



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

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata**

**Espressione e caratterizzazione dinamico-strutturale del  
recettore umano ACE2 combinando approcci sperimentali e  
teorici**

**Expression and dynamic-structural characterization of the  
human ACE2 receptor by combining experimental and  
theoretical approaches**

Tesi di Laurea Magistrale di:

**Jesmina Rexha**

Relatore Chiar.mo Prof.

**Daniele DI MARINO**

Correlatore:

**Prof.ssa Anna LA TEANA**

**Dott. Mattia D'AGOSTINO**

SESSIONE ESTIVA

**Anno Accademico: 2020-2021**



# ***INDICE***

<b>1</b>	<b>. INTRODUZIONE</b> .....	6
1.1	I CORONAVIRUS.....	9
1.2	IL RECETTORE ACE2: STUTTURA E FUNZIONE .....	12
1.3	ESPRESSIONE E MODIFICHE POST TRADUZIONALI DI ACE2.....	17
1.4	RUOLO DI ACE2 NELLA FISIOLOGIA UMANA.....	20
1.5	INTERAZIONE TRA ACE2 E SARS-COV-2.....	23
<b>2.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	25
<b>3.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b> .....	27
3.1	DISEGNO DEL PLASMIDE.....	27
3.2	PROPAGAZIONE DEI PLASMIDI.....	31
3.2.1	Terreni utilizzati .....	31
3.2.2	Trasformazione .....	31
3.2.3	Propagazione .....	33
3.2.4	Purificazione del plasmide .....	33
3.2.5	Quantificazione del plasmide .....	35
3.3	CELLULE HEK 293-F IN SOSPENSIONE .....	36
3.3.1	Mantenimento delle cellule.....	36
3.3.2	Criopreservazione delle cellule .....	37
3.3.3	Conta cellulare .....	37
3.3.4	Trasfezione .....	38
3.5	PURIFICAZIONE ACE2 RICOMBINANTE .....	42
3.5.1	Purificazione tramite cromatografia di affinità in condizioni native e denaturanti .....	42
3.5.2	Dialisi.....	45
3.6	SDS-PAGE.....	47
3.7	WESTERN BLOT .....	50
3.8	QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA .....	52
3.9	PULL DOWN ASSAY.....	54
3.10	SIMULAZIONI DI DINAMICA MOLECOLARE.....	56
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b> .....	58
4.1	Cellule HEK293-F in sospensione.....	58

<b>4.2 PURIFICAZIONE ACE2 IN CONDIZIONI NATIVE.....</b>	<b>65</b>
<b>4.3 PURIFICAZIONE ACE2 IN CONDIZIONI DENATURANTI .....</b>	<b>68</b>
<b>4.5 SIMULAZIONI DI DINAMICA MOLECOLARE.....</b>	<b>72</b>
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>75</b>



# ***1 . INTRODUZIONE***

Nel dicembre 2019 in Cina iniziarono a manifestarsi dei primi casi di polmonite atipica che, il 5 gennaio 2020 il WHO (World Health Organization), annunciò essere causati da un nuovo virus che aveva avuto origine nel mercato di Whuan in Cina [1]. Qualche giorno dopo arrivò la conferma che si trattava di un nuovo Coronavirus (2019-nCoV) che aveva la caratteristica di essere trasmesso da uomo a uomo in modo molto rapido. Nel febbraio 2020, il 2019-nCoV fu rinominato SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) e l'11 marzo fu proclamata pandemia globale dal momento che il virus aveva raggiunto livelli globali [2]. I primi sintomi si mostrarono essere correlati a gravi sintomi influenzali come febbre, tosse secca e affaticamento insieme a sintomi non respiratori come diarrea o cefalea [3] e la malattia fu nominata COVID-19. Si misero subito in evidenza anche fattori di rischio gravi associati a soggetti con età superiore ai 60 anni e/o comorbidità come diabete mellito, ipertensione, malattie cardiovascolari, malattie polmonari croniche e cancro. In poco tempo emerse che la trasmissione avveniva tramite l'inalazione di goccioline respiratorie e/o particelle di aerosol, contatto con fomite o contatto da persona a persona. L'analisi dei sequenziamenti del genoma virale permise di apprenderne le caratteristiche biomolecolari e i meccanismi legati al ciclo di replicazione [4].

Sebbene i Coronavirus infettino più comunemente gli uccelli e i mammiferi, negli ultimi decenni hanno infettato anche gli esseri umani. Una volta che attraversano la barriera di specie e riescono ad

arrivare all'uomo, questi virus sono letali. Questo lo dimostra l'epidemia di SARS del 2002 (Severe Acute Respiratory Syndrome) seguita da quella di MERS del 2012 (Middle East Respiratory Syndrome) [5].

Il SARS-CoV-2 possiede un genoma a RNA non segmentato con orientamento positivo avente una lunghezza di 30 kb. E' ricoperto da un envelope dove è presente la proteina Spike (S), essenziale per il legame con il recettore. La proteina S è una glicoproteina trimerica costituita da due subunità S1 ed S2. A livello della subunità S1 è presente il dominio RBD (Receptor Binding Domain) necessario per stabilire il legame del virus al recettore umano [6]. SARS-CoV-2 infetta le cellule umane utilizzando il recettore ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme II), che viene scisso dalle proteasi della cellula ospite durante l'infezione, riducendone così la sua attività [7].

ACE2 è una carbossipeptidil dipeptidasi composta da 805 amminoacidi ed è costituita da due domini: Peptidase Domain (PD) e Collectrin Like Domain (CLD). Il primo protrude verso la porzione extracellulare, mentre il secondo nella porzione intracellulare [8].

ACE2 svolge un ruolo chiave nella regolazione del volume sanguigno [9] ed è situato nella membrana cellulare di cellule epiteliali del tratto gastrointestinale, del cuore, rene, fegato, polmone, vie aeree e testicoli [10]. Difatti, ricopre un ruolo molto importante nel RAS (Renin Angiotensin System) controbilanciando gli effetti deleteri dell'angiotensina II. Uno dei suoi principali ruoli risiede nella conversione dell'angiotensina II in angiotensina 1-7 e dell'angiotensina I in angiotensina 1-9 determinando un aumento della vasodilatazione e una riduzione della pressione sanguigna.

Inoltre, ACE2 metabolizza altri peptidi come l'apelina, la chinina e la morfina [11]. ACE2 agisce anche da chaperone per il trasportatore di aminoacidi B0AT1 [12] ed ha anche un ruolo importante nel sistema KKS dove, l'internalizzazione di ACE2 dovuta all'infezione da SARS-CoV-2, crea uno squilibrio di questo sistema che porta ad un aumento dell'infiammazione rendendo l'ambiente polmonare più incline a perdite vascolari locali [13].

Il ruolo ricoperto da ACE2 nella fisiologia umana risulta tanto importante quanto quello che riveste da recettore del SARS-CoV-2. Apprendere da un punto di vista molecolare l'interazione tra le proteine ACE2 e Spike è fondamentale per comprendere quali sono i residui chiavi coinvolti nell'interazione.

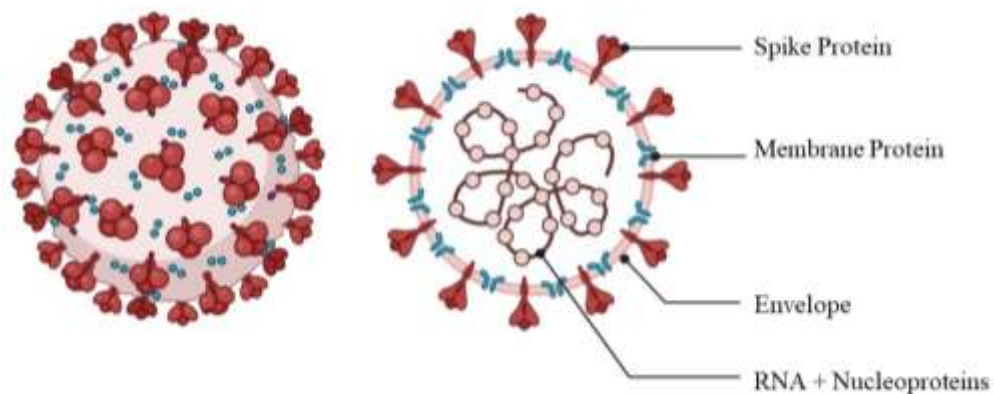


## 1.1 I CORONAVIRUS

I Coronavirus appartengono alla famiglia delle *Coronaviridae*, ordine *Nidovirales* e sono suddivisi in quattro generi: *alfa*, *beta*, *gamma* e *delta* Coronavirus. Il SARS-CoV-2 appartiene alla famiglia dei  $\beta$ -Coronavirus [14].

I Coronavirus (*CoV*s) hanno una forma rotondeggiante ed un diametro compreso tra gli 80 e i 160 nm. Questi, posseggono un rivestimento glicoproteico a livello del quale sono presenti delle spicole ben visibili al microscopio elettronico che rappresentano la proteina Spike. Per via della presenza di queste spicole, il virus assume una forma a corona da cui ne deriva il nome.

Posseggono un genoma a RNA di circa 30 kb non segmentato con orientamento positivo e sono ricoperti da envelope.



**Fig. 1** Rappresentazione della struttura del Coronavirus.

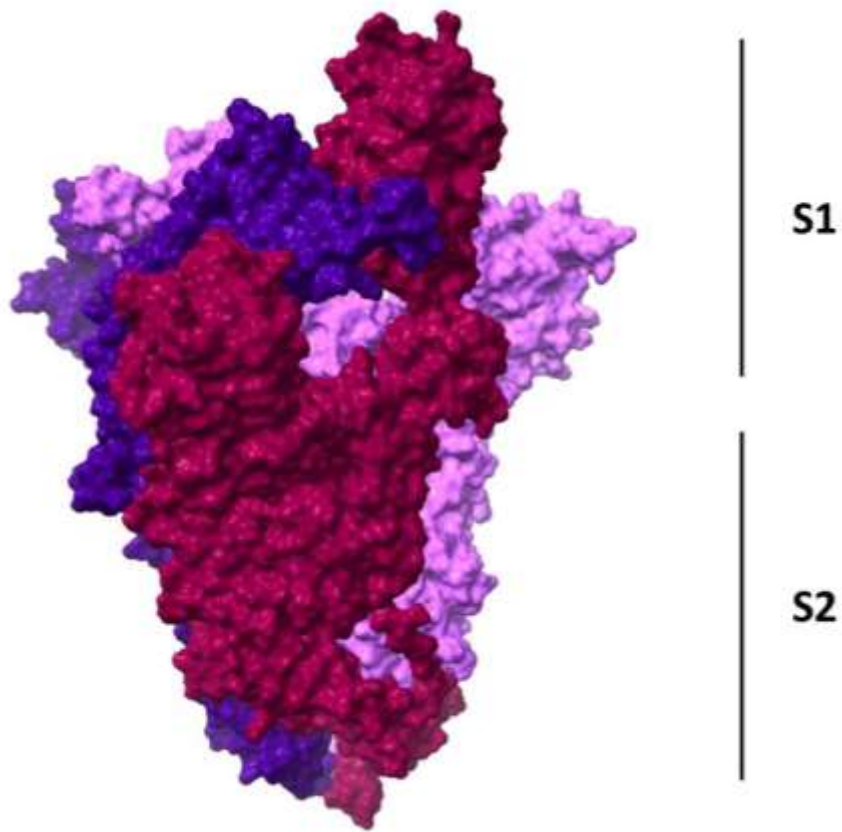
Il genoma virale, che contiene un cap al 5' e una coda di poly A al 3', ha una struttura tale che possa agire da mRNA sia per la replicazione che per la trascrizione delle proteine. Il genoma è

occupato per i due terzi dal gene per la replicasi che codifica per le proteine non strutturali (nsps) ed ha una lunghezza di circa 20kb; la restante parte del genoma è occupata da proteine strutturali e accessorie. L'estremità 5' del genoma include una sequenza leader e una regione UTR che contiene più strutture a stem loop necessarie per la replicazione e trascrizione dell'RNA. Inoltre, all'inizio di ogni gene strutturale o accessorio ci sono sequenze regolatorie trascrizionali (TRS) necessarie per l'espressione di ciascuno di questi geni. Il 3'UTR contiene anche strutture a RNA richieste per la sintesi e replicazione dell'RNA virale.

Nello specifico, il genoma è organizzato nel seguente modo: 5' – leader – UTR -replicasi – S (Spike) - E (envelope) – M (membrana) – N (nucleocapside) – 3'UTR – coda di polyA con geni accessori inter spersi all'estremità 3' del genoma. Le proteine accessorie non sono essenziali ai fini della replicazione ma ai fini della patogenesi virale [15].

La proteina S è una glicoproteina trimerica che contiene due subunità S1 ed S2 che sono coinvolte nell'attacco del virus alla cellula ospite. La subunità S1, attraverso il dominio RBD (Receptor Binding Domain) si lega al proprio recettore ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) mentre la subunità S2 permette la fusione tra la membrana cellulare e quella virale [16].

Le altre proteine sono essenziali per la replicazione ed il corretto assemblamento dei virioni.



*Fig. 2* Rappresentazione della proteina Spike.

## **1.2 IL RECETTORE ACE2: STUTTURA E FUNZIONE**

ACE2, Angiotensin Converting Enzyme II, è una dipeptidil-carbossipeptidasi appartenente alla famiglia delle esopeptidasi [17]. Questo enzima catalizza la scissione di un singolo residuo dell'angiotensina I a formare il nonapeptide angiotensina (1-9) e un singolo residuo dell'angiotensina II per generare l'angiotensina vasodilatatore (1-7) [18].

ACE2 è codificata dall'omonimo gene che ricopre una regione di 39.9 kb e contiene 18 esoni. È localizzato nel cromosoma X in posizione Xp22 e codifica una glicoproteina di circa 100kDa, composta da 805 AA.

È stato dimostrato che ricopre un ruolo importante nel sistema renina-angiotensina-aldosterone nella regolazione della pressione sanguigna, [19] e recentemente, con la pandemia, è emerso essere il recettore del coronavirus, strettamente connesso con la sindrome respiratoria severa acuta (SARS).

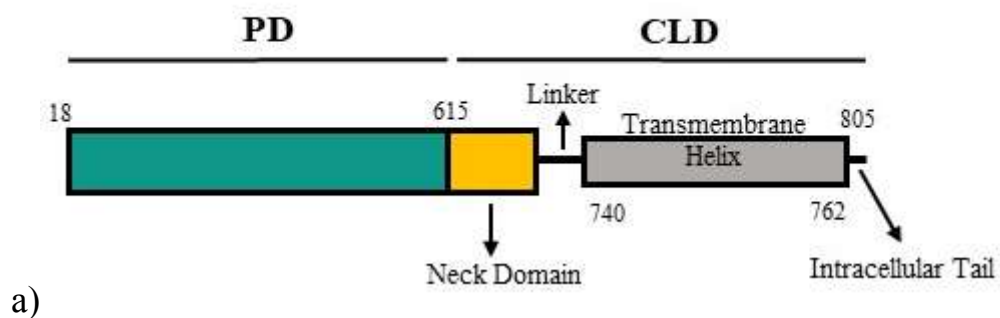
ACE2 svolge anche un ruolo importante nella regolazione del trasporto degli amminoacidi intestinali, come nell'espressione di peptidi antimicrobici e nel microbioma intestinale stabilizzando il trasportatore di aminoacidi B<sup>o</sup>AT1 con un meccanismo chaperone-like [20].

