B e C, che corrispondono rispettivamente a diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000 dello stock di plasmide, usando i primer LIC ed il protocollo di amplificazione descritto in M.M.

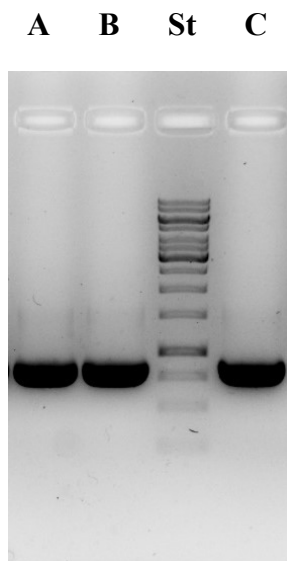


Figura 30. Frammento *recEK_C122S* amplificato LIC in gel di agarosio.

*Gel di agarosio all'1,5% in TAE, dove sono evidenziati i prodotti dell'amplificazione (25 μ l) del frammento *recEK_C122S* ottenuti con i primer LIC per il pMCSG9. St corrisponde allo standard di peso molecolare Gene Ruler one Kb. Le sigle A, B e C corrispondono rispettivamente alle diluizioni 1:10, 1:100 e 1 :1000 dello stock di pET-15B-EK_C122S_His5.*

L'amplificato è compatibile con le dimensioni del frammento atteso per *recEK_C122S* di 781 bp.

Per le tre concentrazioni di template non sono state osservate bande di prodotti aspecifici, ma per precauzione solo i frammenti ottenuti dagli amplificati A e B sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA dal gel.

Le bande contenenti le sequenze amplificate per *recEK_C122S* con l'aggiunta delle estremità LIC, dopo l'analisi su gel di agarosio, sono state tagliate dal gel ed il DNA è stato estratto e purificato mediante kit *QIAGEN*.

I campioni ottenuti sono stati quantizzati al NanoDrop.

	ng/μl	A 260/280
B	170 ng/μl	1,8
C	62 ng/μl	1,8

Tabella 5. Quantizzazione degli inserti EK al NanoDrop.

Il rapporto di assorbanza 260/280 indica un buon grado di purezza del campione.

4.2 Digestione, purificazione e quantizzazione del vettore pMCSG9

Una volta preparato l'inserto con le opportune estremità, prima della reazione LIC, anche il vettore deve essere preparato, tramite una digestione, in modo da linearizzarlo e rendere disponibili le sue sequenze LIC.

Circa 1000 ng di pMCSG9 sono stati digeriti con l'enzima SspI tramite un'incubazione a 37°C per un'ora e 30 minuti in 100 μl di soluzione finale.

Il prodotto di digestione è stato caricato in un gel di agarosio allo 0,8% in TAE suddiviso in tre pozzetti, D1, D2 e D3, per l'estrazione del DNA dal gel. Nel pozzetto ND sono stati caricati 10 μl del vettore non digerito (prelevato dalla miscela di digestione prima dell'aggiunta dell'enzima), mentre i 10 μl di campione D4 corrispondono alla miscela di digestione dopo l'incubazione.

D1 D2 D3 ND D4 St

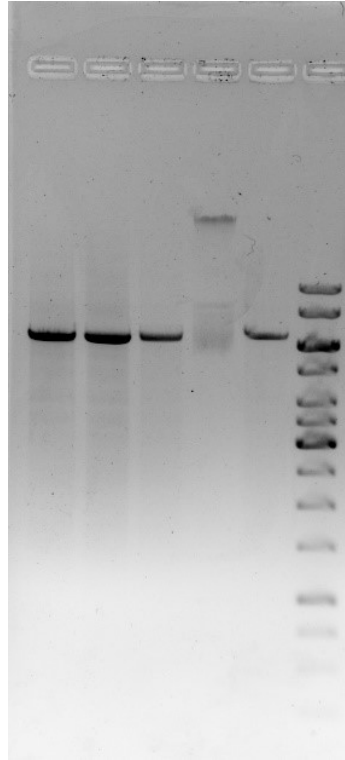


Figura 31. Digestione di pMCSG9 con SspI.

Gel di agarosio allo 0,8% in TAE, nel quale è stato caricato il prodotto della digestione di pMCSG9 con SspI. D1, D2 con circa 30 μ l e D3 con 20 μ l della miscela di digestione, ND con 10 μ l di vettore non digerito e D4 con 10 μ l della miscela di digestione e St rappresenta lo standard di peso molecolare Gene Ruler one Kb.

Le bande contenenti il vettore linearizzato D1, D2 e D3 sono state tagliate ed il DNA è stato estratto e purificato tramite il kit *QIAGEN*.

Sono state effettuate due eluizioni con acqua PCR grade a 65°C.

	ng/ μ l	A 260/280
1° eluizione pMCSG9	40,85 ng/ μ l	1,83
2° eluizione pMCSG9	16,7 ng/ μ l	1,7

Tabella 6. Quantizzazione di pMCSG9 al NanoDrop.

Per la reazione LIC è stata scelta la prima eluizione in quanto più concentrata e con più alta purezza.

4.3 Clonaggio LIC (Ligation Independent Cloning)

In seguito all'amplificazione dell'inserto e alla linearizzazione del plasmide è stata effettuata la reazione LIC, sfruttando l'attività esonucleasica 3'→5' della T4 DNA polimerasi, come descritto in M.M.

Terminata la reazione sono state ottenute delle estremità over-hangs a singolo filamento nel vettore e nell'inserto.

Queste estremità risultano complementari, favorendo nello step di annealing l'appaiamento di plasmide ed inserto (pMCSG9-EK_C122S).

4.4 Trasformazione delle cellule competenti GC-5 per la propagazione di pMCSG9-EK_C122S e sua purificazione e quantizzazione.

Utilizzando 2 µl del nuovo plasmide ricombinante (pMCSG9-EK_C122S) e 20 µl di cellule competenti GC-5 è stata effettuata la trasformazione chimica.

Dopo la trasformazione e una notte di incubazione a 37°C su terreno solido LB+Amp sono state osservate circa 25 colonie.

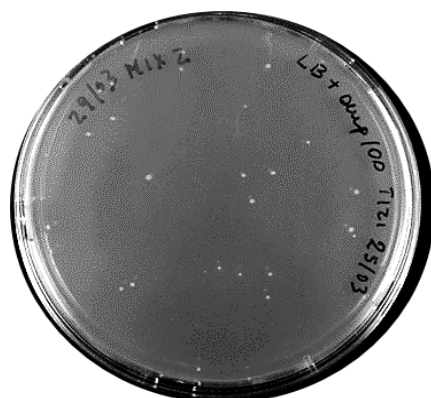


Figura 32. Cloni derivanti dal clonaggio LIC per pMCSG9-EK_C122S. Piastra di LB agar + Amp contenente i cloni ottenuti con clonaggio LIC e trasformazione in GC-5.

Quattro colonie sono state prelevate dalla piastra, stemperate in 5 ml di brodo LB+Amp ed incubate in agitazione a 37°C o.n.

I pellet ottenuti dalle colture sature, tramite centrifugazione, sono stati utilizzati per la purificazione dei nuovi plasmidi mediante kit *SIGMA GenElute Plasmid Miniprep*, ottenendo in questo modo quattro cloni pMCSG9-EK_C122S.

Tutti e quattro i cloni hanno mostrato una buona resa e ottima qualità quindi due di questi (#1 e #2) sono stati scelti a caso e sono stati sequenziati per la verifica del corretto inserimento dell'inserto in pMCSG9.

	ng/μl	A260/280	ng/ul	A260/280
#1	107,7 ng/μl	1,94	40 ng/μl	1,77
#2	100 ng/μl	1,91	43,4 ng/μl	1,91
#3	100,5 ng/μl	1,88	35,26 ng/μl	1,83
#4	103 ng/μl	1,92	24,6 ng/μl	1,79

Tabella 7. Quantizzazione del plasmide ricombinante in seguito all'eluizione, mediante NanoDrop.

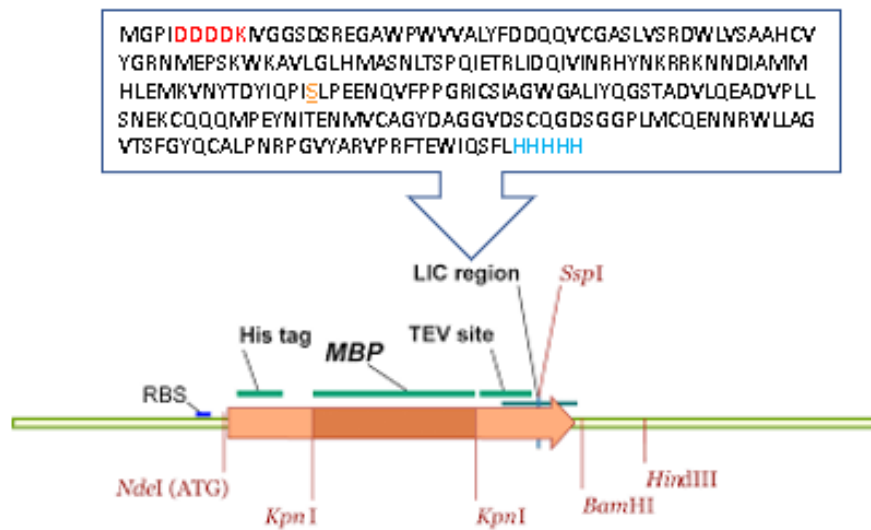


Figura 33. Catena leggera dell'Enterochinasi bovina estratta da pET-15b-EK_C122S_His5 ed inserita in pMCSG9. (Immagine tratta da [25])

4.5 Caratterizzazione dei cloni pMCSG9-EK_C122S

Circa 200 ng del vettore pMCSG9 e dei cloni #1, #2, #3 e #4 sono stati sottoposti a digestione analitica con gli enzimi: XhoI e XbaI, che linearizzano sia il pMCSG9 sia i nuovi cloni (l'inserto recEK_C122S non contiene questi siti di restrizione) e con KpnI, che fiancheggia la MBP.

Dopo due ore di incubazione le miscele di reazione sono state caricate in un gel di agarosio allo 0,8% in TAE.