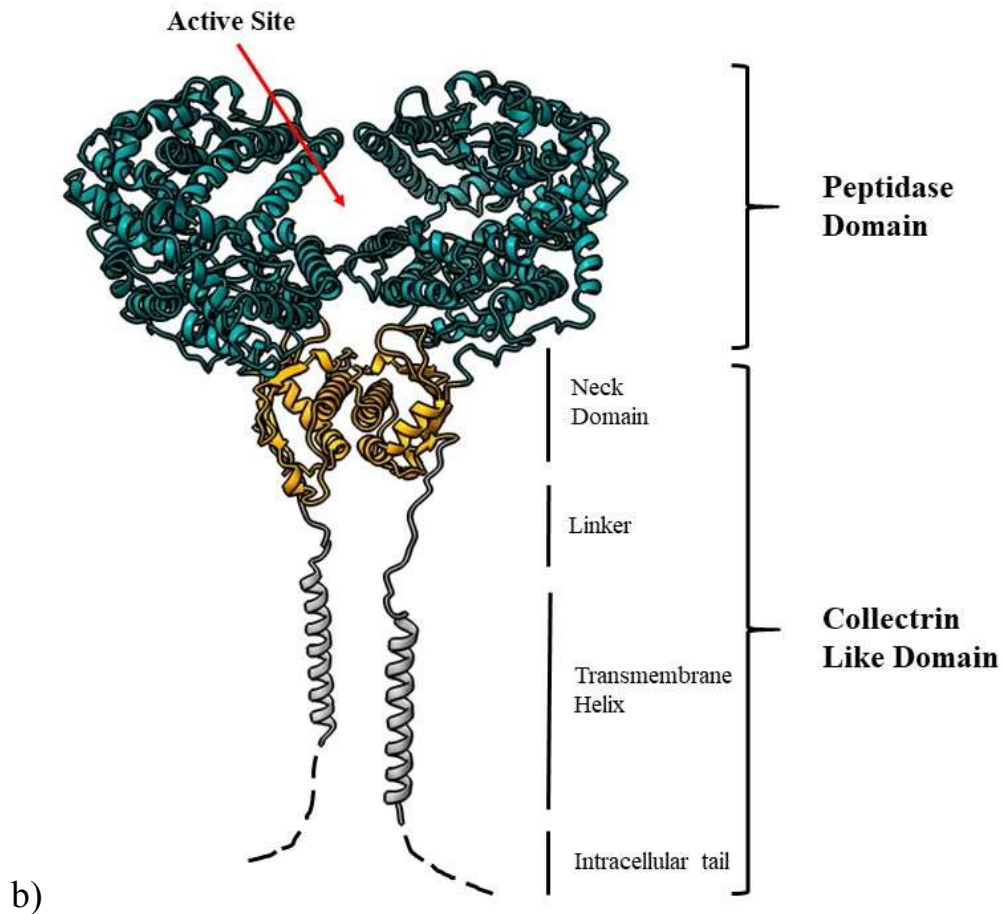
Da un punto di vista strutturale, la proteina ACE2 si presenta come una proteina di membrana costituita da due domini: il dominio PD peptidase catalytic domain e il dominio CLD collectrin-like [21]. Il dominio PD si trova nella porzione N-terminale della proteina. In

questo dominio, i primi 17 AA costituiscono un peptide segnale che viene scisso durante la maturazione della proteina. Inoltre è anche presente un motivo 'HEXXH' legante lo zinco. Oltretutto, questo dominio può essere suddiviso in due sottodomini, I e II, che formano una profonda fessura lunga ca 40 Å, larga ca 15 Å e profonda 25 Å, a livello della quale si trovano uniti nella porzione terminale della stessa [22].

Il dominio CLD, localizzato nella porzione C- terminale, è un omologo della colletrina, una proteina renale che regola il traffico dei trasportatori di aminoacidi verso la superficie cellulare [23].

Questo dominio è costituito da un neck domain extracellulare (615-726), un linker, un'elica transmembrana TM di 22 AA e una coda di 43 AA [24].

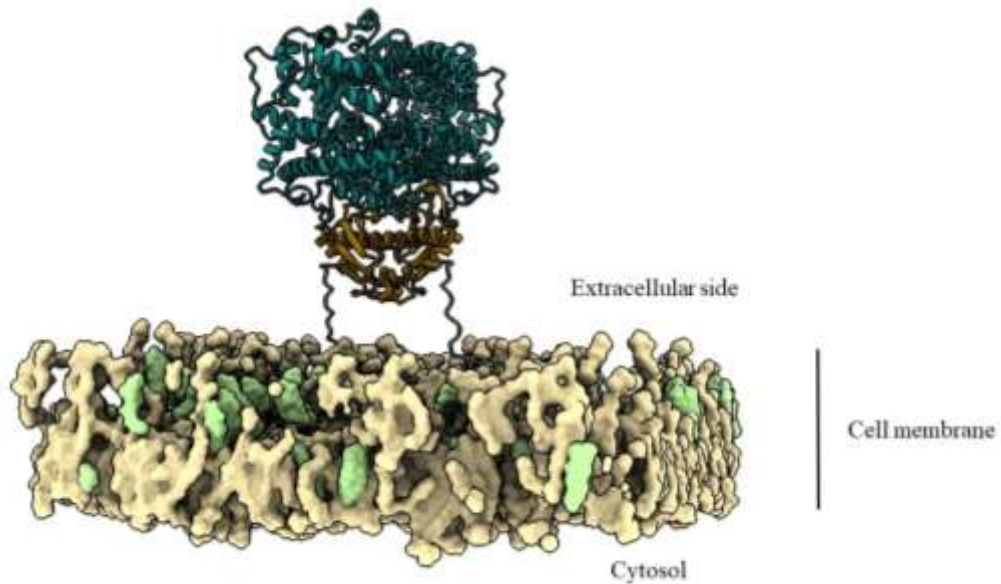




**Fig. 3** a) Rappresentazione schematica di ACE2 e dei suoi domini e sottodomini. PD si localizza a livello dell’N-terminale e CLD al C-terminale. b) Struttura di ACE2 in cui sono raffigurati i suoi domini. La freccia rossa indica il sito attivo della proteina.

ACE2 in genere è localizzata nella membrana cellulare (mACE2) con l’N terminale contenente il sito catalitico che protrude nello spazio extracellulare che utilizza come substrato diversi peptidi attivi presenti nell’interstizio. ACE2 viene scissa a livello della membrana cellulare dalle proteasi ADAM17, TMPRSS2, HAT ed epsina. Il

taglio da parte di ADAM fa sì che la proteina venga rilasciata in una forma solubile nel sistema circolatorio [25].

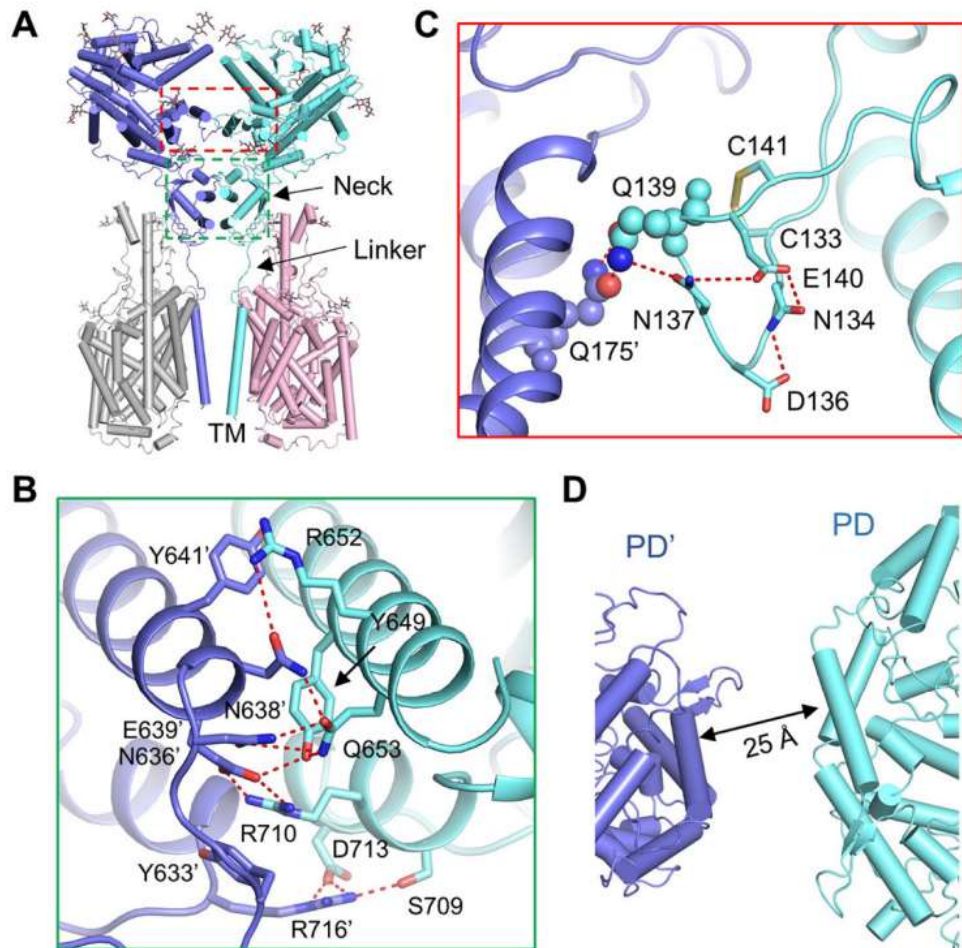


**Fig.4** *Raffigurazione del dimero ACE2 immerso nel doppio strato fosfolipidico.*

È stato dimostrato che ACE2 dimerizza e questo processo è principalmente mediato dal Neck Domain con il PD. Si forma infatti una conformazione stabile e l'interfaccia di dimerizzazione è data da un forte legame tra il Neck domain del CLD e da un'ulteriore interazione tra i due PD [26].

In particolare, l'Arg652 e l'Arg710 nel dominio PD formano interazioni catione- $\pi$  con la Tyr641' e la Tyr633' del CLD. L'Arg652 e Arg710 formano legami idrogeno con l'Asn636' e Glu639' che interagiscono anche con Gln653, così come Asn636'. Ser70 e Asp713 del dominio PD sono legati tramite legami idrogeno con

Arg716'. Questa fitta rete di interazioni polari porta alla formazione di un dimero stabile [27].



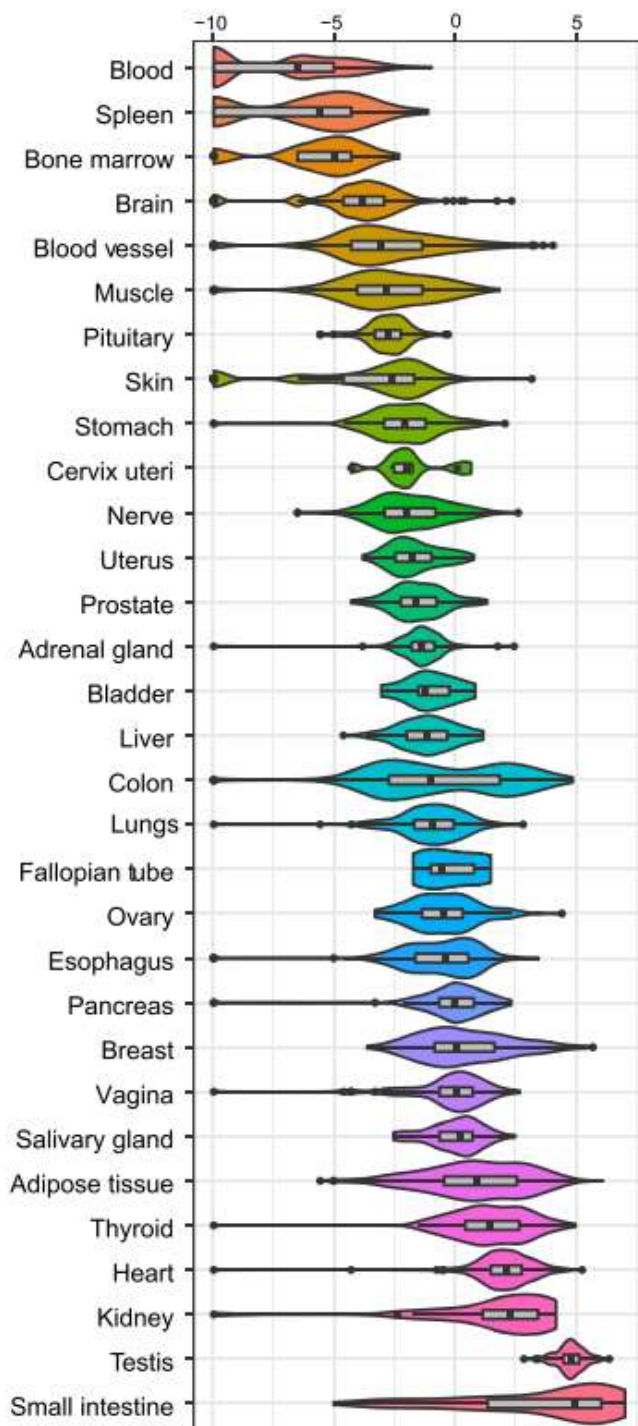
**Fig.5** a) ACE2 dimerizza tramite il dominio PD e il dominio neck. b) Interfaccia tra domini Neck in ACE2. Le interazioni polari sono rappresentate con linee rosse. c) Rappresentazione di un'interfaccia debole tra i domini PD di ACE2. L'unica interazione presente è fra Gln139 e Gln175' che sono mostrate come sfere. I residui polari che possono contribuire alla stabilizzazione di Gln139 sono mostrati come bastoncini. d) ACE2 nella conformazione aperta in cui i domini PD non sono a contatto tra loro. (Yan et al.)



### **1.3 ESPRESSIONE E MODIFICHE POST TRADUZIONALI DI ACE2**

La proteina ACE2 è ampiamente espressa nelle cellule epiteliali del polmone, nel sistema cardiovascolare, nell'intestino, nei reni, nel sistema nervoso centrale e nel tessuto adiposo. Una sua ridotta espressione è associata a malattie cardiovascolari [28].

Degli studi hanno mostrato che ACE2 ha livelli di espressione molto maggiori a livello dei tessuti dell'intestino tenue, testicolo, reni, cuore, tiroide e tessuto adiposo, rispetto a sangue, milza, midollo osseo, cervello, vasi sanguigni e muscoli dove invece è espresso in minor misura. Nei polmoni, nel colon, nel fegato, nella vescica e nella ghiandola surrenale ha mostrato livelli di espressione medi [29].



**Fig.6** Livelli di espressione di ACE2 nei diversi tessuti. (Li et al., 2020).

Come accennato, ACE2 è localizzata a livello della membrana cellulare e nello spazio extracellulare protrude il dominio catalitico, localizzato all'N-terminale. ACE2 può subire un taglio proteolitico da parte di differenti proteasi come le ADAM 10 – 17 (A disintegrin and metalloproteinase) e da parte di TMPRSS2 (Trans Membrane Protease Serine 2). Il legame della subunità S1 della proteina Spike ad ACE2 fa sì che ADAM17/tumor necrosis factor-converting enzyme (TACE) determini il taglio di ACE2 a livello dell'ectodominio con la produzione della forma solubile, sACE2.

La proteina TMPRSS2 può determinare il taglio proteolitico di ACE2 a livello del dominio intracellulare localizzato al C-terminale e a differenza di ADAM17 non produce una forma solubile che mantiene la funzione catalitica ma, come la proteina ADAM, è essenziale per l'entrata del virus all'interno della cellula.

Il rilascio di ACE2 può essere stimolato da citochine proinfiammatorie come IL-1 $\beta$  e TNF –  $\alpha$  ed endotossine che possono portare ad una minore entrata di SARS-COV-2 ma allo stesso tempo portare ad un aumento di AngII e una successiva attivazione di AngII/AT1R (Angiotensin II receptor type 1) peggiorando l'infiammazione. È stato dimostrato che elevati livelli di sACE2 sono correlati a gravi malattie, probabilmente dovuto ad un aumento di AngII.

È stata osservata anche una correlazione tra le vie di trasduzione del segnale del Ca<sup>2+</sup> e la via regolata da ACE2. L'evidenza che ACE2 può essere tagliata da molte proteasi indica che la regolazione post traduzionale di questo enzima è di elevata importanza nel mantenere l'omeostasi a livello tissutale [30].

## 1.4 RUOLO DI ACE2 NELLA FISIOLOGIA UMANA

Comprendere il ruolo di ACE2 nel sistema fisiologico umano risulta molto importante per capire gli effetti prodotti da SARS-CoV-2, soprattutto negli anziani con comorbidità.

ACE2 riveste un ruolo primario nel nostro sistema fisiologico nel determinare la maturazione dell'angiotensina, un ormone peptidico che controlla la vasocostrizione e la pressione sanguigna, la sua ridotta espressione è infatti associata a malattie cardiovascolari. ACE2, grazie al dominio CLD funziona anche come chaperone per il traffico sulla membrana del trasportatore di aminoacidi B<sup>0</sup>AT1 che media l'assorbimento di aminoacidi nelle cellule intestinali legandovisi in maniera specifica. Si stabilisce infatti la formazione di un eterodimero a livello del CLD che media l'omodimerizzazione. [31]. Svolge anche un ruolo molto importante nel controbilanciamento del sistema RAAS (sistem Renina Angiotensina Aldosterone) e una funzione importante nel sistema kinina-kallikrenina, il quale regola i processi infiammatori [32].