Tutti i cloni hanno mostrato lo stesso risultato e nella Figura 34 viene illustrato il gel contenente i frammenti ottenuti dal clone #1, dove appare evidente che il nuovo plasmide produce un linearizzato di dimensioni maggiori rispetto al pMCSG9. Il frammento corrispondente alla MBP è uguale nei due plasmidi; dunque, è molto

probabile che tutti e quattro i nuovi cloni contengano il frammento recEK_C122S. Quindi due cloni a caso sono stati scelti per la verifica della sequenza.

pMCSG9 stock clone #1 p9-EK_C122S
ND XhoI XbaI KpnI St KpnI XbaI XhoI

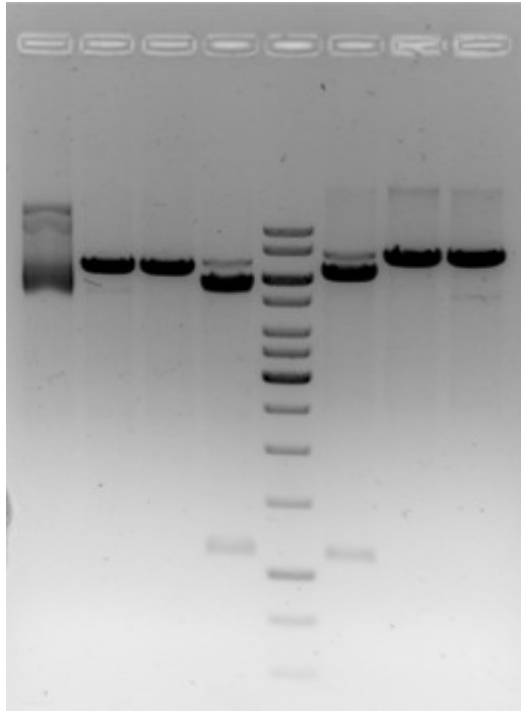


Figura 34. Digestione analitica di pMCSG9 e di p9-EK_C122S#1.
Gel di agarosio allo 0,8% in TAE nel quale sono stati caricati 200 ng dei prodotti delle digestioni del pMCSG9 e del nuovo plasmide ricombinante p9-EK_C122S #1. ND è il plasmide non digerito, St è lo standard di peso molecolare Gene Ruler one KB.

4.6 Sequenziamento

Due campioni contenenti circa 600 ng del clone #1 e del clone #2 sono stati essiccati per 20 minuti a 65°C ed inviati al servizio di sequenziamento BMR genomics di Padova, richiedendo per ciascun clone il sequenziamento innescato dal

primer Fw di T7, interno al promotore di T7, e dal primer Rev di T7, che riconosce la sequenza terminatrice di T7.

Entrambi i cloni sono risultati positivi.

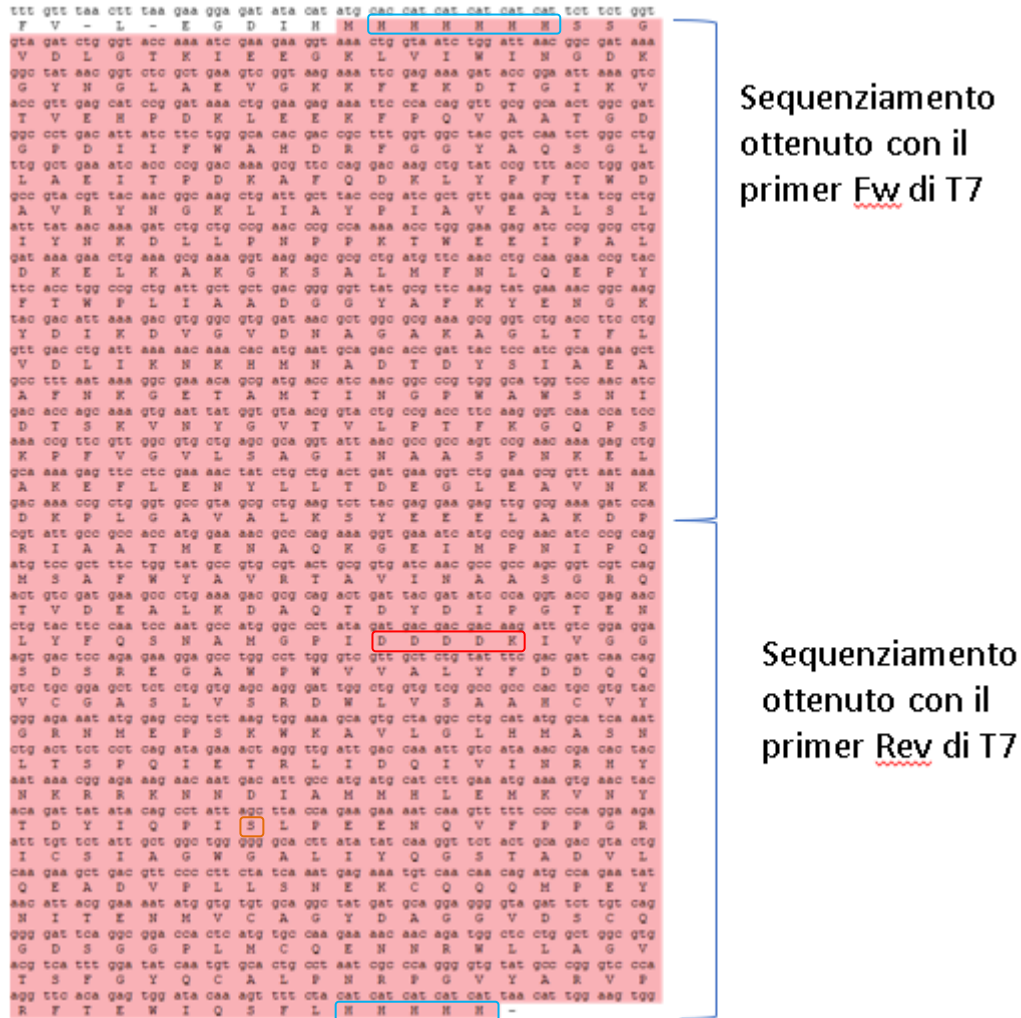


Figura 35. Verifica della sequenza del clone p9-EK_C122S.

In figura è possibile visionare in successione: il tag di 6 istidine seguito dalla sequenza amminoacidica del tag MBP, il sito di taglio DDDDK per l'Enterochinasi e la sequenza amminoacidica di EK_C122S seguita da 5 istidine. Inoltre, è evidenziato il residuo S (C122S) mutato per aumentare la stabilità della proteina.

4.7 Espressione in piccola scala

Circa 8 ng del plasmide purificato p9-EK-C122S#1 sono stati usati per trasformare tre ceppi diversi di *E. Coli*: BL21(DE3) pLys, usato anche da *Skala et al.*, Rosetta pLys e C41, un ceppo consigliato per le proteine che potrebbero risultare tossiche per l'ospite.

Dopo la trasformazione sono stati ottenuti in tutti e tre gli ospiti numerosi cloni. Sono state prelevate due colonie da ogni piastra e inoculate in 5 ml di LB+Amp+Clo (per BL21 e Rosetta) e in 5 ml di LB+Amp (per C41). Dopo tre ore di incubazione in agitazione a 37°C è stata fatta la lettura a 600 nm per verificare la crescita delle colture.

Ceppi di <i>E. Coli</i>	A600nm (START ore 12:00)	A600nm (STOP ore 15:00)
BL21 #1	0,69	2,48
BL21 #2	0,71	2,56
Rosetta #1	0,41	1,4
Rosetta #2	0,66	2,08
C41 #1	0,73	2,53
C41 #2	0,82	2,94

Tabella 8. Assorbanza dei diversi ceppi di *E. Coli*

A questo punto è stato aggiunto l'IPTG 0,5 mM per ottenere l'induzione dell'espressione e l'incubazione è stata protratta per altre tre ore a 37°C.

Prima dell'induzione sono stati prelevati dei campioni per ciascuna coltura (1 ml) per ottenere un pellet non indotto. Dopo l'induzione sono stati fatti due prelievi, uno per avere il lisato totale e l'altro per poter fare il test di solubilità.

I pellet ottenuti dai vari prelievi di non indotto (NI) e indotto (indicato come LT) sono stati normalizzati utilizzando il rapporto O.D. 600/volume di SDS-SB2X e caricati su gel di poliacrilammide al 12%.

I campioni dedicati al test di solubilità sono stati lisati e centrifugati a 12000 g per 10 minuti in modo da ottenere un sopranatante (frazione indicata con LTs) ed un pellet (solubilizzato con un volume di SDS-SB2X uguale al volume del buffer di lisi).

Come mostrato nel gel di Figura 36, solo con i cloni in C41 sembrano presenti in quantità apprezzabili sia il precursore, banda a circa 70 kDa (MBP-EK_C122S), sia la recEK_C122S, banda a 27 kDa.

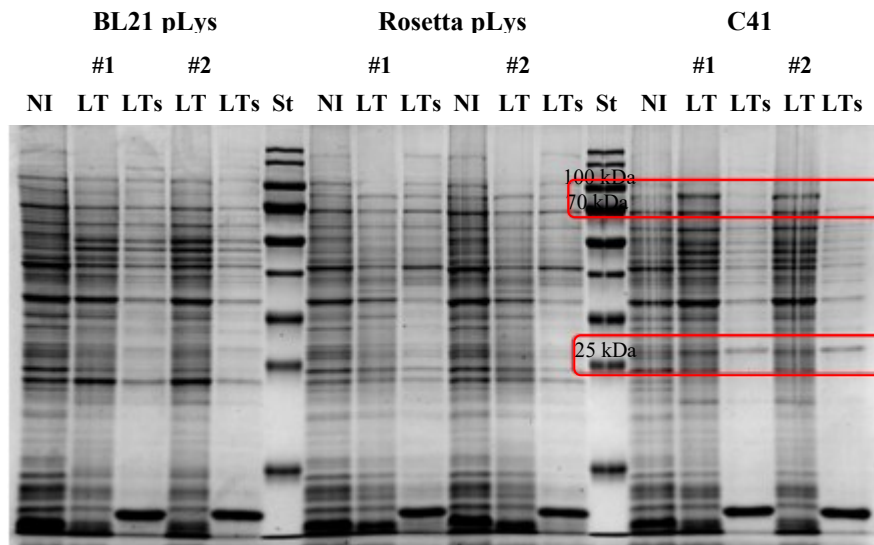


Figura 36. Espressione di pMCSG9-EK_C122S in diversi ceppi di E. Coli.

Nell' SDS-PAGE al 12% sono stati caricati 10 μ l del campione non indotto (NI) e dell'indotto (LT) e 10 μ l del soprannatante dopo la lisi, LTs (frazione solubile). St indica lo standard di peso molecolare pepGOLD. In alto viene indicato il tipo di ospite analizzato e #1 e #2 rappresentano due cloni derivanti dalla stessa trasformazione.

Il precursore da circa 70 kDa è evidente nel campione di lisato totale (LT) dopo l'induzione, ma sembra poco rappresentato nella frazione solubile, mentre il prodotto dell'autocatalisi, ovvero recEK_C122S è presente sia nel lisato totale sia nella frazione solubile.

Probabilmente la lisi accentua l'autocatalisi e/o il precursore non risulta sufficientemente solubile. Per risolvere il dubbio, gli stessi campioni del clone#1 in C41 sono stati caricati insieme al pellet corrispondente.

Come evidenziato dal gel mostrato in Figura 37, il prodotto di fusione sembra prevalentemente presente nel pellet anche se potrebbe rappresentare solo una parte del prodotto, visto che la recEK_C122S è presente nella frazione solubile, ovvero ha subito l'autocatalisi.

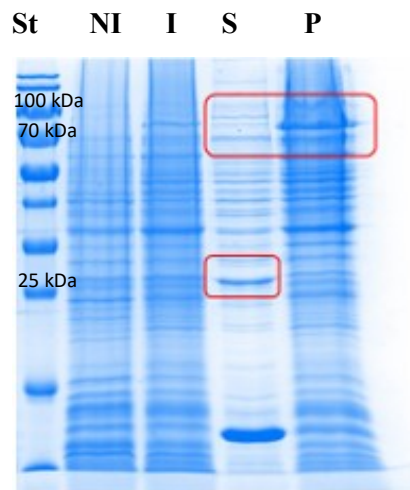


Figura 37. Test di solubilità per il clone#1 in C41.

Nell' SDS-PAGE al 12% sono stati caricati 10 μ l del campione non indotto (NI) e dell'indotto (I) e 10 μ l del soprannatante dopo la lisi LTs (frazione solubile) e del pellet normalizzato sul volume del soprannatante. St indica lo standard di peso molecolare pEqGOLD.

Uno dei cloni ottenuti in C41 è stato utilizzato per l'espressione in media scala (500 ml di coltura), come descritto in M.M., per ottenere il pellet da utilizzare per la purificazione.

Per le prove preliminari la coltura indotta è stata suddivisa in quattro aliquote da 125 ml.

4.8 Purificazione dell'Enterochinasi e valutazione della sua attività

La purificazione dell'Enterochinasi inizia con la risospensione del pellet in idoneo buffer di lisi addizionato di Benzonasi e Lisozima per favorire la degradazione del DNA e la lisi cellulare durante una breve incubazione a 4°C, seguita da sonicazione.

Alla sonicazione segue la centrifugazione del campione a 12000 g per ottenere il lisato chiarificato (L), che verrà trattato mediante una cromatografia IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) per la purificazione della recEK_C122S, che possiede cinque istidine al C-terminale.

Le soluzioni utilizzate per la cromatografia sono descritte in M.M.

In breve, è stato condotto un test preliminare con un pellet di 0,63 gr ottenuto da 125 ml della coltura indotta.

È stato utilizzato un test di purificazione, che prevede la risospensione in 12 ml di buffer di lisi (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, Benzoni 4U/ml e Lisozima 0,2 mg/ml), l'incubazione a 4°C per 20 minuti, la sonicazione ed una ulteriore aggiunta di buffer di lisi (12 ml) per facilitare la solubilizzazione.

Dopo aver centrifugato il lisato a 12000 g per 20 minuti a 4°C, al sopranatante è stato aggiunto 1 ml di *resina Ni-IDA G-biosciences* equilibrata con 25 mM Tris/HCl pH 8.0 e 150 mM NaCl (tampone di equilibratura).

Dopo l'incubazione per quattro ore a 4°C in agitazione blanda, la sospensione è stata caricata su una colonnina per la successiva eluizione, che prevede due lavaggi con concentrazioni crescenti di NaCl nel tampone di equilibratura e l'eluizione finale in presenza di imidazolo 0.5 M, come descritto in M.M.

I campioni eluiti dalla cromatografia sono stati analizzati con un SDS-PAGE al 12% per valutare il processo di purificazione (Figura 38).

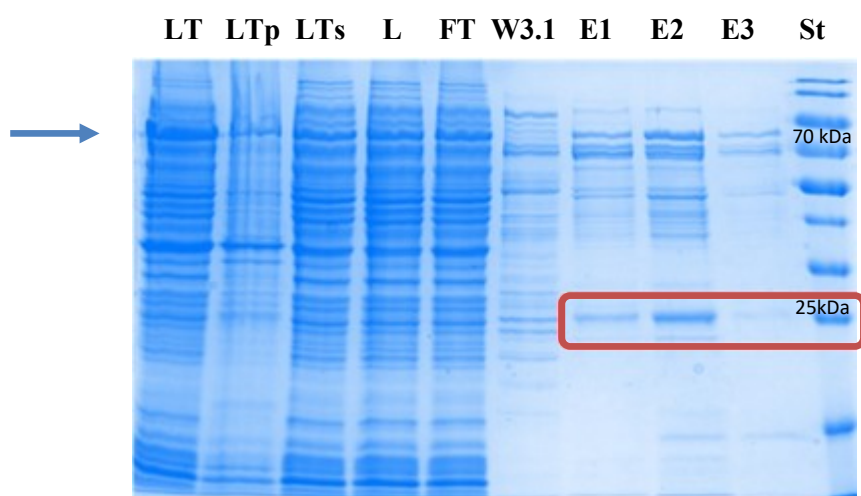


Figura 38. Campioni della purificazione su Ni-IDA.

Nell' SDS-PAGE al 12% sono stati caricati 10 μ l del lisato totale (LT), 10 μ l del soprannatante dopo la lisi e la sonicazione. Un' aliquota del lisato è stata utilizzata per il test di solubilità e per i campioni da 10 μ l di pellet normalizzato sul volume del soprannatante (LTp) e di LTs (frazione solubile). Nel pozzetto L sono stati caricati 20 μ l del lisato diluito 1:1, il FT contiene 20 μ l del materiale non legato ed il campione W3.1 contiene 20 μ l del materiale eluito con il lavaggio 3. E1, E2 ed E3 contengono le frazioni eluite con 0.5 M di imidazolo. St indica lo standard di peso molecolare pegGOLD.

Dal gel mostrato sopra, si osserva che gran parte della recEK_C122S (evidenziata in rosso) si trova nella frazione solubile LTs, così come gran parte della proteina fusa con la MBP (freccia blu). Su base teorica la proteina di fusione intera è di 71,5 kDa, la porzione di MBP è di 44 kDa e la recEK_C122S è di 26,8 kDa.

Per quanto riguarda la cromatografia il materiale non legato è apparentemente molto simile a quello caricato, prospettando una scarsa capacità di binding oppure la saturazione della resina. I vari lavaggi hanno mostrato rilevanti quantità di proteine eluite, a parte la prima frazione con il lavaggio 3 (caricata su gel).

Il pool della cromatografia di affinità (frazioni E1-E3) è stato dializzato due volte contro 500 ml di tampone (20 mM di Tris/HCl pH 7.4, 200 mM NaCl e 20%

Glicerolo) ed al termine della dialisi è stato aggiunto alla soluzione un ulteriore 20% di glicerolo per la conservazione a -20°C.

Il test di attività è stato svolto con il substrato di controllo in dotazione con l'enzima EK commercializzato dalla Novagen, utilizzando il seguente protocollo:

Reagenti	1	2	3	4	5	6	7	8
Substrato (1 µg/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Cleav. Buffer 10x	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
RecEK _C122S	/	4 µl	2 µl	2 µl (1:10)	2 µl (1:20)	/	/	/
recEK Novagen	/	/	/	/	/	/	2 µlB (0,04U)	2 µlA (0,2U)
H2O	7 µl	3 µl	5 µl	5 µl	5 µl	7 µl	5 µl	5 µl

Tabella 9. Protocollo per il test di attività di recEK_C122S.

La reazione è stata condotta per 16 ore a t.a. (20-22°C) ed i campioni sono stati caricati in SDS-PAGE al 12%.

Il substrato dell'EK commerciale, di circa 48 kDa, se tagliato dall'enzima produce due frammenti di 16 kDa e 32 kDa.

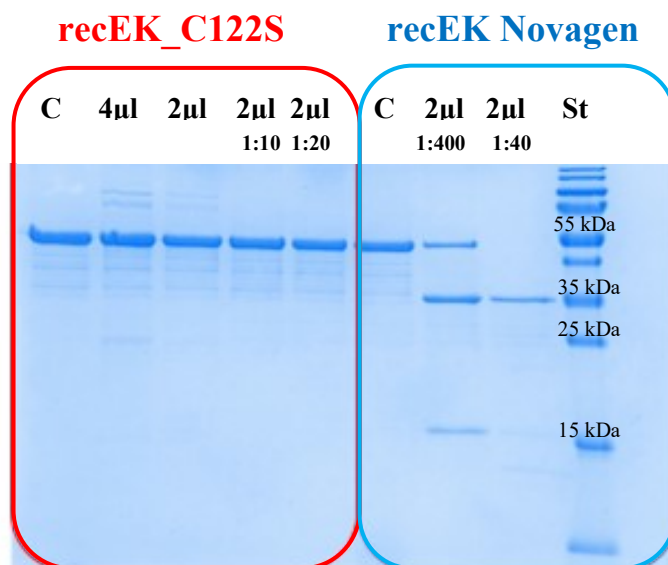


Figura 39. Test di attività per *recEK_C122S*.