ACE2 catalizza con grande efficienza la conversione del vasocostrittore AngII in Ang1-7 che lega e attiva il recettore seven-pass transmembrane accoppiato alla proteina G (GPCR) e con minore efficienza, determina la formazione di Ang 1-9 a partire da AngI così da svolgere il suo ruolo contro bilanciante nel RAAS. Questo sistema ha un ruolo critico nell'andare a regolare il volume sanguigno e nella resistenza vascolare sistemica e contribuisce al riassorbimento del sodio, all'infiammazione e alla fibrosi,

prevenendo il possibile effetto avverso dovuto all'accumulo di AngII [33].

L'interazione tra SARS-CoV-2 e ACE2 può regolare negativamente il recettore determinando un accumulo di AngII che attraverso l'attivazione del RAAS tramite AngII/AT1R può causare vasocostrizione, stress ossidativo, infiammazione, atrofia e fibrosi.

È stato osservato che il recettore dell'angiotensina II di tipo 1, AT1R, può indurre l'apoptosi nelle cellule epiteliali alveolari in risposta ad AngII. Inoltre, AngII promuove la disfunzione endoteliale attraverso l'attivazione della cicloossigenasi-2 (COX-2) che genera prostaglandine vasoattive e specie reattive dell'ossigeno (ROS). In caso di iperattivazione dell'asse AngII/AT1R/NADPH, si ha un'eccessiva produzione di ROS che è stata correlata all'ipertensione e all'aterosclerosi e può indurre l'apoptosi attraverso il rilascio di citocromo C da mitocondri danneggiati, l'attivazione della caspasi 3 o della cascata MAPK/JNK. Possono essere attivati altri meccanismi infiammatori che coinvolgono l'attivazione del fattore nucleare kB e la trascrizione delle citochine pro-infiammatorie IL-6, IL-1B e TNF $\alpha$  i quali possono portare nello stato super infiammatorio osservato nell'infezione di pazienti affetti da SARS-CoV-2.

ACE2 è inoltre responsabile della conversione di AngA in alamandina che è in grado di legare il recettore MgrD (MAS-related GPCR member D), il cui effetto si osserva nella promozione del vaso rilassamento e in un effetto antiproliferativo.

Altro ruolo importante viene svolto nel sistema KKS (kinina-kallikreina). Il sistema KKS svolge un ruolo importante nella

coagulazione, regolazione dell'infiammazione e del dolore ed è stato osservato che l'internalizzazione di ACE2 dovuta all'infezione di SARS-CoV-2 crea uno squilibrio in questo sistema causando un iperazione delle sue componenti che determinano un aumento dell'infiammazione rendendo l'ambiente polmonare più incline a perdite vascolari locali che possono portare ad angioedema.

Degli studi hanno mostrato che una de-regolazione di ACE2 determina importanti lesioni a livello dell'albero respiratorio (ispessimento della parete alveolare, edema, infiltrati di cellule infiammatorie, sanguinamento) che sembrano essere mediati dall'angiotensina II. L'espressione di ACE2 nei polmoni diminuisce con l'aumento dell'età, molto di più negli uomini rispetto alle donne. Anche il diabete mellito è stato associato ad una riduzione dell'espressione di ACE2, forse dovuto alla glicosilazione.

La mancanza di ACE2 è stata associata ad esacerbazione dell'ipertensione e dell'ipertrofia cardiaca indotta dall'angiotensina II e al rimodellamento ventricolare dopo infarto miocardico. Inoltre, la carenza di ACE2 aumenta la suscettibilità a scompenso cardiaco.

Viste le premesse si può affermare che ACE2 gioca un ruolo importante nella patogenesi di SARS-CoV-2. Una diminuita espressione di ACE2 indotta dall'invasione virale potrebbe essere dannosa in individui con carenza di ACE2 a causa di età avanzata, diabete, ipertensione e di malattie già presenti [34].

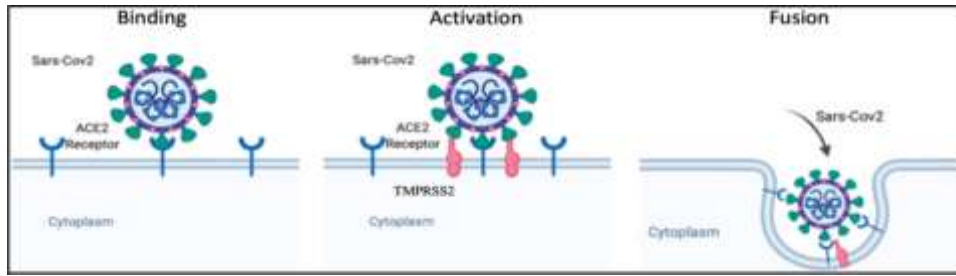
## 1.5 INTERAZIONE TRA ACE2 E SARS-COV-2

La proteina ACE2, oltre ad avere un ruolo molto importante nel nostro sistema, riveste un ruolo molto importante nel riconoscimento del SARS-CoV-2.

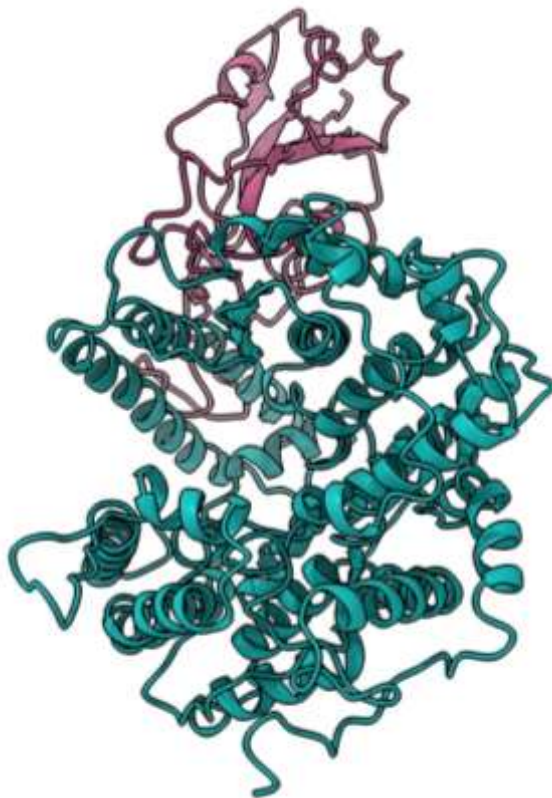
Il primo step che caratterizza l'entrata del virus all'interno della cellula è rappresentato dal legame della subunità S1 della proteina S con il recettore ACE2 [35]. In particolare, il legame avviene a livello del dominio RBD localizzato a livello di S1. È stato dimostrato che ACE2, nel momento in cui lega il dominio RBD, si presenta sotto forma di dimero [36].

Il dominio RBD, si lega direttamente al dominio peptidasi (PD) di ACE2, mentre S2 è responsabile della fusione della membrana [37]. Questi processi richiedono l'intervento di proteasi della cellula ospite, TMPRSS2 che taglia a livello di uno specifico sito di taglio S1/S2 della proteina Spike [38]. Oltre alla TMPRSS2 anche la catepsina B ed L sono coinvolte nel taglio proteolitico di Spike [39].

La co-localizzazione di TMPRSS2 e ACE2 migliora l'entrata nella cellula ospite ed è uno step fondamentale perché, dopo il distacco della subunità S1, la subunità S2 subisce dei riarrangiamenti conformazionali che portano alla completa fusione tra il virus e la membrana cellulare con conseguente entrata del virus all'interno della cellula, rilascio del suo contenuto, replicazione e infezione delle altre cellule. Quindi il virus sembra entrare nella cellula insieme al recettore di membrana che viene funzionalmente rimosso dal sito esterno della membrana [40].



**Fig. 7** Rappresentazione schematica dell'entrata del virus nella cellula e dell'interazione tra ACE2 e Spike.



**Fig.8** Raffigurazione dell'interazione tra il dominio PD di ACE2 (verde acqua) e il dominio RBD (rosa).



## ***2. SCOPO DELLA TESI***

Lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di studiare da un punto di vista molecolare l'interazione tra ACE2 e la proteina Spike ed in particolare, mettere in luce quali sono i residui chiave che permettono l'interazione tra le due proteine. Per fare ciò sono stati condotti sia studi di tipo sperimentale che di tipo computazionale.

In primo luogo, è stato disegnato un plasmide contenente il gene codificante ACE2 con l'aggiunta di un peptide segnale per la secrezione della proteina nel mezzo di coltura. Successivamente la proteina è stata espressa nel sistema di espressione eucariotico HEK-293F e dopo aver stabilito quale fosse il giorno migliore per la sua raccolta, si è proseguito con la purificazione.

Sono state eseguite diverse prove di purificazione sia in condizioni native che in condizioni denaturanti che ci hanno permesso di capire quale fosse il protocollo migliore da adottare. Dopo aver prodotto una quantità di ACE2 tale da permetterne l'interazione con la proteina Spike, è stato eseguito un pull down. In questo modo è stato possibile verificare l'interazione tra le due proteine a cui è seguita una caratterizzazione strutturale dei residui che interagiscono fra loro. A tal proposito, il dottor Motta e il professor Di Marino hanno effettuato delle simulazioni di dinamica molecolare utilizzando il metodo Steered Molecular Dynamics (SMD) che permette di simulare eventi di unbinding tra due proteine. Le simulazioni sono state condotte applicando un campo di forza esterno e simulando un distacco tra le due proteine. Ciò ha permesso di capire quali legami si staccassero per primi e quali per ultimi. In questo modo, è

stato possibile verificare quali residui sono fondamentali ai fini del legame tra il dominio RBD e la proteina ACE2.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 DISEGNO DEL PLASMIDE

Il plasmide è stato disegnato con tutte le caratteristiche necessarie alla loro espressione e purificazione: il peptide segnale (ATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCACC GCCACAGGCGTGCCTCC) utile ai fini della secrezione della proteina nel mezzo di coltura e un tag di istidine per determinarne il legame alla resina NiNTA.

La sequenza amminoacidica della proteina ACE2 (1-615) è stata ottimizzate dalla GenScript® affinché la loro espressione fosse compatibile nei sistemi eucariotici.

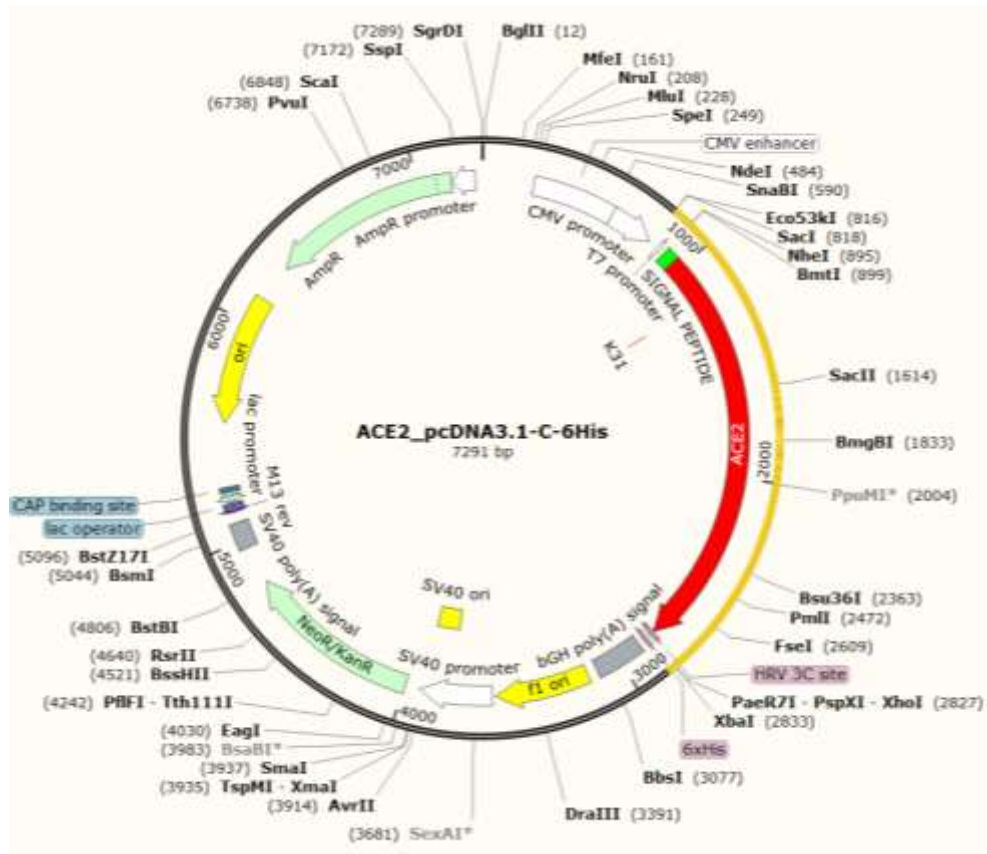
Optimized	1	ATGAGCAGCAGCAGCTGGCTGCTGCTGCCCTGGTGGCAGTGACAGCAGCACAGTCTACC
Original	1	ATGTCAAGCTCTTCCTGGCTCCTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAAGTCTGCTCAGTCCACC
Optimized	61	ATCGAGGAGCAGGCCAAGACCTTCTGGACAAGTTTAACCACGAGGCCGAGGATCTGTTC
Original	61	ATTGAGGAACAGGCCAAGACATTTTTGGACAAGTTTAACCACGAAGCCGAAGACCTGTTC
Optimized	121	TATCAGTCTCTCTGGCCAGCTGGAACACTACAATACCAACATCACAGAGGAGAATGTGCAG
Original	121	TATCAAAGTTCACTTGCTTCTTGGAAATATAACACCAATATTACTGAAGAGAATGTCCAA
Optimized	181	AACATGAACAATGCCGGCAGCAAGTGGTCTGCCTTTCTGAAGGAGCAGAGCACACTGGCC
Original	181	AACATGAATAATGCTGGGGACAATGGTCTGCCTTTTTAAAGGAACAGTCCACACTTGCC
Optimized	241	CAGATGTACCCTCTGCAGGAGATCCAGAATCTGACCGTGAAGCTGCAGCTGCAGGCCCTG
Original	241	CAAATGTATCCACTACAAGAAATTCAGAATCTCACAGTCAAGCTTCAGCTGCAGGCTCTT
Optimized	301	CAGCAGAACGGCAGCTCCGTGCTGTCCGAGGATAAGTCTAAGAGGCTGAATACAATCCTG
Original	301	CAGCAAATGGGTCTTCAGTGCTCTCAGAAGACAAGGCAACGGTTGAACACAATTCTA
Optimized	361	AACACCATGAGCACAACTTATTCACCGCAAGGTGTGCAATCCAGACAACCCCGAGGAG
Original	361	AATACAATGAGCACCATCTACAGTACTGGAAAAGTTTGTAAACCAGATAATCCACAAGAA
Optimized	421	TGTCTGCTGCTGGAGCCTGGCCTGAATGAGATCATGGCCAACTCCCTGGATTACAATGAG
Original	421	TGCTTATTACTTGAACCAGTTTGAATGAAATAATGGCAAACAGTTTAGACTACAATGAG

Optimized	481	AGGCTGTGGGCATGGGAGAGCTGGCGCTCCGAAGTGGGCAAGCAGCTGGGCCACTGTAC
Original	481	AGGCTCTGGGCTTGGGAAAGCTGGAGATCTGAGGTCGGCAAGCAGCTGAGGCCATTATAT
Optimized	541	GAGGAGTATGTGGTGTGAAGAACGAGATGGCCAGAGCCAATCACTACGAGGACTATGGC
Original	541	GAAGAGTATGTGGTCTTAAAAATGAGATGGCAAGAGCAAATCATTATGAGGACTATGGG
Optimized	601	GATTACTGGAGGGGGCGACTATGAAGTGAATGGCGTGGACGGCTACGATTATTCCCGCGGC
Original	601	GATTATGGAGAGGAGACTATGAAGTAAATGGGGTAGATGGCTATGACTACAGCCGCGGC
Optimized	661	CAGCTGATCGAGGATGTGGAGCACACATTCGAGGAGATCAAGCCCCGTATGAGCACCTG
Original	661	CAGTTGATTGAAGATGTGGAACATACCTTTGAAGAGATTAACCATTATATGAACATCTT
Optimized	721	CACGCCATCGTGGGGCAAGCTGATGAACGCCTATCCTTCTTACATCAGCCCAATCGGA
Original	721	CATGCCATGTGAGGGCAAAGTTGATGAATGCCTATCCTTCTATATCAGTCCAATGGGA
Optimized	781	TGCCTGCCAGCACACCTGCTGGGGCAGCATGTGGGCAGATTCGGACAAATCTGTACTCT
Original	781	TGCCTCCCTGCTCATTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGGACAAATCTGTACTCT
Optimized	841	CTGACCGTGCCTTTTGGCCAGAAGCCAAACATCGACGTGACCGATGCTATGGTGGACCAG
Original	841	TTGACAGTTCCCTTTGGACAGAAACAAACATAGATGTTACTGATGCAATGGTGGACCAG
Optimized	901	GCCTGGGATGCCAGAGGATCTTCAAGGAGGCCGAGAAGTTCTTTGTGAGCGTGGGGCTG
Original	901	GCCTGGGATGCACAGAGAATATTCAAGGAGGCCGAGAAGTTCTTTGTATCTGTTGGTCTT
Optimized	961	CCCAACATGACACAGGGCTTTTGGGAGAACAGCATGCTGACCGACCCAGGCAACGTGCAG
Original	961	CCTAATATGACTCAAGGATTCTGGGAAAATTCATGCTAACGGACCCAGGAAATGTTTCAG
Optimized	1021	AAGGCCGTGTGCCACCCAACAGCATGGGACCTGGGC AAGGGCGATTTCCGCATCCTGATG
Original	1021	AAAGCAGTCTGCCATCCACAGCTTGGGACCTGGGAAGGGCGACTTCAGGATCCTTATG
Optimized	1081	TGCACCAAGGTGACAATGGACGATTTTCTGACCGCCACCACGAGATGGGCCACATCCAG
Original	1081	TGCACAAAGGTGACAATGGACGACTTCCTGACAGCTCATCATGAGATGGGGCATATCCAG
Optimized	1141	TATGATATGGCCTACGCCGCACAGCCTTTCCTGCTGCGGAATGGCGCCAACGAGGGCTTT
Original	1141	TATGATATGGCATATGCTGCACAACCTTTCTGCTAAGAAATGGAGCTAATGAAGGATTC
Optimized	1201	CACGAGGCCGTGGGGGAGATCATGTCTCTGAGCGCCGCCACACCTAAGCACCTGAAGAGC
Original	1201	CATGAAGCTGTTGGGAAATCATGTCACTTTCTGCAGCCACACCTAAGCATTAAAAATCC
Optimized	1261	ATCGGCCTGCTGTCCCCAGACTTCAGGAGGATAACGAGACAGAGATCAATTTTCTGCTG
Original	1261	ATTGGTCTTCTGTCACCCGATTTTCAAGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTGCTC
Optimized	1321	AAGCAGGCCCTGACCATCGTGGGCACACTGCCCTTACCTATATGCTGAGAGAAGTGGCGC
Original	1321	AAACAAGCACTCACGATTGTTGGGACTCTGCCATTTACTTACATGTTAGAGAAGTGGAGG
Optimized	1381	TGGATGGTGTTTAAGGGCGAGATCCCTAAGGACCAGTGGATGAAGAAGTGGTGGGAGATG
Original	1381	TGGATGGTCTTTAAAGGGGAAATTCCTCAAAGACCAGTGGATGAAAAAGTGGTGGGAGATG

Optimized	1441	AAGAGGGAGATCGTGGGAGTGGTGGAGCCCGTGCCCTCAGCAGACATACTGTGATCCA
Original	1441	AAGCGAGAGATAGTTGGGGTGGTGGAAACCTGTGCCCCATGATGAAACATACTGTGACCCC
Optimized	1501	GCCAGCCTGTTCCACGTGTCTAACGACTATAGCTTTATCCGGTACTATAACCAGAACACTG
Original	1501	GCATCTCTGTTCCATGTTTCTAATGATTACTCATTTCATTCGATATTACACAAGGACCCTT
Optimized	1561	TACCAGTTCCAGTTTCAGGAGGCCCTGTGCCAGGCAGCAAAGCAGGAGGCCCACTGCAC
Original	1561	TACCAATTCCAGTTTCAAGAAGCACTTTGTCAAGCAGCTAAACATGAAGGCCCTCTGCAC
Optimized	1621	AAGTGTGACATCTCCAATTCTACAGAGGCCGGCCAGAAGCTGTTCAACATGCTGAGACTG
Original	1621	AAATGTGACATCTCAAACCTCTACAGAAGCTGGACAGAACTGTTCAATATGCTGAGGCTT
Optimized	1681	GGCAAGTCTGAGCCCTGGACCCTGGCCCTGGAGAATGTGGTGGGCGCCAAGAATATGAAC
Original	1681	GGAAAATCAGAACCCTGGACCCTAGCATTGGAAAATGTTGTAGGAGCAAAGAACATGAAT
Optimized	1741	GTGAGGCCCTGCTGAAC TATTTTCGAGCCTCTGTTTACATGGCTGAAGGATCAGAAATAG
Original	1741	GTAAGGCCACTGCTCAACTACTTTGAGCCCTTATTTACCTGGCTGAAAGACCAGAACAAG
Optimized	1801	AACAGCTTTGTGGGATGGTCCACCGACTGGAGCCCTACGCCGAT
Original	1801	AATTCCTTTGTGGGATGGAGTACCGACTGGAGTCCATATGCAGAC

**Fig.9** Sequenza ACE2 ottimizzata

Questo plasmide (*pcDNA 3.1*) ha come promotore quello del Citomegalovirus, P<sub>CMV</sub>, che permette un'efficiente espressione delle proteine ricombinanti nel sistema di espressione eucariotico; il promotore T7 che permette la trascrizione; sito di clonaggio multiplo in cui viene inserito il gene di interesse; BGH pA (Bovine Growth Hormone polyadenylation signal) che è una sequenza specifica per l'espressione di proteine in cellule eucariotiche la quale permette una efficiente terminazione della trascrizione e poliadenilazione degli mRNA; SV40 segnale di poliadenilazione degli mRNA; origine pUC che permette di ottenere un alto numero di copie e crescita in *E. coli*; gene per la resistenza all'ampicillina che serve per la selezione dei vettori e dei trasformanti in *E.coli*.



**Fig. 10** Rappresentazione del plasmide pcDNA 3.1 contenente il gene ACE2

## **3.2 PROPAGAZIONE DEI PLASMIDI**

### **3.2.1 Terreni utilizzati**

#### **LB medium**

- 1% w/v Tryptone
- 0.5 % w/v Yeast Extract
- 1% w/v NaCl

#### **LB agar**

- 1% w/v Tryptone
- 0.5 % w/w Yeast Extract
- 1% w/v NaCl
- 1.5% w/v agar

#### **SOC Medium**

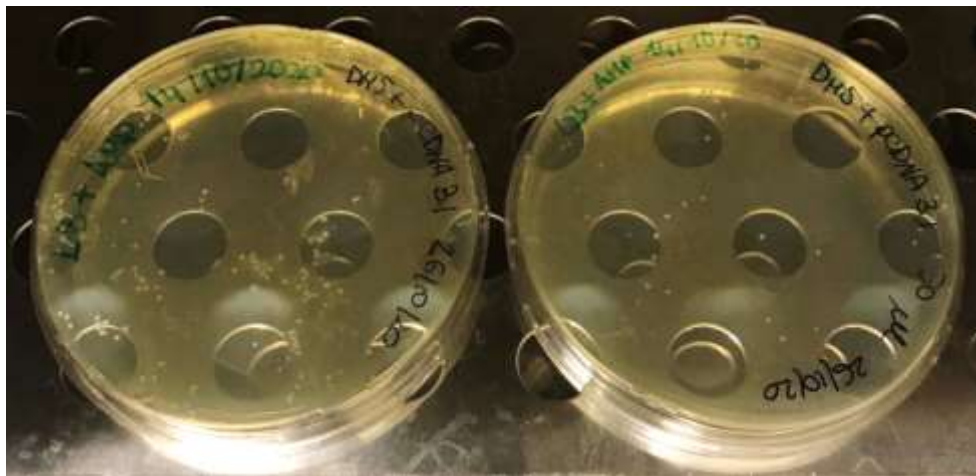
- 2% w/v Tryptone
- 0.5% w/v Yeast Extract
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 20 mM MgSO<sub>4</sub>
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 20 mM Glucose

### **3.2.2 Trasformazione**

Le cellule competenti GC5 sono un ceppo di *E. coli* con una grande efficienza di trasformazione. Questo ceppo contiene le mutazioni *recA1* ed *endA1* che aumentano la stabilità e qualità dei plasmidi.

È stata prelevata un'aliquota di cellule conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  e fatta scongelare lentamente in ghiaccio. Di queste, ne sono state prelevate 100  $\mu\text{l}$  ed è stata aggiunta una quantità di DNA plasmidico corrispondente a 10 ng ca. Molto importante è eseguire questi passaggi in condizioni refrigeranti per evitare di stressare le cellule. La sospensione viene incubata in ghiaccio per 30'. Si procede eseguendo uno shock termico per 45'' a  $42^{\circ}\text{C}$  per permettere al plasmide di entrare dentro le cellule e poi, con un recupero di 2' in ghiaccio. Vengono aggiunti 800  $\mu\text{l}$  di SOC e incubati per 1h e 30' a  $37^{\circ}\text{C}$  a 500 rpm per poterne ripristinare la loro vitalità.

Infine, si piastra su LB-agar + Ampicillina che permette la selezione dei cloni che hanno incorporato il plasmide.



**Fig. 11** Piastre LB + Amp con colonie di cellule competenti DH5 trasformate con pCDNA 3.1 vuoto. A sinistra sono state piastrate 250  $\mu\text{l}$  di cellule trasformate e a destra 50  $\mu\text{l}$ .



### **3.2.3 Propagazione**

Per ottenere una quantità di plasmide sufficiente per gli esperimenti, si è deciso di propagarlo in cellule di *E. coli* competenti DH5. Dopo aver verificato la crescita delle colonie su piastra (LB-agar + Amp), è stato preparato un pre-inoculo di 20 ml (LB + Amp) nel quale è stata stemperata una colonia prelevata dalla piastra e fatta crescere over night a 37°C. Dopo aver verificato che le cellule fossero cresciute tramite misurazione dell'OD600, il pre-inoculo è stato trasferito in una beuta contenente 200 ml di terreno LB + amp. La coltura cellulare è stata così centrifugata a 4000xg per 10'. Il supernatante è stato buttato e il pellet è stato conservato a -80°C. Il pellet è stato poi sottoposto a purificazione per l'estrazione del plasmide di interesse.

### **3.2.4 Purificazione del plasmide**

La purificazione ed estrazione dei plasmidi è stata eseguita utilizzando il kit fornito dalla ditta OMEGA E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Maxi Kit (codice # D6922-02), un kit specifico per l'estrazione di plasmidi da utilizzare in sistemi eucariotici.

Una volta selezionata la colonia di interesse, questa è stata stemperata in 20 ml di LB + Ampicillina e fatta crescere overnight. Il giorno successivo, dapprima è stata misurata l'OD della coltura e poi sono stati inoculati in 200 ml di LB.

A questo punto si è proseguito con la purificazione del plasmide seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice del kit.



*Fig.12 Kit utilizzato per la purificazione dei plasmidi.*



*Fig.13 Falcon contenente pellet relativo a lisato chiarificato.*

L'eluizione del plasmide è stata fatta con 2 ml di acqua sterile. Infine, è stata misurata la concentrazione del plasmide eluito al nanodrop (DeNovix<sup>®</sup> DS-11 FX+).

### **3.2.5 Quantificazione del plasmide**

La quantificazione del DNA purificato è stata determinata utilizzando il nanodrop (DeNovix<sup>®</sup> DS-11 FX+) ed ha riportato i seguenti valori:

pCDNA + ACE2 = **[502.6 ng/μl]**

pCDNA = **[471.5 ng/μl]**

### **3.3 CELLULE HEK 293-F IN SOSPENSIONE**

Le cellule utilizzate per l'espressione e purificazione della proteina ACE2 sono cellule HEK 293-F (Human Embryonic Kidney), cellule del rene di embrione umano cresciute in sospensione. Questo tipo di cellule sono funzionali alla produzione di proteine ricombinanti. Come detto in precedenza, la proteina ACE2 viene rilasciata nel mezzo di coltura grazie alla presenza del peptide segnale.

#### **3.3.1 Mantenimento delle cellule**

Le HEK 293-F vengono coltivate in incubatore a 37°C, in agitazione a 135 rpm e con un'atmosfera contenente l'8% di CO<sub>2</sub>. Le cellule vengono fatte crescere su fiasche sterili di policarbonato in un apposito terreno fornito dalla ditta produttrice Gibco® FreeStyle™ Expression Medium (cat. # 12651014) che contiene tutti i nutrienti essenziali per la crescita. Per questo motivo non è necessario aggiungere nutrienti supplementari, ad eccezione del siero bovino fetale che è un fattore di crescita utilizzato soltanto durante i primi passaggi.

Le HEK 293-F duplicano ogni 24h ca e per il loro mantenimento è importante passarle ogni 2-3 giorni. Il passaggio delle cellule consiste in una diluizione delle stesse in terreno fresco, dopo aver eseguito la conta. Tutte queste operazioni vengono eseguite in ambiente sterile, sotto una cappa a flusso laminare.

Le cellule possono essere passate fino ad un massimo di 30-35 passaggi e solo dopo il 5°-6° passaggio sono pronte per la trasfezione.

### **3.3.2 Criopreservazione delle cellule**

Durante l'esecuzione dei vari passaggi sono stati messi da parte alcuni ml della coltura cellulare ai fini di criopreservare le cellule ed utilizzarle nei successivi esperimenti. Le cellule prima di esser prelevate, vanno contate con l'apposita cameretta e congelate ad una densità di  $1 \times 10^7$  cells/ml. Il mezzo nel quale viene effettuato il congelamento contiene:

- 45% v/v mezzo di coltura fresco
- 45% v/v mezzo di coltura ricondizionato
- 10% v/v DMSO sterile

Si calcolano quanti ml di cellule sono necessari per ottenere la densità finale di  $1 \times 10^7$  cells/ml e quanto volume di mezzo è necessario per la loro risospensione. Le cellule vengono centrifugate a 100xg per 5' a T° ambiente e il supernatante deve essere buttato. Il pellet di cellule rimasto viene risospeso nel mezzo per la criopreservazione delle cellule. Le cellule vengono quindi aliquotate in Crioivials e messe prima in ghiaccio per qualche minuto, e in seguito a  $-80^\circ\text{C}$ . Si favorisce così un congelamento veloce e una minore degradazione delle strutture cellulari.

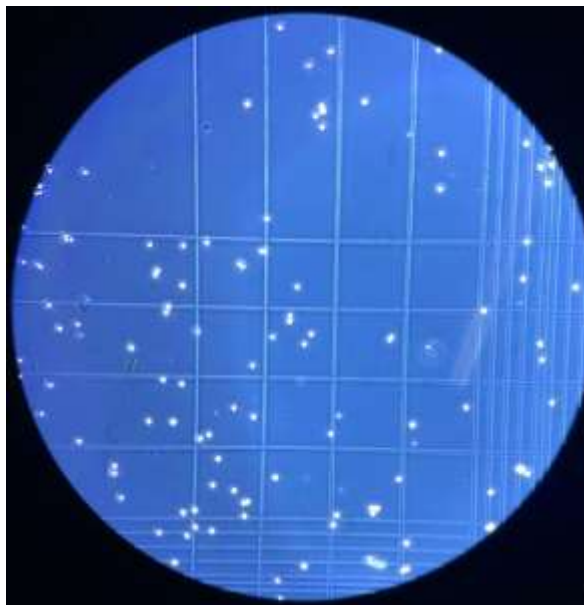
### **3.3.3 Conta cellulare**

La conta cellulare viene effettuata per determinare il numero di cellule totali e in particolare per determinare la vitalità cellulare, importante ai fini della trasfezione.

Per contare le cellule viene utilizzata la camera di Burker. Si agita bene la sospensione cellulare e si preleva 1 ml. Per valutarne la vitalità, le cellule vengono diluite 1:1 con Trypan Blue che è un colorante che ha la caratteristica di diffondere nelle membrane cellulari fortemente danneggiate, determinandone una colorazione in blu. Le cellule che appaiono blu sono dunque quelle morte, mentre quelle bianche sono quelle vive.