*Nell' SDS-PAGE al 12% sono stati caricati i campioni sottoposti alla digestione. Nel riquadro blu sono mostrati i campioni relativi al controllo positivo, ottenuti con 0,2U (2 µl diluiti 1:40) e 0,04U (2 µl diluiti 1:400) di EK Novagen. Nel riquadro rosso, il substrato per l'EK è stato incubato con diverse concentrazioni di *recEK_C122S*. Con C viene indicato il substrato senza l'aggiunta di enzima.*

Come appare evidente dal gel mostrato sopra, la nostra preparazione non era attiva. Dopo aver provato di nuovo il *refolding* suggerito da *Skala et al.* con scarso successo abbiamo optato per un approccio alternativo, utilizzando nella fase di espressione l'autoinduzione al posto dell'aggiunta di IPTG, descritta nel dettaglio in M.M.

In breve, una colonia ottenuta con la trasformazione di *E. Coli* C41 è stata incubata in 5 ml di LB-MOD per tutto il giorno a 37°C in agitazione e successivamente sono stati versati i 5 ml in 45 ml di LB-MOD per il pre-inoculo, che deve raggiungere la saturazione.

Dopo aver controllato la crescita e verificato la saturazione, i 50 ml di pre-inoculo sono stati inoculati in 500 ml di TB-MOD per l'autoinduzione, a 30°C in agitazione per 24 ore.

Dopo l'autoinduzione, i 500 ml sono stati suddivisi in quattro aliquote da 125 ml e sono stati ottenuti quattro pellet di circa 2,7 gr.

Uno dei pellet è stato utilizzato per testare il nuovo protocollo di purificazione adottato in precedenza.

Nella figura che segue viene mostrato il profilo di eluizione della cromatografia su Ni-IDA.

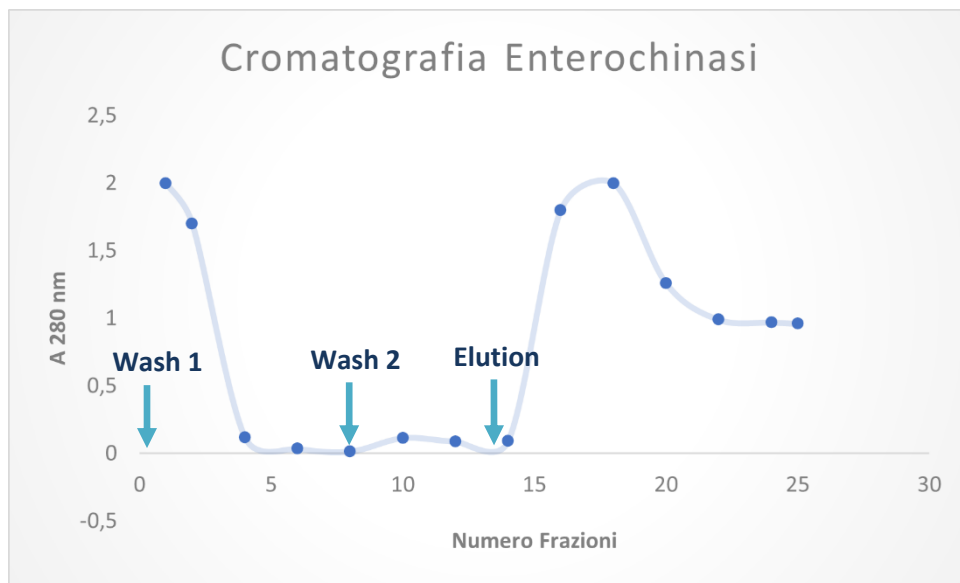


Figura 40. Cromatografia su Ni-IDA per la rec-EK_C122S.

In questo grafico sono riassunti i dati dei valori di assorbanza a 280 nm, determinati sulle frazioni eluite dalla cromatografia di affinità.

Si osserva come nelle fasi iniziali di lavaggio vengano allontanati i vari contaminanti e successivamente all'aggiunta della soluzione di eluizione, contenente l'imidazolo che compete con il tag di istidina per il legame con lo ione nichel, si innalza un nuovo picco correlato con il distacco delle proteine che contengono il tag di istidine dalla resina.

Sono state prelevate delle aliquote dalle varie frazioni di eluizione per avere una visione più chiara mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 12% (figura 41).

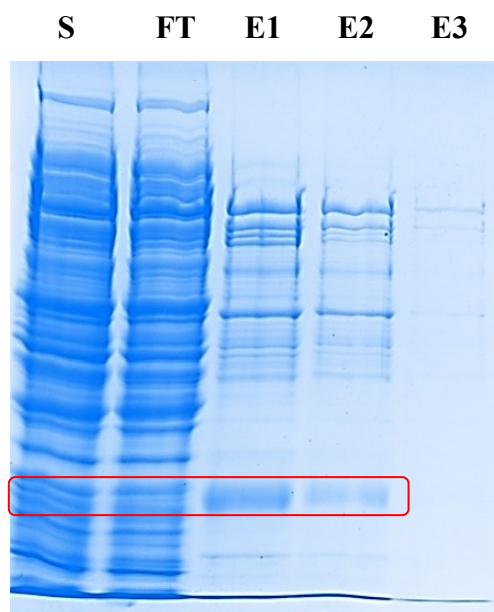


Figura 41. Campioni della purificazione su Ni-IDA.

Nell'SDS-PAGE al 12% sono stati caricati 10 μ l di soprannatante post-incubazione con la resina (S), 10 μ l di flow through (FT), 12 μ l delle eluizioni E1, E2 ed E3.

Osservando l'immagine sopra si può notare come nel campione del soprannatante sia presente la banda corrispondente all'Enterochinasi, mentre nel FT non risulta visibile.

Nelle frazioni principali di eluizione (E1-E2-E3) è possibile osservare la presenza sia del prodotto di fusione sia dell'Enterochinasi (evidenziata in rosso).

Questo perché il prodotto è in grado di attivarsi, riconoscere il sito di taglio specifico ed attuare un'autocatalisi.

Per essere certi di ottenere un prodotto funzionale e correttamente foldato sono stati effettuati step di dialisi, *refolding* e concentrazione.

Queste tecniche sono descritte nel dettaglio in M.M.

La dialisi dell'Enterochinasi è stata eseguita utilizzando un tubo da dialisi con *cut-off* di 3.5 kDa. La procedura aiuta essenzialmente a purificare il campione, allontanando contaminanti residui, e ad aumentare la probabilità di proteine solubili e foldate, disciolte in un tampone adeguato e in una concentrazione adatta al successivo trattamento di ultrafiltrazione, effettuata mediante un concentratore PM10 a temperatura ambiente, centrifugando a 3000 g per 20 minuti.

In particolare, sia la dialisi che il *refolding* sono stati eseguiti in agitazione, con l'aiuto di un magnetino. Questo perché l'aerazione è un parametro importante per un corretto ripiegamento e formazione dell'Enterochinasi attiva [4].

L'ossigenazione, infatti, favorisce la formazione di ponti disolfuro, legami covalenti alla base della struttura dell'enzima.

Il ponte disolfuro è il risultato dell'ossidazione dei gruppi tiolici (-SH) di due cisteine ed in questa reazione l'ossidante può essere rappresentato proprio dall'ossigeno presente nell'aria.

L'agente che media la formazione e la degradazione di ponti disolfuro nella maggior parte delle proteine è il tripeptide glutatione o GSH, un coenzima versatile costituito da cisteina, glicina e glutammato, presente nella soluzione per il *refolding* (in M.M.).

Per poter valutare se l'Enterochinasi ricombinante prodotta con questo approccio fosse correttamente foldata e attiva è stato effettuato un test di digestione in piccola scala su un substrato specifico.

Protocollo di digestione:

	recEK_C122S	EK Novagen	ND
Pool	5 µl	2 µl (1:50)	/
Substrato	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Buffer	1 µl	1 µl	1 µl
H₂O	2,5 µl	5,5 µl	7,5 µl

Tabella 10. Protocollo di digestione in piccola scala.

Per determinare al meglio l'attività dell'Enterochinasi prodotta è stato fatto un confronto con quella dell'Enterochinasi commerciale Novagen.

La digestione è avvenuta a temperatura ambiente o.n.

Il risultato è stato valutato mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide (Figura 42).

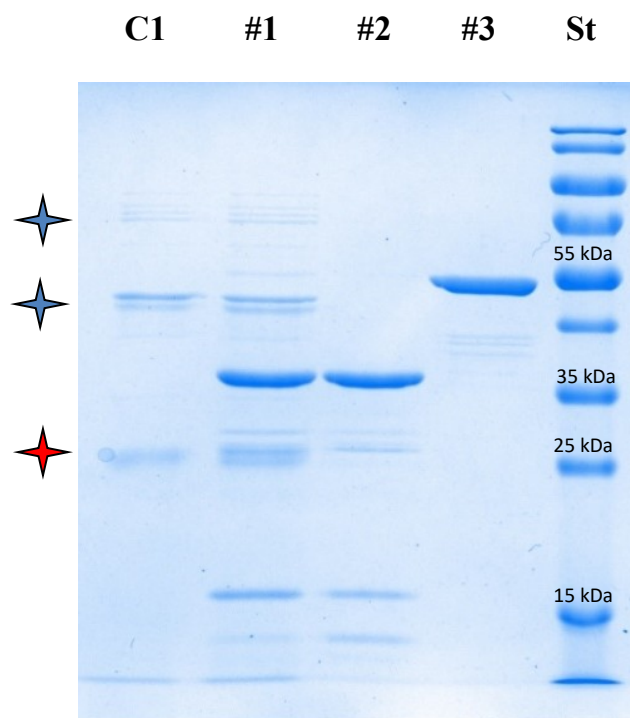


Figura 42. Test di attività in piccola scala.

Nell' SDS-PAGE al 12% sono presenti: 5 μ l di rec-EK_C122S (C1), 5 μ l, di rec EK_C122S prodotta + il substrato (#1), 2 μ l di EK Novagen (diluata 1:50) + il substrato (#2) e 1,5 μ l di substrato senza enzimi (#3). Lo Standard (St) utilizzato è il peqGOLD.

Come ben visibile dal risultato del gel, le attività dell'Enterochinasi prodotta e dell'Enterochinasi commerciale sono pressoché paragonabili. Il substrato specifico dell'Enterochinasi è digerito completamente in entrambi i casi.

Analizzando questo gel è possibile osservare che la quantità di proteina ricombinante (asterisco rosso) nelle nostre preparazioni C1 e #1 è maggiore rispetto alla proteina commerciale visibile in #2, anche se l'attività è più bassa sulla base dei volumi utilizzati (5 μ l della nostra preparazione vs 2 μ l di uno stock diluito 1:50 della proteina commerciale).