Molto importante è determinare la percentuale di vitalità cellulare, che, ai fini della trasfezione deve essere superiore al 95%. Per ottenerla, si esegue la seguente proporzione:

$$n^{\circ} \text{ cellule totali} : 100 = n^{\circ} \text{ cellule vitali} : x$$



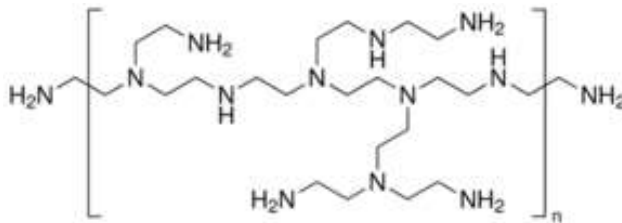
*Fig.14 Foto al microscopio della camera di Burker.*

### **3.3.4 Trasfezione**

Con la trasfezione si introduce del materiale genetico all'interno delle cellule eucariotiche. In particolare, si utilizzano sostanze che

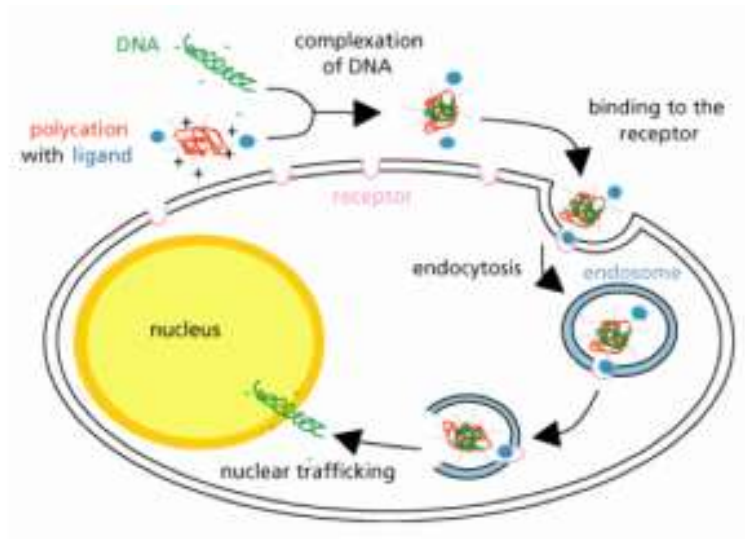
possano schermare le cariche anioniche del DNA, le quali, interferendo con le cariche negative presenti sulla membrana cellulare, possono creare delle repulsioni elettrostatiche con la stessa. Per questo motivo vengono usati degli agenti di trasfezione che possano schermare le cariche presenti sul DNA e permetterne l'ingresso: PEI e optiMEM.

Il PEI è un polimero con unità ripetitiva composta dal gruppo amminico e da due distanziatori CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> alifatici di carbonio. Le polietilenimine lineari contengono tutte le ammine secondarie, a differenza dei PEI ramificati che contengono gruppi amminici primari, secondari e terziari di natura polimerica che è in grado di legare i residui anionici della superficie cellulare permettendone l'entrata tramite endocitosi.



**Fig.15** Rappresentazione di una molecola di PEI

L'optiMEM è un terreno ricco di nutrienti il cui utilizzo è ideale per le trasfezioni con lipidi cationici. Questo terreno è tamponato con HEPES e sodio carbonato e integrato con ipoxantina, timidina, sodio piruvato, L-glutammina, oligoelementi e fattori di crescita.



**Fig.16** Immagine raffigurante il processo di trasfezione

Le cellule possono essere trasfettate dopo aver effettuato almeno 5-6 passaggi così che la linea cellulare si stabilizzi.

Il giorno precedente la trasfezione, le cellule devono essere passate ad una densità di  $0.6-0.7 \times 10^6$  cellule/ml. Dopo 24h, le cellule dovrebbero raddoppiarsi e arrivare alla concentrazione desiderata di  $1 \times 10^6$  cellule/ml. Se non lo sono, bisogna diluirle. Per avere un'alta efficacia nella trasfezione, la vitalità cellulare deve essere superiore al 90%.

Dopo aver determinato la quantità di cellule presenti nella coltura, si procede con la preparazione del complesso DNA-PEI aggiunti in rapporto 1:4 (DNA: PEI). Per 30 ml di coltura cellulare vengono trasfettati 30 ug di DNA e si adotta il seguente protocollo:

- Preparare due eppendorf:
  1. 30  $\mu$ g DNA + 750  $\mu$ l optiMEM
  2. 120  $\mu$ g PEI + 750  $\mu$ l optiMEM



- Incubare 15' sotto cappa
- Inserire il contenuto di 1 in 2
- Incubare 15' sotto cappa
- Inserire il materiale genetico nella flask ed incubare

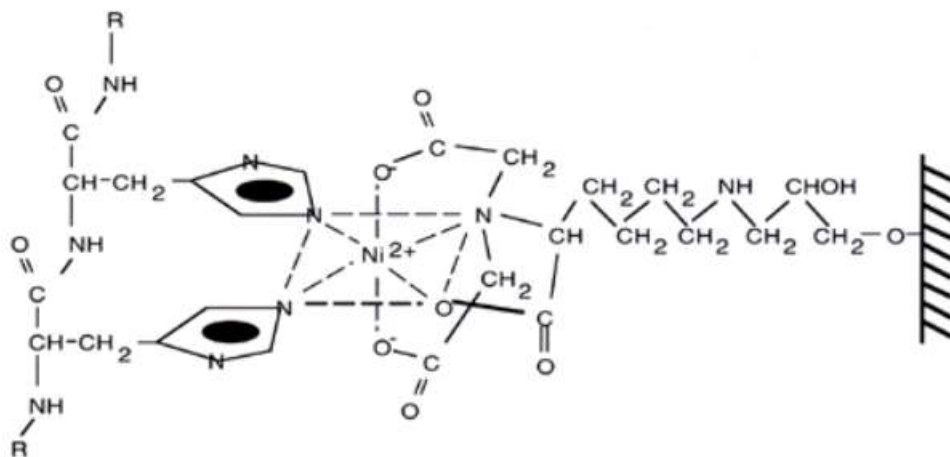
### **3.5 PURIFICAZIONE ACE2 RICOMBINANTE**

Come accennato nei precedenti capitoli, il gene codificante la proteina ACE2 è stato ingegnerizzato con l'aggiunta di un peptide segnale che ne permette la secrezione nel mezzo di crescita cellulare. La proteina viene rilasciata nel mezzo di coltura, perciò si raccoglie il supernatante che viene centrifugato per 5' a 500xg ai fini di far precipitare il pellet cellulare che viene poi scartato.

Il supernatante raccolto, dapprima è stato sottoposto a dialisi per eliminare eventuali agenti chelanti contenuti nel terreno di coltura, e poi è stato caricato su colonna e purificato tramite cromatografia di affinità. La purificazione è stata eseguita sia in condizioni native che in condizioni denaturanti.

#### **3.5.1 Purificazione tramite cromatografia di affinità in condizioni native e denaturanti**

L'applicazione di questa tecnica è resa possibile grazie alla presenza della coda di istidine fusa all'estremità C-terminale della proteina. Questa coda ha infatti la capacità di legare efficientemente alcuni ioni metallici, in particolare il nickel.



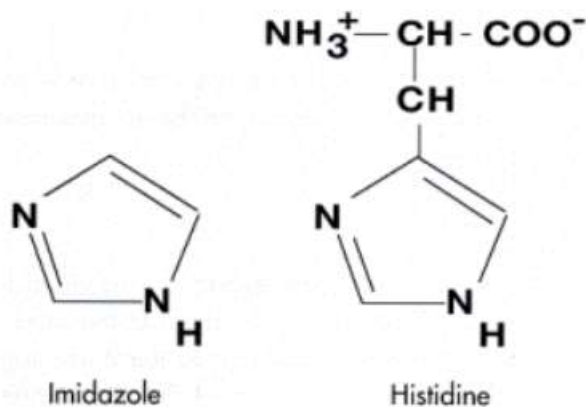
**Fig. 17** *Illustrazione del legame che si stabilisce tra il Nickel e le code di istidine.*

Inizialmente è stata effettuata una purificazione in condizioni native ed è stato usato un buffer a salinità intermedia (Hepes 10 mM, NaCl 300 mM). Poiché la proteina ha la caratteristica di dimerizzare, si è deciso di aumentare il sale fino ad arrivare a concentrazioni alte (Hepes 10 mM, NaCl 500 mM – 1M). Inoltre, è stata effettuata un'ulteriore purificazione in condizioni denaturanti con l'utilizzo di un buffer contenente guanidina 6M (Hepes 10 mM, NaCl 300 mM, Guanidina 6M).

Prima della purificazione, il supernatante è stato scambiato con il buffer di equilibratura per far sì che eventuali agenti chelanti presenti nel terreno potessero intaccare il legame della proteina alla resina.

Per la purificazione della proteina è stata utilizzata la resina NiNTA (Nickel Chelating Resin – G Healthcare<sup>®</sup>) che viene conservata in etanolo a 4°C. Al momento dell'utilizzo, la resina viene sottoposta a

lavaggi con 5 V/C di H<sub>2</sub>O per eliminare l'eccesso di etanolo e segue poi una fase di equilibratura con l'equilibration buffer, 5 V/C per 3 volte. La resina così equilibrata viene incubata con il supernatante in agitazione a 4°C per 1 h e poi inserita in colonna dove viene fatta impaccare per qualche minuto. Seguono poi dei lavaggi preliminari con wash buffer (HEPES 10 Mm, NaCl 300 mM, Imidazolo 10 mM) per eliminare eventuali proteine che si legano in maniera aspecifica (5 V/C) e la fase di eluizione con 2 V/C di elution buffer (HEPES 10 Mm, NaCl 300 mM, Imidazolo 500 mM) dove, aggiungendo l'imidazolo si fa eluire la proteina ricombinante dalla resina. L'imidazolo, essendo molto simile alle istidine (fig.18), compete per il legame con il nickel, e riesce ad eluire e quindi far staccare la proteina ricombinante dalla resina.



**Fig.18** *Illustrazione delle molecole di Imidazolo e Istidina.*

Per la purificazione in condizioni denaturanti, il supernatante, dopo essere stato scambiato con il buffer di equilibratura con tubi da dialisi, è stato sottoposto a scambio con un buffer contenente

guanidina 6M (Hepes 10 mM, NaCl 300 mM, Guanidina 6M), tramite l'utilizzo di concentratori da centrifuga.

### **3.5.2 Dialisi**

È stata eseguita una dialisi del supernatante con tubi da dialisi di cellulosa rigenerata al fine di eliminare eventuali agenti chelanti presenti sulla coltura cellulare, e nelle frazioni di eluato per eliminare l'imidazolo presente. I tubi da dialisi sono forniti dalla Spectrum Laboratories (Spectral/Por<sup>®</sup>) ed hanno un cut-off di 3.5 kDa.

La membrana si presenta liofilizzata e deve essere tagliata in base alla quantità di volume di campione che si ha a disposizione. In genere si considera 1 cm per ogni ml di volume a cui vanno aggiunti 3 o 4 cm alle due estremità per chiudere la caramella. Si procede quindi con l'idratazione della membrana con ddH<sub>2</sub>O. A questo punto, viene chiusa una delle due estremità, inserito il campione che deve essere sottoposto a dialisi e chiusa l'altra estremità. La 'caramella' è così pronta per essere inserita nel buffer col quale si vuole effettuare lo scambio. Per garantire un efficiente scambio, si lascia nel buffer overday e overnight in frigo a 4°C con un'ancoretta magnetica per garantire il mescolamento continuo del buffer.



**Fig.19** Immagini raffiguranti l'esecuzione di una dialisi con tubo da dialisi. A sinistra è rappresentata la 'caramella' contenente il campione che deve essere sottoposto a dialisi. A destra è raffigurato un becker contenente buffer di scambio con la 'caramella' al suo interno.

### **3.6 SDS-PAGE**

La SDS PAGE è una tecnica che permette la separazione di proteine in un campo elettrico in base alle loro dimensioni.

I gel per la corsa elettroforetica sono costituiti da acrilamide e altre componenti necessarie per la sua polimerizzazione come ad es. il TEMED e l'APS e da componenti come l'SDS (sodio-dodecil-solfato) che, conferendo una carica negativa alla proteina, permettono la migrazione delle proteine dal catodo verso l'anodo, rendendo costante il rapporto massa/carica.

In base alla dimensione della proteina che deve migrare, possono essere prodotti gel con varie concentrazioni di acrilamide. Tanto maggiore è la dimensione della proteina, tanto minore sarà trama del gel di acrilamide. Avendo a che fare con una proteina di dimensioni medio-grandi, i gel da noi utilizzati hanno una percentuale di acrilamide del 10%.

I gel sono composti da due parti: lo stacking (4% di acrilamide) è la porzione nella quale avviene l'impacchettamento delle proteine e presenta i pozzetti per il caricamento dei campioni; il running (10% acrilamide) che permette la risoluzione delle bande proteiche.

	<b>RUNNING (10%)</b>	<b>STACKING (5%)</b>
H <sub>2</sub> O mmQ	4.03 ml	2.895 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.50 ml	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6.8	-	1.25 ml
SDS 10%	100 µl	50 µl
ACRILAMMIDE	3.33 ml	835 µl
TEMED	15 µl	7.5 µl
APS 10%	30 µl	15 µl

I campioni, prima di essere caricati nel gel, devono essere diluiti in SDS gel-loading buffer ed essere bolliti per 10 minuti a 100°C. Questo buffer è composto da SDS, che è un detergente anionico che determina la rottura di interazioni non covalenti delle proteine e β-mercaptoetanolo, che è un agente riducente per i ponti disolfuro. In media, una molecola di SDS si inserisce ogni due residui amminoacidici: il rapporto carica - massa nativo delle proteine presenti nel campione è quindi reso uniforme dal detergente per tutte le molecole proteiche, permettendo una separazione in base al peso delle stesse.

Dopo aver preparato i gel e caricato i campioni, si procede con la preparazione della cameretta elettroforetica nella quale viene aggiunto il TGS 1X necessario per la corsa. Si fa correre inizialmente a 80V per permettere l'impacchettamento delle proteine e poi a 150V per permettere la corsa.



## **TGS 5X**

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

A fine corsa il gel può essere utilizzato per una colorazione con comassie blue e decolorazione con destaining solution o per l'esecuzione di Western Blot.

## **COMASSIE BLUE STAINING SOLUTION**

- 50% v/v Metanolo
- 10% v/v Acido acetico glaciale
- 0.1 % w/v Comassie Blue Brilliant

Portare a volume con ddH<sub>2</sub>O.

## **DESTAINING**

- 25% v/v Metanolo
- 10% v/v Acido Acetico Glaciale

Portare a volume con ddH<sub>2</sub>O.

### **3.7 WESTERN BLOT**

Il western blot è una tecnica che permette di trasferire le proteine da un gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrocellulosa, o di polivinilidene fluoride (PVDF) e determinarne un riconoscimento specifico. Per il trasferimento delle proteine sulla membrana è stato assemblato un “sandwich” con il seguente ordine: fogli di carta assorbente, membrana in nitrocellulosa, gel di acrilamide, carta assorbente. Il tutto è stato equilibrato in un tampone di trasferimento contenente metanolo al 20% (20% v/v Tampone di trasferimento 5X; 60% v/v H<sub>2</sub>O mmq; 20% v/v Metanolo) e caricato su un supporto il quale è stato introdotto all’interno di un apparecchio utilizzato per il trasferimento di tipo semi-dry. Il cassetto nel quale viene inserito il ‘sandwich’ è dotato di due elettrodi che permettono il trasferimento in direzione perpendicolare al gel.

Il campo elettrico che verrà generato farà in modo che le proteine, a causa del legame con l’SDS, si trasferiscano dal gel alla membrana.

Finita la corsa, è necessario saturare tutti i domini idrofobici della membrana ai fini di evitare dei legami aspecifici con l’anticorpo. Si prepara quindi una soluzione di TBST-milk 5% w/v e la si lascia incubare insieme per 1 h e 30’.

#### **TBST**

- 40% v/v TBS 5X
- 60% v/v H<sub>2</sub>O
- 0.1 % v/v Tween20

L'eccesso di TBST-milk 5% viene poi lavato con TBST per 5' a T° ambiente e si può procedere con l'incubazione con l'anticorpo primario a 4°C overnight in agitazione. Il giorno successivo si raccoglie l'anticorpo e si eseguono 3 lavaggi con TBST per eliminarne l'eccesso. A questo punto si prepara l'anticorpo secondario e lo si mette ad incubare per 1 h a T° ambiente in agitazione. Si eseguono nuovamente 4 lavaggi con TBST e la membrana è così pronta per lo sviluppo.