Ovviamente l'attività del nostro enzima dovrà essere opportunamente valutata con un saggio più accurato (utilizzando un substrato fluorescente), così come dovrà essere ri-valutata la produzione/purificazione in scala maggiore. Infatti, l'enzima ricombinante prodotto in 2,4 ml finali deriva da 125 ml di coltura. In teoria, assumendo che in 5 µl siano presenti le stesse unità dell'enzima commerciale 0,17U la nostra preparazione contiene $0,17 \text{ U}/5 \text{ µl} = 0,034 \text{ U}/\text{µl} \times 2,4 \text{ ml}$ finali per un totale di 82 Unità ovvero l'equivalente di circa 1,5 confezioni di enzima ricombinante (Da 500 ml di coltura autoindotta si possono ottenere 326 U equivalenti a 6,5 confezioni per un valore commerciale di 1000 euro).

La presenza di contaminanti intorno a 40 kDa e 70 kDa nella nostra preparazione deriva dai residui del prodotto di fusione iniziale di circa 71 kDa (dato da 6xHis-MBP-TEV-EK-recEK_C122S-5xHis) che non ha subito l'autoproteolisi prima della purificazione e che probabilmente nella fase di refolding viene processato producendo 6xHis-MBP, di circa 45 kDa.

Per i nostri scopi questi contaminanti non rappresentano un problema perché, in genere, se le proteine ricombinanti vengono prodotte con l'His tag all'N-terminale necessitano del taglio e della rimozione del Tag, che dovrà avvenire con la cromatografia IMAC per sottrazione (il prodotto ricombinante senza tag non si lega ed eluisce durante il caricamento ed il tag rimane legato alla resina).

4.9 Purificazione di CXCL12 δ

La purificazione inizia con la risospensione del pellet cellulare nella specifica soluzione di lisi (come descritto in M.M.). Il pellet è stato ottenuto in seguito al processo di espressione, utilizzando una coltura da 500 ml di LB indotta con 0,3 mM IPTG per 3 ore a 37°C. Successivamente è stata effettuata una lisi meccanica delle cellule utilizzando il sonicatore.

Prima di procedere con la cromatografia è utile eseguire un test di controllo in piccola scala per valutare se la proteina si trovi in soluzione (solubile) oppure no. In particolare, durante il processo di lisi sono state prelevate delle aliquote, con le quali è stata allestita una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 12% per analizzare dove si trovasse la proteina di interesse (Figura 43).

Tutti i valori sono normalizzati per volume, in maniera tale da rendere confrontabili le bande osservate.

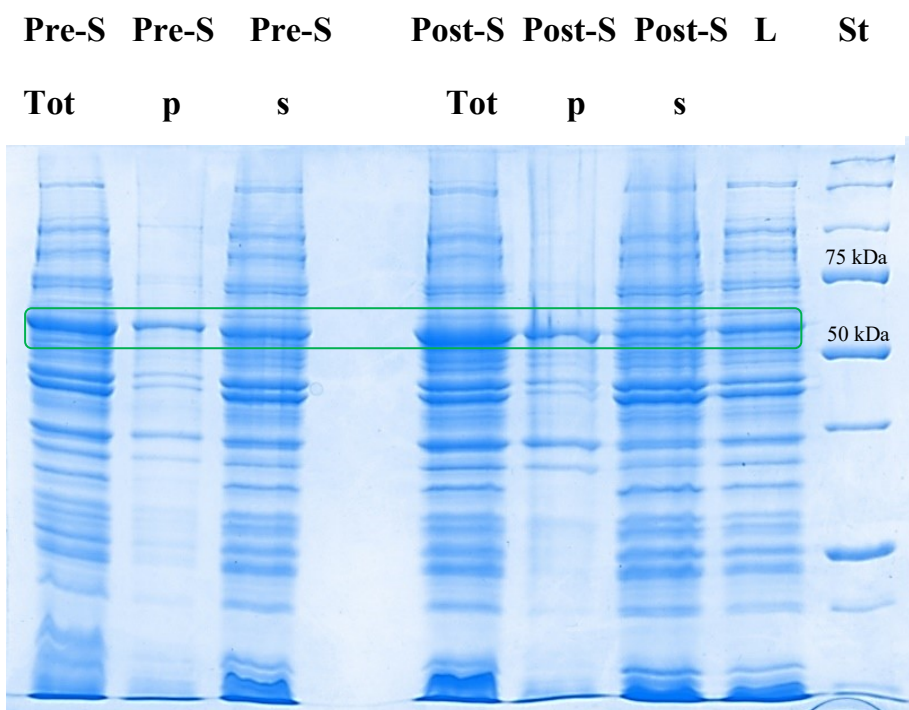


Figura 43. Campioni relativi al processo di lisi.

Nell' SDS-PAGE al 12% sono presenti: 10 μ l di soprannatante (L), 10 μ l del campione totale pre-sonicazione (Pre-S tot), 10 μ l di pellet e soprannatante pre-sonicazione ottenuti mediante centrifugazione (Pre-Sp e Pre-Ss), 10 μ l di campione totale post-sonicazione (Post-S tot), 10 μ l di pellet e soprannatante post-sonicazione ottenuti mediante centrifugazione (Post-Sp e Post-Ss). Lo Standard (St) utilizzato è il Precision plus Protein Standards Unstained.

Dall'immagine si può notare come la maggioranza delle proteine sia presente in soluzione, compresa la proteina di interesse (prodotto di fusione di circa 60 kDa). Nonostante un 30% della proteina di fusione sia presente nel pellet, la presenza di MBP ne favorisce la solubilizzazione.

Precedenti esperimenti avevano già dimostrato come l'induzione della chemochina CXCL12 δ fosse inferiore rispetto alle altre isoforme e come la sua purificazione non fosse efficiente.

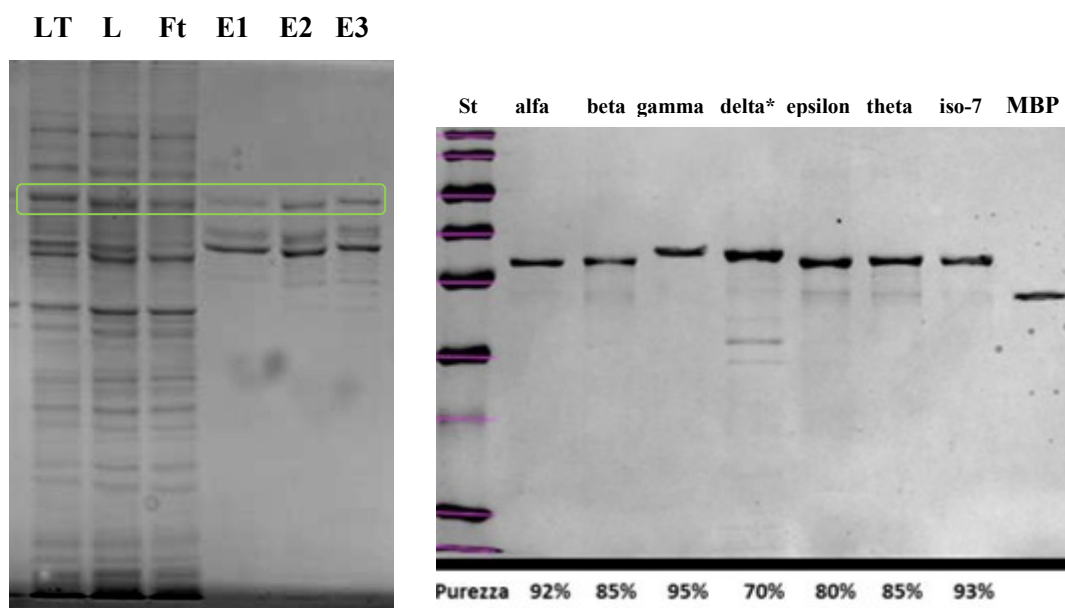


Figura 44. Purificazione dell'isoforma- δ in C41.

A sinistra, gel SDS-PAGE al 12% nel quale sono stati caricati 10 μ l del lisato totale (LT), lisato chiarificato (L), materiale non legato (Ft) e le frazioni di eluato E1, E2, ed E3. A destra, gel SDS-PAGE al 12% nel quale sono state caricate delle aliquote dei prodotti di fusione ottenuti per le isoforme CXCL12. L'asterisco sull'isoforma delta indica che il prodotto utilizzato deriva da due cromatografie: Ni-IDA + MBR. In basso i valori di purezza determinati con l'analisi delle bande. St è lo Standard Precision Plus Biorad.

Come mostrato nelle in Figura 44, a sinistra, la cromatografia basata sul recupero mediante His-tag, utilizzata in precedenza, non risultava molto efficiente. Il grado di purezza era inferiore al 50% ed il recupero era basso, perché solo il 50% della proteina si legava alla matrice. Il materiale non legato caricato di nuovo in Ni-IDA non dava un recupero accettabile, così si è deciso di caricarlo su una matrice di amilosio, ottenendo un campione con una purezza del 70% (Figura 44, a destra). Per tale motivo, in questo lavoro di tesi, è stato tentato l'approccio della purificazione diretta con una resina a base di amilosio, per la quale il tag MBP ha elevata affinità.

Trascorso un tempo di incubazione a 4°C soprannatante-resina pari a due ore, è stato effettuato il caricamento della colonna per la cromatografia.

È stato fatto un unico lavaggio per eliminare i vari contaminanti ed infine è stato aggiunto un eccesso di competitore, il maltosio, per favorire l'eluizione del prodotto di interesse.

L'andamento della cromatografia è rappresentato di seguito:

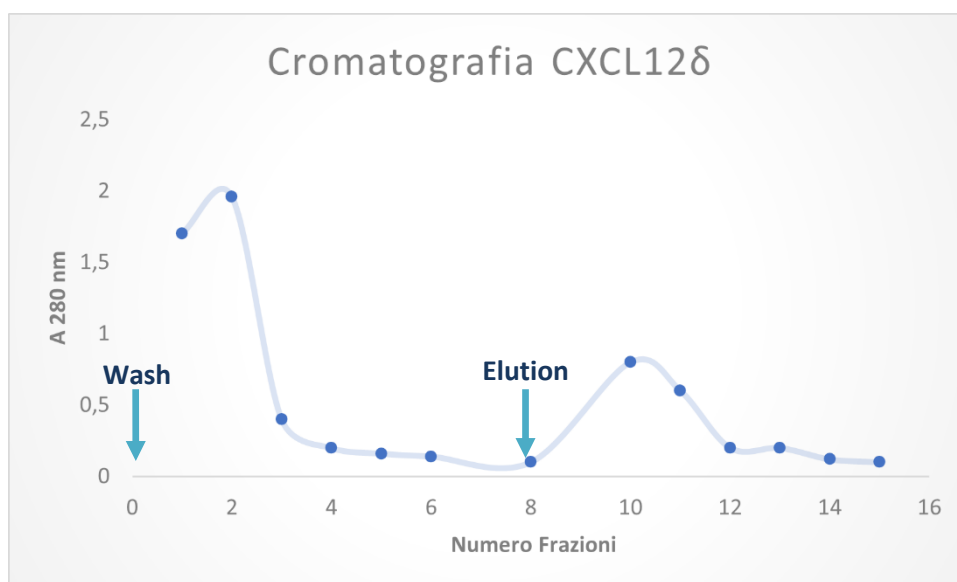


Figura 45. Cromatografia di affinità (MBP tag) per la purificazione di CXCL12δ.

In questo grafico sono riassunti i dati dei valori di assorbanza a 280 nm, determinati sulle frazioni eluite dalla cromatografia di affinità.

Nel grafico si osservano due picchi, il primo relativo al lavaggio che ha allontanato la maggior parte dei contaminanti che non sono in grado di prendere contatto con la resina, mentre il secondo picco è legato al processo di eluizione in seguito all'aggiunta del competitore per il legame con l'amilosio della matrice.

In questo caso la resa è stata paragonabile a quella ottenuta con la cromatografia IMAC, ma il grado di purificazione è migliore.

La corsa elettroforetica è stata allestita su gel di poliacrilammide al 12% (Figura 46).

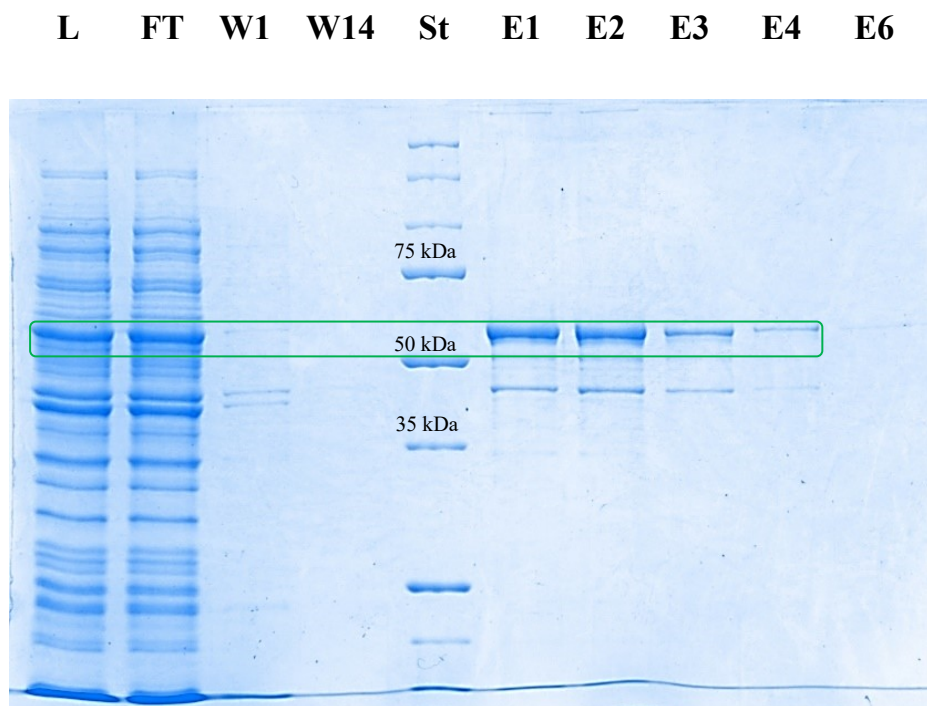


Figura 46. Campioni ottenuti in seguito alla cromatografia di affinità (MBP tag) per CXCL12 δ .

Nell' SDS-PAGE al 12% sono stati caricati: 10 μ l di campione di soprannatante (L), 10 μ l di flow through (FT), rispettivamente 10 μ l e 20 μ l delle frazioni di lavaggio 1 (W1) e 14 (W14) e 10 μ l delle frazioni di eluizione E1, E2, E3, E4 ed E6. LoStandard (St) utilizzato è il Precision plus Protein Standards Unstained.

Le frazioni di eluato E1-E2 sono quelle più concentrate e per la preparazione finale sono state raccolte le frazioni da E1 ad E4.

Come accennato in precedenza, il recupero di CXCL12 non è efficientissimo, in effetti si nota che parte del prodotto di interesse viene perso nel FT, quindi non si lega adeguatamente.

In ogni caso, le frazioni di interesse sono state unite, concentrate mediante un apparato di ultrafiltrazione e successivamente dializzate per 24 ore a 4°C contro 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl e 10% Glicerolo.

4.10 Test di attività EK-CXCL12δ in piccola scala

Nei precedenti esperimenti si è dimostrato come l'Enterochinasi prodotta sia in grado di svolgere la sua attività in maniera paragonabile all'Enterochinasi commerciale, su specifico substrato.

Una volta ottenuta la citochina CXCL12δ sottoforma di prodotto di fusione, è stato testato se l'Enterochinasi fosse in grado di purificarla, ovvero se fosse in grado di liberare CXCL12δ dal suo tag, mediante il taglio specifico sulla sequenza DDDDK. È stato preparato un protocollo di digestione che prevedeva l'aggiunta di quantità crescenti di Enterochinasi ricombinante prodotta nel nostro laboratorio e di Enterochinasi commerciale a circa 2 µg del prodotto di fusione di CXCL12δ.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CXCL12δ	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	/
recEK_C122S	/	2 µl	4 µl	8 µl	/	/	/	/	8 µl
EK Novagen	/	/	/	/	/	1 µl (1:80)	2 µl (1:40)	4 µl (1:20)	/
H₂O	10 µl	8 µl	6 µl	2 µl	10 µl	9 µl	8 µl	6 µl	12 µl
Vol. Fin.	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Tabella 11. Protocollo di digestione EK-CXCL12δ.

In incubatore INNOVA per 6 ore a 20°C a 50 RPM.

Trascorse 6 ore di incubazione, sono state prelevate delle aliquote da 10 µl da congelare in modo da analizzarle successivamente mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide.

Per la restante parte del campione l'incubazione è stata protratta nelle stesse condizioni, ma per 22 ore. Ciò per valutare eventuali differenze nei diversi tempi di incubazione. Anche in questo caso, trascorso il tempo di incubazione, sono state prelevate delle aliquote per l'analisi su gel di poliacrilammide.

La corsa elettroforetica è stata allestita a partire da un gel al 15% (Figure 47 e 48).

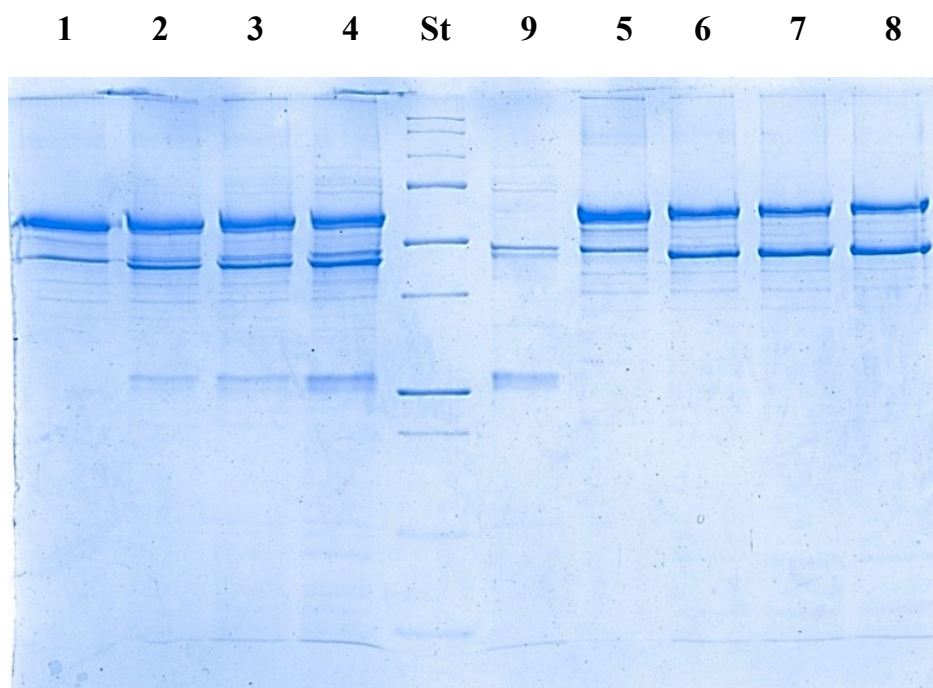


Figura 47. Digestione EK-CXCL12 δ per 6 ore.