Per lo sviluppo si utilizza un apposito kit fornito dalla ClonPlus, LiteABlot® che contiene due soluzioni: l'enhancer e il perossidase buffer. In un'epENDORF vengono aggiunte eguali quantità di soluzione, miscelate bene ed aggiunte sulla membrana e fatto incubare per 5'. Al termine dell'incubazione, grazie ad una reazione luminosa, si potrà osservare l'eventuale presenza della proteina. La reazione luminosa viene sviluppata nell'apposito strumento ChemiDoc®.

Gli anticorpi utilizzati sono:

- **anti-His** (Invitrogen® Cat.# MA1-21315) 1:6000 in TBST-BSA 1% w/v.
- **anti-ACE2** (EMD Millipore Corporation USA® Cat.# MABN59) 1:5000 in TBST-BSA 3% w/v.
- **anti-Mouse** (Santa Cruz Biotechnology Cat.# SC-2005) 1:10000 in TBST-BSA 3% w/v.

## **3.8 QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA**

Dopo aver verificato che la proteina è stata prodotta, sono stati eseguiti saggi per determinare la concentrazione della proteina, sia tramite tecniche spettroscopiche che con tecniche biochimiche, tramite l'applicazione del saggio di Bradford.

### **3.8.1 Tecniche spettroscopiche**

Per determinare la concentrazione della nostra proteina è stata misurata l'assorbanza a 280nm che permette di individuare eventuali amminoacidi aromatici della proteina. Conoscendo il coefficiente di estinzione molare, tramite la legge di Lambert-Beer si può calcolare la concentrazione della proteina di interesse. L'assorbanza ad una certa lunghezza d'onda è direttamente proporzionale alla concentrazione del campione  $c$ , espressa in molarità, e al cammino ottico in cm secondo una costante che è il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$ :

$$\mathbf{A = \epsilon cl}$$

Dopo aver calcolato il coefficiente di estinzione molare, corrispondente a  $163680 \text{ (M} \times \text{cm)}^{-1}$ , è stata calcolata la concentrazione della proteina.

### 3.8.2 Saggio di Bradford

La concentrazione della proteina è stata determinata anche tramite l'esecuzione del saggio di Bradford che prevede l'utilizzo del Comassie Brilliant Blue G-250 che si lega ad alcuni residui amminoacidici della proteina. Questo colorante inizialmente acidico e colorato di rosso-marrone lega i residui in forma anionica ad un'assorbanza di 595 nm assumendo una colorazione blu.

Per ottenere la concentrazione del campione si disegna una retta di calibrazione standard ottenuta leggendo l'assorbanza a 595 nm e quantità crescenti di BSA a concentrazione nota. I valori di assorbanza ottenuti vengono posti sull'asse Y e i valori crescenti di BSA sull'asse X.

La retta di calibrazione ottenuta è:

$$y = 0.0549x + 0.0633$$

### 3.9 PULL DOWN ASSAY

E' stato eseguito un saggio di pull down per osservare l'eventuale interazione tra la proteina ACE2 purificata e la proteina Spike Trimerica gentilmente fornita dal gruppo di ricerca del prof. Mancina, *Columbia University*. La proteina Spike è stata ingegnerizzata dal gruppo di ricerca del prof. Mancina con l'aggiunta di un tag di streptavidine.

Per osservare l'interazione tra ACE2 e Spike è stata utilizzata la resina STREP TACTIN XT Superflow<sup>®</sup> prodotta dalla IBA Lifesciences che è in grado di legare le proteine contenente un tag di streptavidine, in questo caso la Spike. Il bait, ovvero l'esca è la proteina Spike mentre la prey (preda) è la proteina ACE2, di cui se ne vuole verificare l'interazione. La resina si conserva in frigo a 4°C.

Si prelevano 80 µl di slurry e vengono fatti depositare o centrifugati a 200xg per 1' dentro ad una eppendorf. Quindi si elimina il supernatante e si aggiunge H<sub>2</sub>O per eliminare eventuali tracce di buffer. Si esegue una centrifugazione a 200xg per 1' e si elimina nuovamente il supernatante. Si prosegue con l'equilibratura aggiungendo per 3 volte l'equilibration buffer – EQB (10 mM HEPES, 300 mM NaCl) ed eliminando ad ogni passaggio il supernatante. Si aggiungono quindi 5 µg di Spike diluiti in 250 µl di EQB alla resina e la si lascia incubare per 1h a T° ambiente in agitazione. Terminata l'incubazione si elimina il supernatante e si eseguono dei lavaggi con EQBT (EQB + 0.05% v/v Tween) per eliminare l'eccesso di Spike. Viene quindi aggiunta ACE2-His e fatta incubare per 1h a T° ambiente. Si recupera l'unbound e si eseguono

nuovamente 3 lavaggi con EQBT. Segue quindi l'eluizione incubando per 5' con Biotina 2,5 mM e si recupera l'unbound.

I campioni, quindi, vengono diluiti in SB4X, bolliti per 10' a 100°C e caricati su gel di acrilamide. Infine viene eseguito un western blot.

### 3.10 SIMULAZIONI DI DINAMICA MOLECOLARE

Per capire approfonditamente quali residui fossero significativi ai fini del legame tra ACE2 e Spike, sono state effettuate delle simulazioni di dinamica molecolare. In particolare, le simulazioni sono state eseguite tramite il metodo Steered Molecular Dynamics (SMD) che permette di simulare eventi di unbinding tra due proteine. Tramite queste simulazioni è possibile comprendere quali residui sono più o meno significativi ai fini del legame. Applicando un force field esterno che ‘tira’ le proteine verso l’esterno per determinarne il distacco, si può comprendere, sulla base dei residui che si staccano prima, la rilevanza che essi hanno ai fini del legame. I legami che per primi andranno incontro ad un distacco saranno quelli più deboli. Al contrario, quelli che si staccheranno per ultimi, saranno quelli più forti. Dunque, si applicano questi campi di forza esterni e si analizzano poi le risposte del sistema.

La struttura del dominio PD di ACE2 legata al dominio RBD della proteina Spike è stata preparata utilizzando il programma CHARMM-GUI con l’utilizzo del campo di forza *charmm36m* che viene utilizzato per proteine foldate e intrinsecamente disordinate.

Il sistema è stato quindi immerso in una ‘box’ contenente acqua con le dimensioni di 18 nm x 13.0 nm x 13.0 e neutralizzato con i controioni K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>.

Le simulazioni sono state eseguite usando GROMACS 2018.3. Il dottor Motta ha prodotto un protocollo che ha permesso di rimuovere i contatti sfavorevoli e fornire un punto di partenza affidabile per le corse SMD. I cicli sono stati prodotti in NPT (Numero di atomi,



Pressione e Temperatura costante) usando il termostato V-rescale (con costante di coupling di 0.1 ps) e la pressione è stata impostata a 1 bar con il barostato Parrinello-Rahman. (costante di coupling di 0.2 ps). Per forzare tutti i legami è stato utilizzato un passo temporale di 2.0 fs, insieme all'algorithmo LINCS.

Per trattare le interazioni elettrostatiche a lungo raggio con distanza di taglio fissata a 12 Å, è stato utilizzato il metodo Ewald. Le interazioni a corto raggio repulsive e attrattive sono state descritte simultaneamente da un potenziale di Lennard-Jones, con un cut-off a 12 Å, applicando correzioni di dispersione a lungo raggio per energia e pressione.

È stata utilizzata una forza costante di  $10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  e il valore di equilibrio della distanza è stato modificato a velocità costante (sono state effettuate due repliche a  $0.05 \text{ \AA ns}^{-1}$  e  $0.02 \text{ \AA ns}^{-1}$ ).

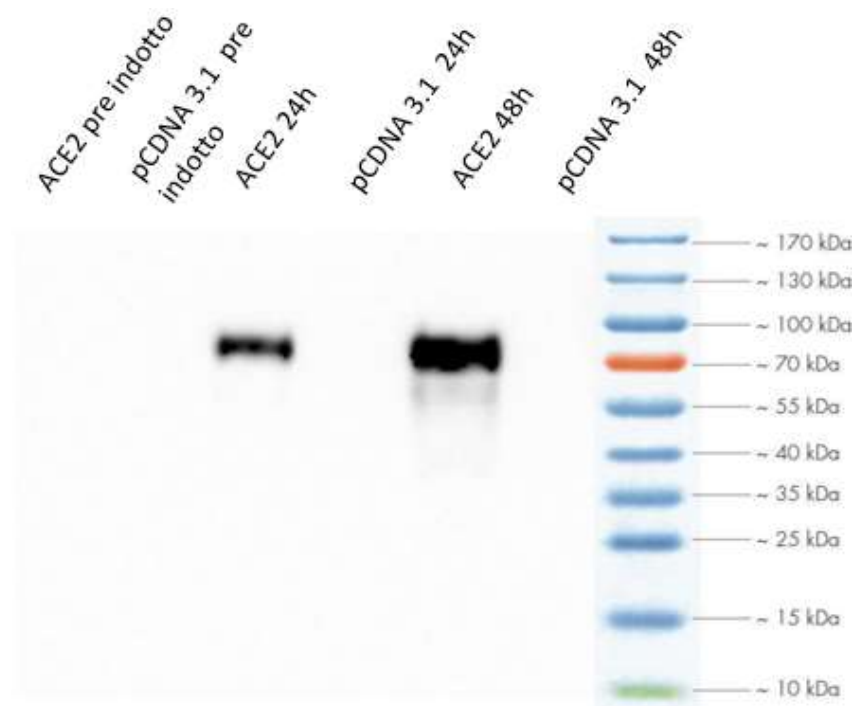
La forza applicata alla molla armonica è stata monitorata durante ogni replica.

## 4. RISULTATI

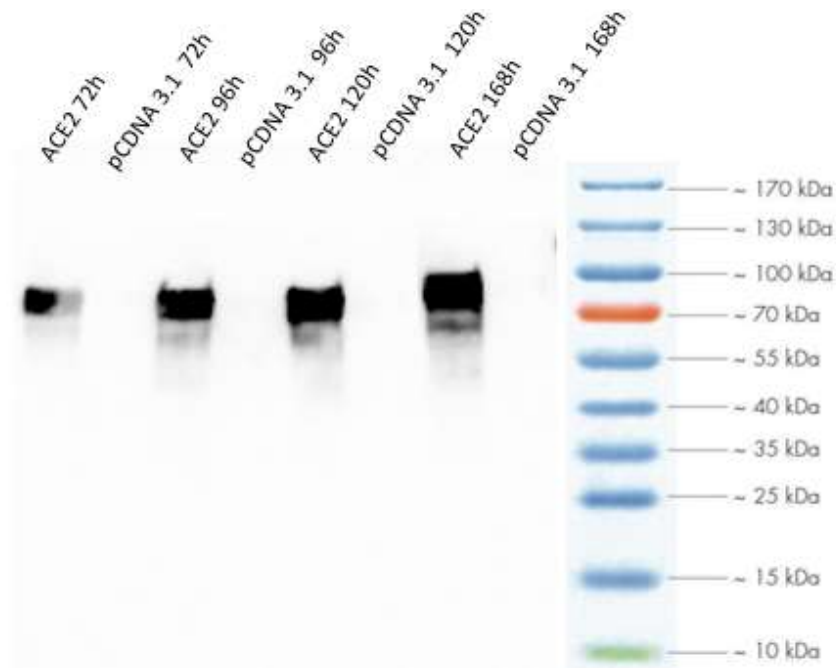
### 4.1 Cellule HEK293-F in sospensione

La trasfezione è stata effettuata seguendo il protocollo illustrato nei materiali e metodi. Inizialmente, per verificare quale fosse il miglior giorno per raccogliere la proteina, è stato effettuato un prelievo di 1 ml di coltura cellulare, ogni 24h. Inoltre, per convalidare i risultati ottenuti dalla trasfezione, sono state effettuate delle trasfezioni con il plasmide vuoto (pcDNA 3.1) e il PEI da solo. Infine, è stata effettuata una conta cellulare per capire quali fossero gli effetti prodotti rispetto la vitalità e la densità cellulare.

Di seguito vengono riportati i dati raccolti.



**Fig.20** Western Blot eseguito su campioni di ACE2 e pcDNA 3.1 vuoto. Per il Western sono stati utilizzati anti-ACE2 e anti-Mouse.



**Fig. 21** Western Blot eseguito su campioni di ACE2 e pcDNA 3.1 vuoto. Per il Western sono stati utilizzati anti-ACE2 e anti-Mouse.

Nella figura 20 e 21 sono rappresentati i risultati della prova di espressione. Sono stati caricati come controllo anche i campioni prima della trasfezione. Come si può osservare, già a partire dalle 24h successive alla trasfezione, la proteina viene espressa. Si può osservare che, all'aumentare dei giorni, aumenta anche la produzione della proteina e che a 96h (4° giorno) la proteina viene maggiormente espressa rispetto agli altri giorni.

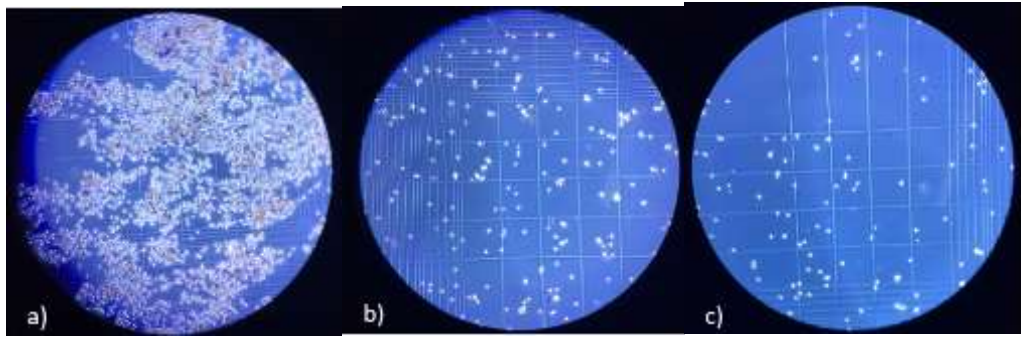
Dai risultati ottenuti si può stabilire che il 4° giorno successivo alla trasfezione è il migliore per raccogliere la proteina. Il 5° giorno (120 h) sembra non essere ottimale in quanto la proteina sembra andare incontro a degradazione.



*Fig.22 Flasks al primo giorno di trasfezione contenuti 30 ml di coltura cellulare ad una densità di  $1 \times 10^6$  cellule/ml. Partendo da sinistra vi sono: pcDNA 3.1 + ACE2; pcDNA vuoto; solo PEI.*



*Fig. 23 Foto raffigurante le flask 24h dopo la trasfezione.*



**Fig.24** Foto eseguite al microscopio di cellule sottoposte a conta in camera di Burker, 24 h dopo la trasfezione. a) Campione di cellule proveniente dalla coltura trattata solo con PEI, cellule diluite 1:2 con Tripan Blue. b) Campione di cellule proveniente da coltura trasfettata solo con pcDNA vuoto, cellule diluite 1:2 con Tripan Blue. c) Campione di cellule proveniente dalla coltura trattata solo con PEI, cellule diluite 1:8 con Tripan Blue.



**Fig.25** Flasks a 48 h dalla trasfezione.



**Fig.26** *Flasks a 72 h dalla trasfezione.*

Oltre ai dati relativi all'espressione, è stata eseguita anche una valutazione a livello visivo e microscopico. A livello visivo si è potuto osservare una variazione dello stato di intorbidimento della coltura cellulare e a livello microscopico, la quantità di cellule vive e/o morte presenti.

Nelle flasks contenenti pcDNA con il gene codificante ACE2, si è osservato un intorbidimento della coltura che aumentava col passare dei giorni. Risultato analogo è stato ottenuto con la coltura cellulare trasfettata solo col plasmide vuoto. Tuttavia, nella coltura contenente solo PEI, si è osservato un intorbidimento molto maggiore rispetto alle altre colture cellulari, già dal primo giorno post-trasfezione. Come si può vedere anche dalla figura 27, la flask contenente solo PEI, rispetto alle altre flasks, mostra una grande quantità di materiale depositato ai lati della flask che con grande probabilità sono cellule morte.