Sull' SDS-PAGE al 15% sono presenti: il controllo non digerito con CXCL12 δ (1), il campione digerito con CXCL12 δ + recEK_C122S, in quantità crescente (2, 3 e 4, rispettivamente 2 μ l, 4 μ l e 8 μ l), il controllo non digerito con CXCL12 δ (5), il campione digerito con CXCL12 δ + EK Novagen, in quantità crescente (6, 7 e 8, rispettivamente 1 μ l, 2 μ l e 4 μ l) ed il controllo pool recEK_C122S (9). Lo Standard (St) utilizzato è il Precision plus Protein Standards Unstained

PESO MOLECOLARE
CXCL12 δ \rightarrow ~ 17 kDa
EK \rightarrow ~ 27 kDa

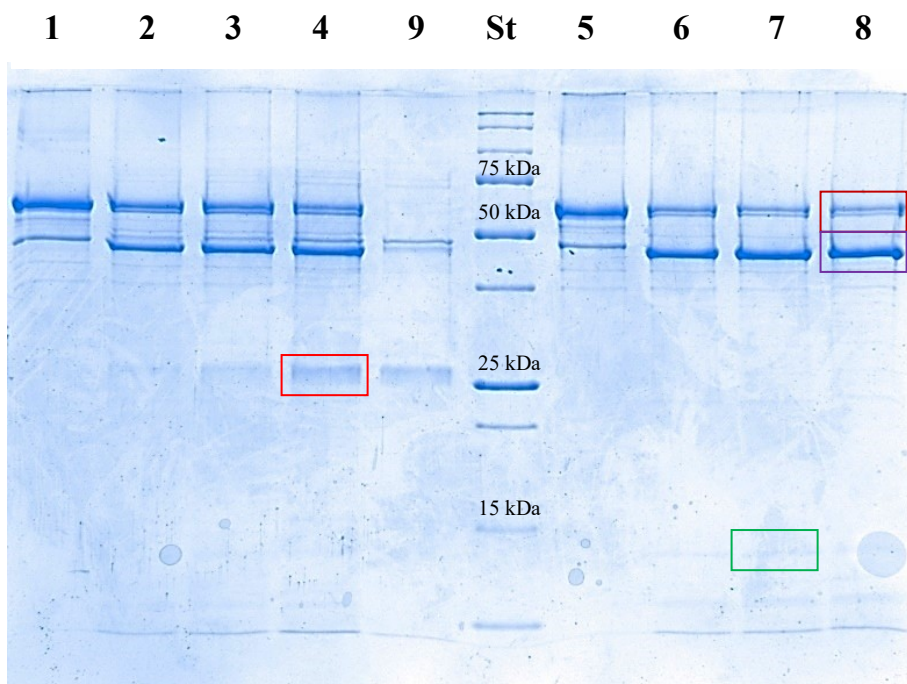


Figura 48. Digestione EK-CXCL12 δ per 22 ore.

Sull' SDS-PAGE al 15% sono presenti: il controllo non digerito con CXCL12 δ (1), il campione digerito con CXCL12 δ + recEK_C122S, in quantità crescente (2, 3 e 4, rispettivamente 2 μ l, 4 μ l e 8 μ l), il controllo non digerito con CXCL12 δ (5), il campione digerito con CXCL12 δ + EK Novagen, in quantità crescente (6, 7 e 8, rispettivamente 1 μ l, 2 μ l e 4 μ l) ed il controllo pool recEK_C122S (9). Lo Standard (St) utilizzato è il Precision plus Protein Standards Unstained

- **Prodotto di fusione** MBP + CXCL12 δ
- Maltose Binding Protein (**MBP**)
- **Enterochinasi** (recEK_C122S) in eccesso
- **CXCL12 δ** , rappresentata da una banda con poco materiale, che migra sotto i 15 kDa. La migrazione anomala per queste citochine è già stata descritta in letteratura come caratteristica ricorrente di tale tipologia di proteine basiche.

La bassa quantità di chemochina visualizzata nel gel potrebbe anche derivare da fenomeni di precipitazione, che erano stati osservati in precedenza e che avevano richiesto dopo il taglio un passaggio di denaturazione e *refolding*.

La digestione è particolarmente visibile tramite l'accumulo della Maltose Binding Protein, la cui intensità di banda aumenta all'aumentare della concentrazione dell'enzima.

Per analizzare quanto fosse efficiente questa digestione enzimatica, è stata effettuata una valutazione semi-quantitativa sulla base dell'intensità delle bande sul gel di poliacrilammide (Tabella 12).

Considerando come 100% l'intensità delle bande di prodotto di fusione dei campioni non digeriti (1 e 5), ne è risultato che all'aumentare degli enzimi, il prodotto di fusione diminuisce e aumenta proporzionalmente la banda corrispondente alla MBP, come mostrato nella seguente tabella.

	Posizione Banda	% Intensità Banda
Lane 1	1	100%
Lane 2	1	56%
	2	44%
Lane 3	1	51%
	2	49%
Lane 4	1	30%
	2	70%
Lane 5	1	100%
Lane 6	1	37%
	2	63%
Lane 7	1	31%
	2	69%
Lane 8	1	23%
	2	77%

Tabella 12. Valutazione semi-quantitativa della reazione di digestione.

Dall'analisi delle bande si può notare che, alle concentrazioni utilizzate, l'attività dell'Enterochinasi *home-made* e dell'Enterochinasi commerciale è simile.

L'attività dell'Enterochinasi commerciale sembra essere maggiore di circa il 10% e questo fatto è legato alla maggiore concentrazione di enzima Novagen, mettendo in luce la necessità di ottenere uno stock recEK_C122S più concentrato e più attivo, prolungando la fase di *refolding* e aggiungendo più glicerolo nella preparazione finale per preservare al meglio l'attività enzimatica.

Per verificare l'effettiva produzione di CXCL12 δ si è ripetuta la reazione di digestione caricando più materiale ed utilizzando un gel 1.5 mm (mentre gli altri utilizzati sono tutti 0.75 mm) al 15%.

	Non Dig	Dig
CXCL12 δ	10 μ l	25 μ l
recEK_C122S	/	8 μ l
H ₂ O	20 μ l	3 μ l
Buffer 10x	/	4 μ l

Tabella 13. Protocollo di digestione EK-CXCL12 δ caricando più materiale.

La digestione è stata allestita in 40 μ l usando 4 μ l del buffer di reazione 10x, 25 μ l della preparazione di CXCL12 δ , 8 μ l della preparazione di recEK_C122S e 3 μ l di acqua. Dopo l'incubazione o.n. a 20°C a 50 RPM (~ 16 ore), 30 μ l del campione digerito sono stati caricati nel gel all'1,5%.

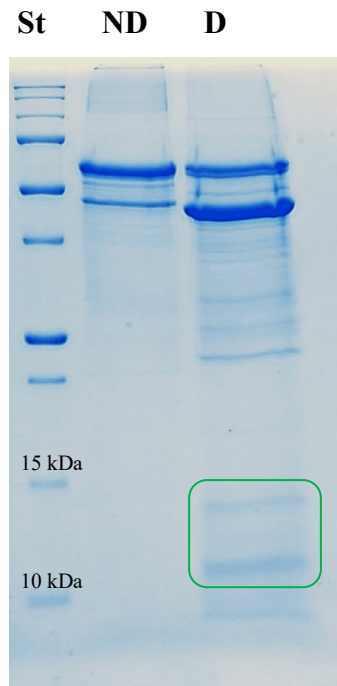


Figura 49. Digestione EK-CXCL12 δ .

Nell' SDS-PAGE al 15% sono presenti: il controllo non digerito con 10 μ l di CXCL12 δ (ND) ed il campione digerito con recEK_C122S + CXCL12 δ (D). Lo Standard utilizzato è il Precision plus Protein Standards Unstained.

Si può notare anche in questo gel che circa il 70% del prodotto di fusione è stato digerito.

Per quanto riguarda la chemochina CXCL12 δ , si riescono a visualizzare due bande tra 15 kDa e 10 kDa, probabilmente correlato allo stato di ossidazione dei ponti disolfuro.

La migrazione è anomala, in quanto il peso della chemochina dovrebbe aggirarsi intorno a 17 kDa, ma come accennato in precedenza, trattandosi di una proteina basica, questo aspetto non è insolito.

Nel risultato di Figura 49, si può osservare che la banda prevalente, in seguito alla digestione, è quella a più basso peso molecolare, che dovrebbe corrispondere alla proteina correttamente ripiegata. Ciò si può evidenziare facendo un confronto tra questo risultato e gli esperimenti precedenti (Figura 50), dove la banda a più alto peso molecolare era evidente soprattutto nel pellet e diminuiva dopo la rinaturazione (dialisi).

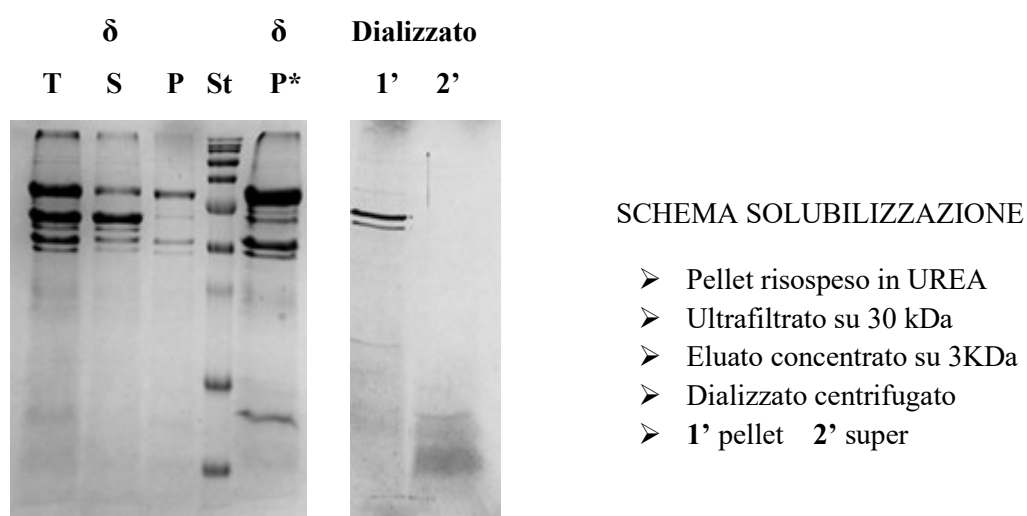


Figura 50. Test di solubilità dopo la digestione con l'Enterocinasi.

A sinistra, gel SDS-PAGE al 15% nel quale sono stati caricati 18 μ l di miscela di digestione (massimo volume) dopo l'incubazione per 24 ore (T). Un'aliquota da 50 μ l di campione digerito è stata centrifugata a 15000 g per 15 minuti al fine di ottenere la frazione solubile (S) e la frazione precipitata (P), risospesa in 50 μ l di SDS-SB2X. Il campione δP^* corrisponde al pellet della miscela di digestione risospeso in 1/5 del volume iniziale. St è lo Standard Precision Plus Biorad. A destra, schema di solubilizzazione e recupero di CXCL12 δ .

CONCLUSIONE

La produzione dell'**Enterochinasi** in laboratorio, utilizzando una procedura semplice ed economica, potrebbe essere applicata alla produzione su larga scala e risultare un'alternativa efficiente rispetto all'acquisto del costoso enzima commerciale.

Prendendo spunto dal lavoro di *Skala et al.* abbiamo cercato di rendere solubile il suo costrutto, contenuto in pET-15b-EK_C122S_His5, trasferendolo in pMCSG9 e generando il costrutto 6xHis-MBP-TEV-EK-recEK_C122S-5xHis.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'espressione come prodotto di fusione con la MBP migliora la solubilità dell'Enterochinasi, nel ceppo *E. Coli* C41, ma non è sufficiente a garantire il completo ripiegamento.

Per avere un adeguato ripiegamento bisogna favorire la corretta formazione dei quattro ponti disolfuro presenti nel dominio catalitico e per ottenere ciò sono state impiegate diverse strategie:

1. Ceppi di *E. Coli* ingegnerizzati per questo scopo;
2. Utilizzo di un sistema di espressione per autoinduzione, che rallentando la produzione di proteina ricombinante ne favorisce, in teoria, sia l'autoprocessamento sia il *refolding* prima della purificazione;
3. Purificazione con diverse matrici: IMAC o MBR;
4. *Refolding* e dialisi in diverse condizioni.

Dopo aver scelto il ceppo di *E. Coli* migliore per l'espressione, seguendo il protocollo di induzione con l'IPTG abbiamo prodotto e purificato la proteina ricombinante con la cromatografia IMAC e seguito, in parte (riducendo i volumi), il protocollo di *refolding* utilizzato da *Skala et al.*, ma la proteina prodotta non era attiva. Quindi abbiamo introdotto il protocollo di autoinduzione al posto dell'aggiunta di IPTG. Per la purificazione è stata mantenuta la cromatografia IMAC ed il protocollo di *refolding* è stato modificato per ottimizzare il recupero della proteina ricombinante attiva.

Questo approccio condotto su scala pilota con 125 ml di coltura ci ha permesso di ottenere l'enzima attivo e, anche se la resa ed il *refolding* potrebbero essere migliorati (per esempio aumentando il tempo di incubazione per l'autoinduzione si potrebbe favorire non solo il corretto ripiegamento, ma anche il processamento del precursore e di conseguenza ottenere una maggior quantità di Enterochinasi ricombinante), da 500 ml di coltura autoindotta si possono ottenere 326 U, equivalenti a 6,5 confezioni per un valore commerciale di 1000 euro.

Una grande quantità di Enterochinasi è richiesta per la produzione delle chemochine CXCL12, così l'enzima prodotto è stato utilizzato per una nuova preparazione di **CXCL12 δ** , durante la quale si è cercato di ottimizzare la purificazione utilizzando un solo step cromatografico su MBR.

Con questa cromatografia si ottiene un prodotto di fusione più puro rispetto a quello ottenuto con la cromatografia IMAC, con rese paragonabili.

L'Enteroquinasina prodotta è in grado di tagliare la CXCL12 δ , che si presenta parzialmente solubile e nelle forme ossidata e ridotta, che richiederanno uno step di *refolding*, che verrà condotto in modo simile a quello utilizzato con successo per la produzione dell'Enteroquinasina *home-made*.

La produzione di tale chemochina ricombinante, non ancora descritta in letteratura, apre la strada a numerose applicazioni, *in primis* la produzione di anticorpi specifici per questa isoforma, necessari per chiarire il suo coinvolgimento nei processi sia fisiologici sia patologici all'interno dell'organismo.

Una volta definito il suo ruolo, la proteina ricombinante funzionalmente attiva potrebbe essere utilizzata per scopi terapeutici, per esempio come nuovo biomarcatore prognostico e predittivo di diversi tumori. Potrebbe essere dosata per una migliore prognosi, previsione del potenziale metastatico, stadiazione e tropismo nel paziente.

L'ideale sarebbe approfondire lo studio relativo non solo a questa particolare isoforma, ma a tutte le varianti di splicing di CXCL12 non ancora ben caratterizzate.

È necessario individuare le funzioni specifiche di ciascuna isoforma, in modo da progettare terapie mirate sulla base dell'isoforma stessa.

Infatti, potrebbe emergere che, rispetto al tipo di patologia, alcune isoforme di CXCL12 dovrebbero essere bloccate ed altre somministrate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Young Su Kim, Hye-Jeong Lee, Sang-hyun Park, Yeu-chun Kim and Jungoh Ahn, “*Expression and purification of soluble and active human enterokinase light chain in Escherichia coli*”, Biotechnology Reports, vol 30, 2021.
- [2] Jin Xu, Shui Hu, Xiaoze Wang, Ziyue Zhao, Xinyue, Hao Wang, Dapeng Zhang and Yajun Guo, “*Structure basis for the unique specificity of medaka enteropeptidase light chain*”, Protein & Cell, vol 5 pp.178-181, 2014.
- [3] Wolfgang Skala, Peter Goetting and Hans Brandstetter, “*Do-it-yourself histidine-tagged bovine enterokinase: A handy member of the protein engineer’s toolbox*”, Journal of Biotechnology, vol. 168 (4) pp. 421-5, 2013.
- [4] Haidong Tan, Jinxia Wang and Zongbao (Kent) Zhao, “*Purification and refolding optimization of recombinant bovine enterokinase light chain overexpressed in Escherichia coli*”, ScienceDirect, vol.56 (1) pp. 40-7, 2007.
- [5] Yasunori Kitamoto, Xin Yuan, Qingyu Wu, David W. McCourt and Evan Salder, “*Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains*”, Biochemistry, vol.91 (16) pp. 7588-7592, 1994.
- [6] Edward R. La Vallie, Alnawaz Rehemtulla, Lisa A. Racie, Elizabeth A. DiBlasio, Cathy Ferenz, Kathleen L. Grant, Albert Light and John M. McCoy, “*Cloning and Functional Expression of a cDNA Encoding the Catalytic Subunit of Bovine Enterokinase*”, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268 (31) pp. 23311-23317, 1993.
- [7] Albert Light and Peter Fonseca, “*The Preparation and Properties of the Catalytic Subunit of Bovine Enterokinase*”, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 259 (21) pp.13195-13198, 1984.
- [8] Juris J. Liepnieks and Albert Light, “*The Preparation and Properties of Bovine Enterokinase*”, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 245 (5) pp. 1677-1683,1978.

- [9] Mario Lebendiker and Tsafi Danieli, “*Purification of proteins fused to maltose-binding protein*”, *Methods Mol Biol.*, vol. 681 pp. 281-293, 2011.
- [10] Monia Cecati, Matteo Giulietti, Alessandra Righetti, Berina Sabanovic and Francesco Piva, “*Effect of CXCL12 isoforms in pancreatic pre-tumor cellular model: Microarray analysis*”, *World Journal of Gastroenterology*, vol. 27 (15) pp. 1616-1629, 2021.
- [11] Arianna Capucetti, Francesca Albano and Raffaella Bonecchi, “*Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology*”, *frontiers in Immunology*, vol.11 pp. 1259, 2020.
- [12] Eva M. Garcia-Cuesta, Cesar A. Santiago, Jesus Vallejo-Diaz, Yasmina Juarranza, José Miguel Rodriguez-Frade and Mario Mellado, “*The Role of the CXCL12/CXCR4/ACKR3 Axis in Autoimmune Diseases*”, *frontiers in Endocrinology*, vol. 10 pp. 585, 2019.
- [13] Alessandra Righetti, Matteo Giulietti, Berina Sabanovic, Giulia Occhipinti, Giovanni Principato and Francesco Piva, “*CXCL12 and Its Isoforms: Different Roles in Pancreatic Cancer?*”, *J. Oncol.*, vol. 2019 (9) pp. 681-698, 2019.
- [14] Weiqiang Zhou, Shanchun Guo, Mingli Liu, Matthew E. Burow and Guangdi Wang, “*Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Tumor Immunotherapy*”, *HHS Public Access, Curr. Med. Chem.*, vol. 26 (17) pp. 3026-3041, 2019.
- [15] Philip M. Murphy and Lauren Heusinkveld, “*Multisystem multitasking by CXCL12 and its receptors CXCR4 and ACKR3*”, *HHS Public Access, Cytokine*, vol.109 pp. 2-10, 2018.
- [16] Evelina Vagesjo, Emelie Ohnstedt, Anneleen Mortier, Hava Lofton, Fredrik Huss, Oaul Proost, Stefan Roos and Mia Phillipson, “*Accelerated Wound healing in mice by oh-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria*”, *PNAS*, vol 115 (8) pp. 1895-1900, 2018.
- [17] Rik Jansses, Sofie Struyf and Paul Proost, “*The unique structural and functional features of CXCL12*”, *Cellular & Molecular Immunology*, vol. 15 pp. 299-311, 2017.

- [18] Shuang Zhao, S. Laura Chang, Jennifer J. Linderman, Felix Y. Feng and Gary D. Luker, “*A comprehensive Analysis of CXCL12 Isoforms in Breast Cancer*”, *Translational Oncology*, vol 7 (3) pp. 429-438, 2014.
- [19] Beverly A. Teicher and Simon P. Fricker, “*CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer*”, *Clinical Cancer Research*, vol. 16 (11), 2010.
- [20] Studier, F.W., “*Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures*”, *Protein Expression Purif.*, vol. 41, pp. 207-34, 2005.
- [21] Kremling, K. Bettenbrock, B. Laube, K. Jahreis, J.W. Lengeler, E.D. Gilles, “*The Organization of Metabolic Reaction Networks:III. Application for Diauxic Growth on Glucose and Lactose*”, *Metabolic Engineering*, vol. 3, pp. 362-379, 2001.
- [22] Neubauer P., Hofmann K, Holst O, Mattiasson B., Kruschke P., “*Maximizing the expression of a recombinant gene in Escherichia Coli by manipulation of induction time using lactose as inducer*”, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol.36, pp. 739-44, 1992.
- [23] Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD, “*Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia Coli*” *J Biotechnol.*, vol. 39(1), pp. 59-65, 1995.
- [24] Blommel, P.G., Fox, B.G., “*A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease*”, *Protein Expr Purif.*, 2007, DOI:10.1016/2007.04.013.
- [25] Donnelly M.I., Zhou M., Millard C.S., Clancy S., Stols L., Eschenfeldt W.H., Collart F.R., Joachimiak A., “*An expression vector tailored for large-scale, high-throughput purification of recombinant proteins*”, *Protein Expr Purif*, vol. 47, pp.446-54, 2006).