Sono stati poi raccolti dati riguardanti densità e vitalità cellulare. Di seguito sono riportati i dati raccolti:

<b>DENSITA' CELLULARE (cells/ml)</b>				
	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>pCDNA 3.1 + ACE2</b>	1.6x10 <sup>6</sup>	2.3x10 <sup>6</sup>	3.6x10 <sup>6</sup>	2.1x10 <sup>6</sup>
<b>pCDNA 3.1 vuoto</b>	1.2x10 <sup>6</sup>	2.5x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>6</sup>
<b>PEI</b>	2x10 <sup>6</sup>	Non quantificabili	Tutte morte	Tutte morte

*Tabella 27. Misura della densità cellulare effettuata ogni 24h.*

<b>VITALITA' CELLULARE (%)</b>				
	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>pCDNA 3.1 + ACE2</b>	89%	85%	77%	80.5%
<b>pCDNA 3.1 vuoto</b>	93%	87%	73%	67%
<b>PEI</b>	77%	/	/	/

*Tabella 28. Misura della vitalità cellulare effettuata ogni 24h.*

Per quanto riguarda le cellule trattate solo con il PEI, si può osservare una crescita cellulare normale. A 24h dalla trasfezione, infatti, le cellule risultano essere raddoppiate e i giorni successivi mostrano una densità così elevata da non poter essere contate, fino ad arrivare al 3° giorno (72h) in cui risultano essere tutte morte.

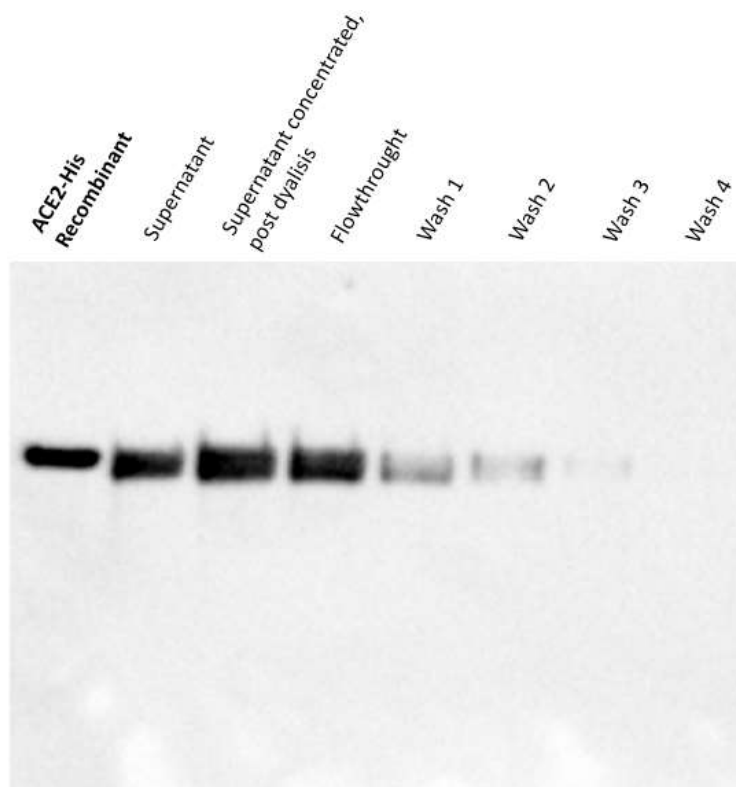
Per quanto riguarda le altre colture cellulari invece, si possono osservare dati pressoché simili fra loro, in cui si osserva una crescita esponenziale per i primi 3 giorni, fino ad arrivare al 4° giorno in cui

le cellule iniziano a diminuire, anche in virtù del fatto che muoiono per carenza di nutrienti.

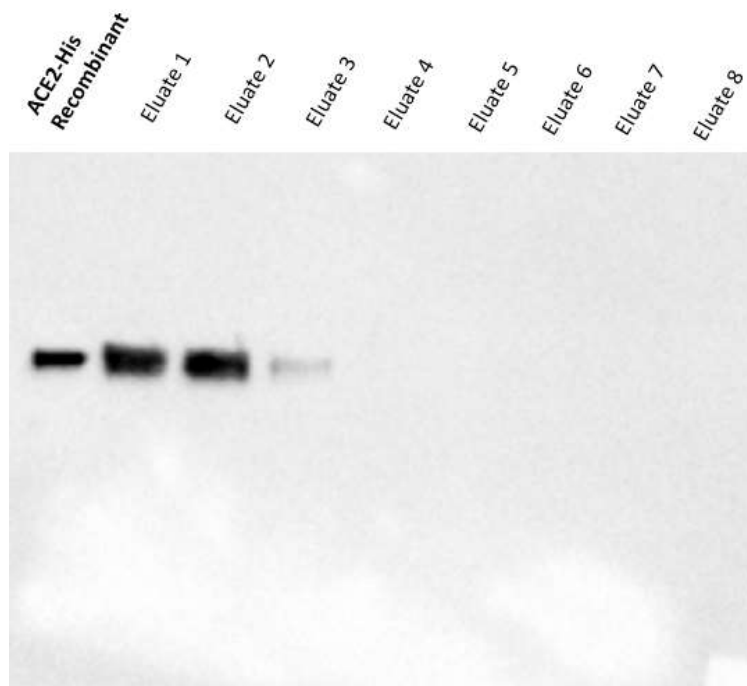


## 4.2 PURIFICAZIONE ACE2 IN CONDIZIONI NATIVE

Come accennato nei materiali e metodi, inizialmente sono state effettuate delle prove di purificazione utilizzando un buffer a salinità intermedia (HEPES 10 mM, NaCl 300 mM).



**Fig.29** Western Blot eseguito con anti-ACE2 e anti-MOUSE su campioni provenienti da lavaggi.



**Fig.30** *Western Blot eseguito anti-ACE2 e anti-MOUSE su campioni provenienti dall'eluizione.*

Dai risultati ottenuti da questa purificazione si può osservare che, nonostante si stabilisca un parziale legame alla resina NiNTA, la proteina è presente nei primi due eluati. La quantità di proteina ottenuta ammonta a 40 ug ca. da 40 ml iniziali.

Vista la caratteristica di ACE2 che tende a dimerizzare e visto che è stato ottenuto un parziale legame alla resina, è stata effettuata una purificazione a con buffer a salinità medio-alta (HEPES 10 mM, NaCl 500 mM – 1M). In questo modo, la formazione dei dimeri dovrebbe essere limitata dalla presenza di un'elevata concentrazione salina e la proteina, essendo più libera da un punto di vista conformazionale, dovrebbe legarsi alla resina in modo più efficiente.

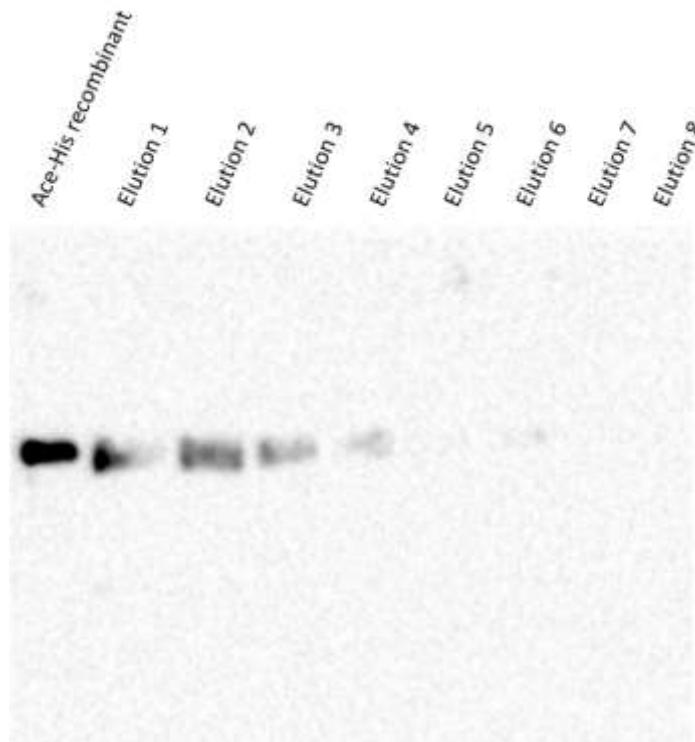
Nonostante ciò, i risultati ottenuti dalla purificazione con concentrazione salina elevata non sono stati soddisfacenti e per questo motivo si è deciso di continuare a lavorare con buffer a salinità intermedia.

Riassumendo, dalle prove effettuate si è potuto evincere che effettuare uno scambio del buffer di crescita risulta estremamente importante ai fini del miglioramento del binding della proteina alla resina ma che comunque la coda di istidine non viene esposta in maniera ottimale per permetterne il legame alla resina. Inoltre, si è potuto assumere che il buffer migliore per effettuare lo scambio è quello che contiene 10 mM HEPES e 300 mM NaCl.

Raccolti questi dati, si è quindi deciso di effettuare un tentativo di purificazione in condizioni denaturanti, utilizzando la guanidina 6M, la quale è stata sciolta nel buffer a salinità intermedia. In questo modo, la proteina, denaturandosi, dovrebbe esporre la coda di istidine, rendendola disponibile per il legame con la resina NiNTA.

### 4.3 PURIFICAZIONE ACE2 IN CONDIZIONI DENATURANTI

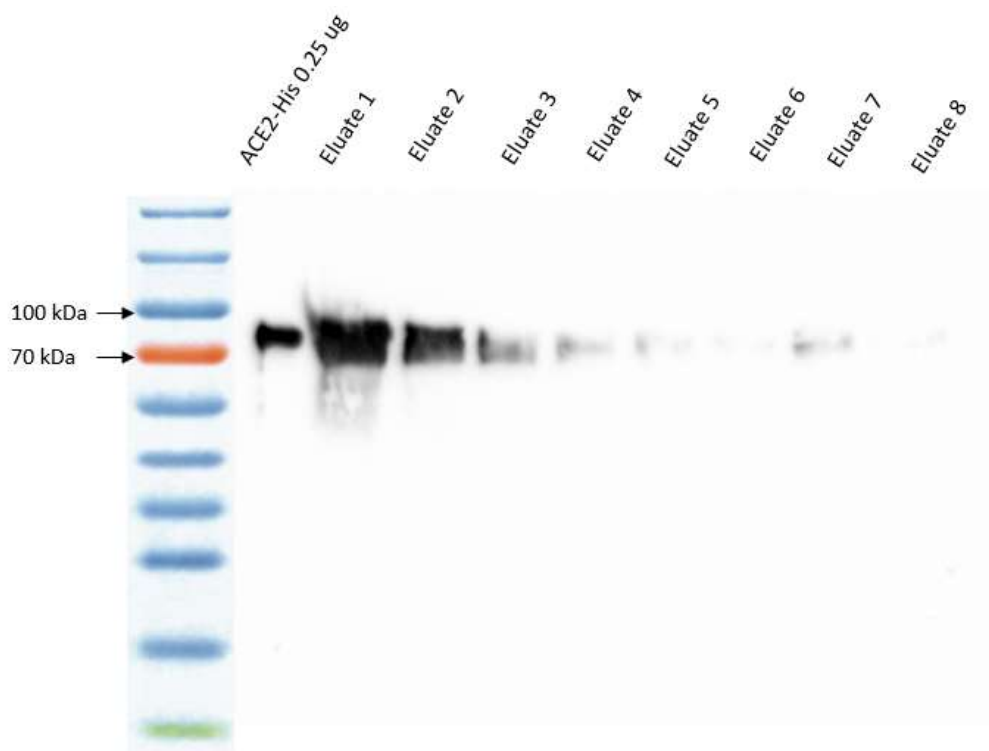
In questa prova di purificazione sono stati seguiti gli stessi passaggi delle precedenti purificazioni a cui è stato aggiunto uno step riguardante lo scambio con la guanidina 6M. Lo scambio è stato effettuato usando un concentratore da centrifuga e diluendo di circa 10 volte il supernatante. Il supernatante denaturato è stato così caricato su resina NiNTA pre-equilibrata con lo stesso buffer denaturante a cui sono seguiti lavaggi ed eluizioni. Sulle frazioni raccolte è stato eseguito un western blot.



**Fig.31** Western Blot eseguito con anti-ACE2 e anti-MOUSE su campioni provenienti da purificazione eseguita in condizioni denaturanti.

I risultati ottenuti da questa prova si sono mostrati essere migliori rispetto alla prova eseguita in condizioni native. Difatti, la quantificazione della proteina purificata ammonta a 55 ug ca da 40 ml di supernatante.

Per questo motivo si è deciso di lavorare su grande scala utilizzando il protocollo adottato nell'ultima prova di purificazione.



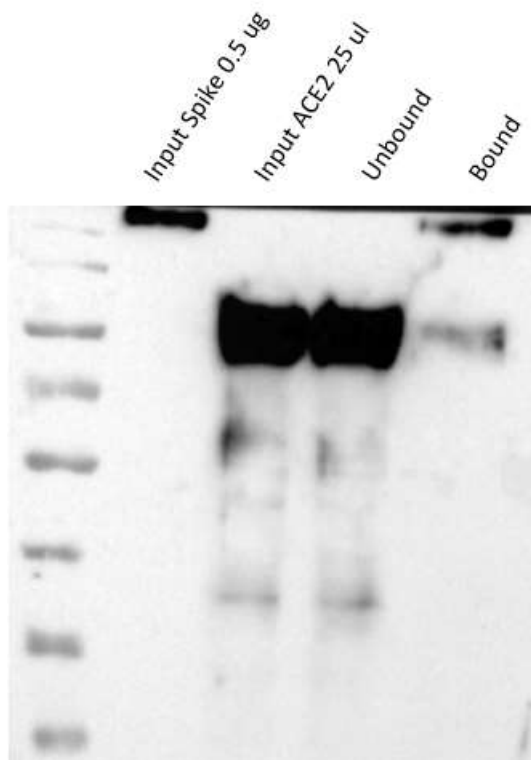
**Fig.32** *Western Blot* eseguito con anti-ACE2 e anti-MOUSE .

Nel primo eluato si può osservare una grande quantità di proteina, nettamente maggiore rispetto a quella presente nelle ultime due prove di purificazione. Per il resto i risultati risultano essere coerenti con le ultime prove di purificazione effettuate.

#### 4.4 PULL-DOWN ASSAY

È stato eseguito un saggio di pull-down tra la proteina ACE2 purificata e la proteina Spike trimerica.

Il protocollo adottato è stato illustrato sul capitolo materiali e metodi e la frazione di proteina utilizzata proveniva dall'ultima prova di purificazione in condizioni denaturanti. Dopo aver eseguito il saggio di pull-down è stato sviluppato un western blot per osservare l'eventuale interazione delle proteine.



**Fig.33** *Western blot eseguito su campioni provenienti da pull down con anti-His e anti-Mouse.*

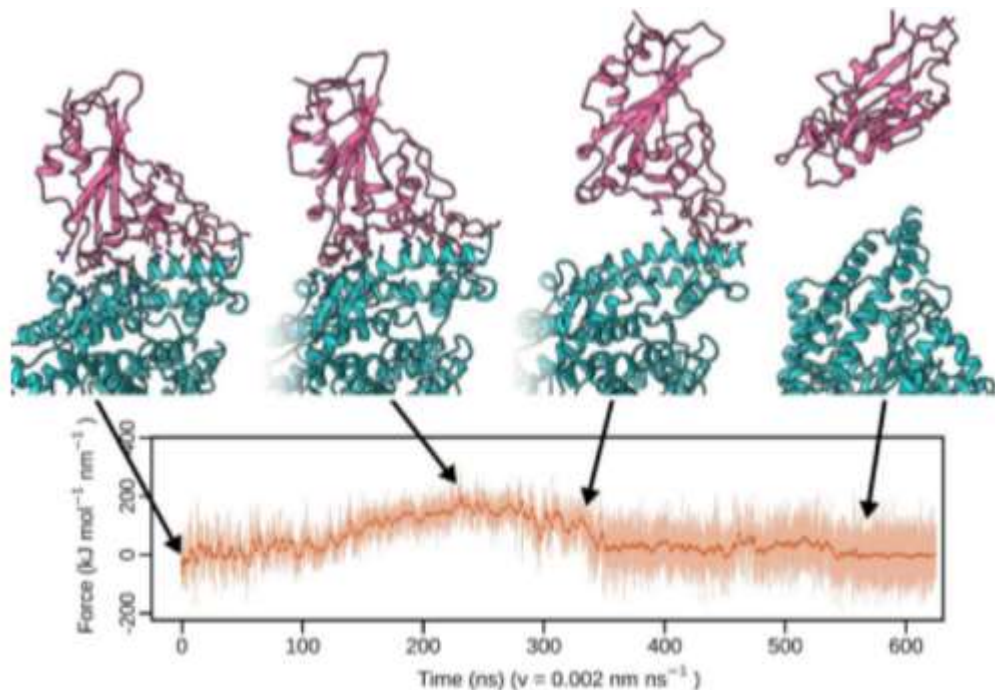
Come si può osservare dalla figura, nei primi pozzetti sono stati caricati gli input delle proteine Spike ed ACE2. Sono stati caricati

anche l'unbound che rappresenta l'eccesso di ACE2 che non si è legata alla proteina Spike e il bound, ovvero le proteine che si sono legate fra loro. I risultati ottenuti da questo saggio hanno mostrato che una parte della proteina ACE2 che viene caricata non si lega alla proteina Spike. Tuttavia, si può osservare una banda rappresentativa e significativa dell'interazione tra le due proteine.

## 4.5 SIMULAZIONI DI DINAMICA MOLECOLARE

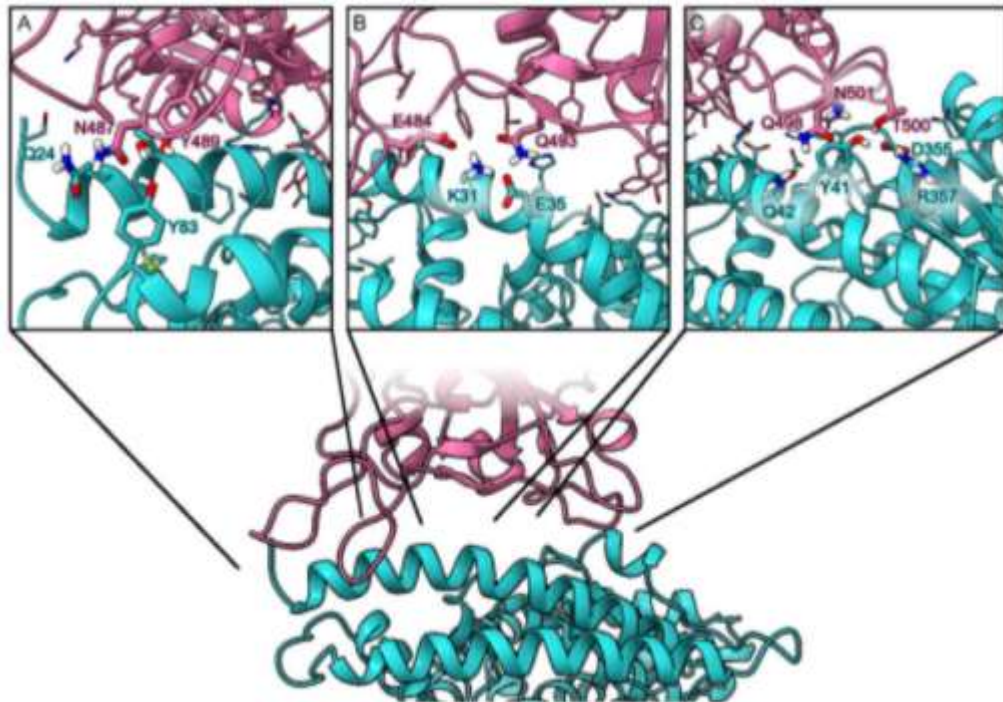
Come accennato nei materiali e metodi, le simulazioni sono state eseguite sulla base di eventi di unbinding. Queste sono state condotte a due differenti velocità di trazione:  $0.05 \text{ \AA ns}^{-1}$  e  $0.02 \text{ \AA ns}^{-1}$  e con una forza costante di  $10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ .

L'analisi delle simulazioni ha riportato un raggiungimento di un massimo di forza a circa 250 ns a livello del quale l'RBD inizia a staccarsi dalla superficie di legame con ACE2 preservando le interazioni a livello della regione RBD (472-490). Questa regione di RBD sembra essere quella più significativa da un punto di vista energetico nel mantenere un legame con ACE2.



**Fig.34** Raffigurazione del meccanismo di unbinding di RBD dal recettore ACE2.





**Fig. 35** *Raffigurazione dell'interfaccia di legame tra RBD ed ACE2. I residui principalmente coinvolti nella stabilizzazione del legame sono rappresentati come bastoncini.*

Nella figura 35, sono raffigurati i residui principalmente coinvolti nell'interazione tra ACE2 ed RBD suddivisi in tre quadranti. A partire da destra (fig.35c) sono raffigurati i residui che per primi subiscono un distacco e andando verso sinistra (fig.35a) sono invece rappresentati gli ultimi residui che si staccano.

È stato osservato che i residui N487 e Y489 del dominio RBD sono quelli ad essere maggiormente coinvolti nell'interazione con altri residui polari di ACE2 come Q24 o Y83 (fig. 60°). Durante le simulazioni SMD, queste interazioni vengono mantenute per oltre 400 ns. Altre interazioni tra residui come E484 e Q493 con K31 e E35 (fig. 60b) o Q498, T500 N501 con Y41, Q42 D355 e R357 (fig.

60c) si rompono dopo che viene raggiunto un picco massimo di forza a 250s.

## **5. CONCLUSIONI**

La velocità con la quale il SARS-CoV-2 si è diffuso nel mondo intero, ha permesso al virus di circolare liberamente e di introdurre nuove mutazioni. Nel giro di poco tempo sono iniziate a circolare nuove varianti che hanno dato al virus una maggiore capacità di infettare e quindi una maggior trasmissibilità e capacità di sfuggire al sistema immunitario.

Secondo i dati riportati dalla Johns Hopkins University & Medicine, ad oggi sono stati confermati più di 180 milioni di casi COVID-19 e quasi 4 milioni di decessi. Sin da subito il COVID-19 ha causato un gran numero di morti e questo ha portato la comunità scientifica da una parte, a ricercare una cura che potesse limitarne la diffusione, e dall'altra ad approfondire le caratteristiche molecolari sia del virus che del recettore umano a cui esso si lega. Difatti, il recettore ACE2 è diventato uno dei principali protagonisti insieme al SARS-CoV-2.

I gruppi di ricerca che stanno investendo sullo studio di ACE2 sono in continuo aumento, tuttavia gli studi effettuati su ACE2, ad oggi non sono ancora sufficienti a delineare in modo preciso le caratteristiche molecolari e i numerosi ruoli che riveste la proteina.

Ad oggi il nostro gruppo di ricerca ha definito i residui fondamentali ai fini dell'interazione tra le due proteine attraverso approcci di tipo sperimentale e teorico, ma questi sono studi preliminari.

Un attento studio delle mutazioni che caratterizzano le varianti ha permesso di sceglierne una che fosse ricorrente e che fosse coinvolta in maniera rilevante nello stabilire un legame con la proteina ACE2.

In particolare, la scelta è ricaduta sulla mutazione E484K riscontrabile nella gran parte delle varianti che sono insorte fino ad ora: alfa, beta, gamma, eta, tetha, kappa. Come dimostrano le simulazioni di dinamica molecolare effettuate dal prof. Di Marino e dal dottor Motta, questo residuo è anche molto importante nello stabilire un legame con la proteina ACE2. (fig.34-35).

Oltre al plasmide contenente il gene codificante ACE2, è stato disegnato un plasmide (*pcDNA3.1*) contenente la proteina RBD con una coda di streptavidine. Gli step successivi consisteranno innanzitutto nell'espressione del dominio RBD in sistema di espressione eucariotico e poi nella produzione dei mutanti. Sono state scelte le mutazioni E484K del dominio RBD e K31E del dominio ACE2. Lo scopo finale è quello di produrre ed esprimere i mutanti e verificarne la loro interazione sia da un punto di vista teorico, tramite studi di dinamica molecolare, che da un punto di vista pratico tramite l'esecuzione di saggi di pull down. In questo modo sarà possibile verificare se il legame che si instaura tra i mutanti è più o meno forte rispetto alla forma wild type. Con questo tipo di studi sarà possibile continuare a studiare e caratterizzare le varianti ottenendo così maggiori informazioni di tipo molecolare e strutturale e di conseguenza sulla loro trasmissibilità.



## ***BIBLIOGRAFIA***

[1] Prasun K. Datta, Fengming Liu, Tracy Fischer, Jay Rappaport and Xuebin. *SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy.*

*Theranostics* **2020**; 10(16): 7448-7464. DOI: [10.7150/thno.48076](https://doi.org/10.7150/thno.48076)

[2] Devaux CA, Rolain JM, Raoult D. *ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome.*

*Journal of Microbiology, Immunology and Infect.* **2020**; 53(3):425-435. DOI: [10.1016/j.jmii.2020.04.015](https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.04.015)

[3] Woodby B, Arnold MM, Valacchi G. *SARS-CoV-2 infection, COVID-19 pathogenesis, and exposure to air pollution: What is the connection?*

*Annals of the New York Academy of Sciences.* **2021**; 1486(1):15-38. DOI: [10.1111/nyas.14512](https://doi.org/10.1111/nyas.14512)

[4] Harrison AG, Lin T, Wang P. *Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis.*

*Trends in Immunology.* **2020**; 41(12):1100-1115. DOI: [10.1016/j.it.2020.10.004](https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004)

[5] Viana SD, Nunes S, Reis F. *ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities - Role of gut microbiota dysbiosis.*

*Ageing Research Reviews.* **2020**; 62:101123. DOI: [10.1016/j.arr.2020.101123](https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101123).

[6] Juraszek, J., Rutten, L., Blokland, S. et al. *Stabilizing the closed SARS-CoV-2 Spike trimer.*

*Nature in Communication* 12, 244 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20321-x>

[7] Viana SD, Nunes S, Reis F. *ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities - Role of gut microbiota dysbiosis.*

*Ageing Research Reviews.* **2020**; 62:101123. DOI: [10.1016/j.arr.2020.101123](https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101123).

[8] Gross L. Z. F., Sacerdoti M., Piiper A., Zeuzem S., Leroux A.E., Biondi R.M. *ACE2, the Receptor that Enables Infection by SARS-CoV-2: Biochemistry, Structure, Allostery and Evaluation of the Potential Development of ACE2 Modulators.*

*ChemMedChem.* **2020** ; 15(18) : 1682-1690. DOI: [10.1002/cmdc.202000368](https://doi.org/10.1002/cmdc.202000368)

[9] Gross L. Z. F., Sacerdoti M., Piiper A., Zeuzem S., Leroux A.E., Biondi R.M. *ACE2, the Receptor that Enables Infection by SARS-CoV-2: Biochemistry, Structure, Allostery and Evaluation of the Potential Development of ACE2 Modulators.*

*ChemMedChem.* **2020** ; 15(18) : 1682-1690. DOI: [10.1002/cmdc.202000368](https://doi.org/10.1002/cmdc.202000368)

[10] Alenina, N., Bader, M. *ACE2 in Brain Physiology and Pathophysiology: Evidence from Transgenic Animal Models.*

*Neurochemical Research* **44**, 1323–1329 (2019).  
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2679-4>

[11] Viana SD, Nunes S, Reis F. *ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities - Role of gut microbiota dysbiosis.*

*Ageing Research Reviews.* **2020**; 62:101123. DOI: [10.1016/j.arr.2020.101123](https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101123).

[12] Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, Castaldo G, Bianco A. *ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2.*

*Lung.* **2020** ;198(6):867-877. DOI: [10.1007/s00408-020-00408-4](https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4)

[13] Arzu Uyar, Alex Dickson *Perturbation of ACE2 structural ensembles by SARS-CoV-2 Spike protein binding*

*bioRxiv* **2021.03.02.433608**; DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.03.02.433608>

[14] Paloma Troyano-Hernández, Roberto Reinoso and África Holguín. *Evolution of SARS-CoV-2 Envelope, Membrane, Nucleocapsid, and Spike Structural Proteins from the Beginning of the Pandemic to September 2020: A Global and Regional Approach by Epidemiological Week.*

*Viruses* **2021**, *13*(2), 243; <https://doi.org/10.3390/v13020243>

[15] Fehr AR, Perlman S. *Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis.*

*Methods Mol Biol.* **2015**; 1282:1-23 DOI: [10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1)

[16] Paloma Troyano-Hernández, Roberto Reinoso and África Holguín *Evolution of SARS-CoV-2 Envelope, Membrane, Nucleocapsid, and Spike Structural Proteins from the Beginning of the Pandemic to September 2020: A Global and Regional Approach by Epidemiological Week.*

*Viruses* **2021**, *13*(2), 243; <https://doi.org/10.3390/v13020243>

[17] Prasun K. Datta, Fengming Liu, Tracy Fischer, Jay Rappaport and Xuebin. *SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy.*

*Theranostics* **2020**; 10(16) : 7448-7464. DOI: [10.7150/thno.48076](https://doi.org/10.7150/thno.48076)

[18] Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM.. *A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury.*

*Nature Medicine*. **2005**; 11(8) : 875-9. DOI: [10.1038/nm1267](https://doi.org/10.1038/nm1267)

[19] Paul Towler, Bart Staker, Sridhar G. Prasad, Saurabh Menon, Jin Tang, Thomas Parsons, Dominic Ryan, Martin Fisher, David Williams, Natalie A. Dales, Michael A. Patane, and Michael W. Pantoliano. *ACE2 X-Ray Structures Reveal a Large Hinge-bending Motion Important for Inhibitor Binding and Catalysis.*

*The Journal of Biological Chemistry*. **2004** ; 279(17) : 17996-8007. DOI: [10.1074/jbc.M311191200](https://doi.org/10.1074/jbc.M311191200)

[20] [21] Gross L. Z. F., Sacerdoti M., Piiper A., Zeuzem S., Leroux A.E., Biondi R.M. *ACE2, the Receptor that Enables Infection by SARS-CoV-2: Biochemistry, Structure, Allostery and Evaluation of the Potential Development of ACE2 Modulators.*

*ChemMedChem*. **2020** ; 15(18) : 1682-1690. DOI: [10.1002/cmdc.202000368](https://doi.org/10.1002/cmdc.202000368)

[22] Paul Towler, Bart Staker, Sridhar G. Prasad, Saurabh Menon, Jin Tang, Thomas Parsons, Dominic Ryan, Martin Fisher, David Williams, Natalie A. Dales, Michael A. Patane, and Michael W. Pantoliano. *ACE2 X-Ray Structures Reveal a Large Hinge-bending Motion Important for Inhibitor Binding and Catalysis.*

[23] Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, Raizada MK, Grant MB, Oudit GY.. *Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2.*

*Circulation Research*. **2020**; 126(10):1456-1474.

DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.120.317015](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317015)

[24] Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. *Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2.*



*Science*. 2020; 367(6485):1444-1448. DOI: [10.1126/science.abb2762](https://doi.org/10.1126/science.abb2762)

[25] Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, Castaldo G, Bianco A. *ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2*.

*Lung*. 2020 ;198(6):867-877. DOI: [10.1007/s00408-020-00408-4](https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4)

[26] [27] Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. *Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2*.

*Science*. 2020; 367(6485):1444-1448. DOI: [10.1126/science.abb2762](https://doi.org/10.1126/science.abb2762)

[28] Datta PK, Liu F, Fischer T, Rappaport J, Qin X. *SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy*.

*Theranostics*. 2020; 10(16):7448-7464. DOI: [10.7150/thno.48076](https://doi.org/10.7150/thno.48076)

[29] Li MY, Li L, Zhang Y, Wang XS. *Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues*.

*Infect Disease Poverty*. 2020 ;9(1):45. DOI: [10.1186/s40249-020-00662-x](https://doi.org/10.1186/s40249-020-00662-x)

[30] Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, Castaldo G, Bianco A. *ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2*.

*Lung*. 2020 ;198(6):867-877. DOI: [10.1007/s00408-020-00408-4](https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4)

[31] Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, Raizada MK, Grant MB, Oudit GY.. *Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2*.

*Circulation Research*. 2020; 126(10):1456-1474.

[32] [33] [34] Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, Castaldo G, Bianco A. *ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2*.

*Lung*. 2020 ;198(6):867-877. DOI: [10.1007/s00408-020-00408-4](https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4)

[35] Fehr, Anthony R, and Stanley Perlman. "Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis." *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) vol. 1282 (2015): 1-23. DOI: [10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1)

[36] Jinsung Yang, Simon J. L. Petitjean, Melanie Koehler, Qingrong Zhang, Andra C. Dumitru, Wenzhang Chen, Sylvie Derclaye, Stéphane P. Vincent, Patrice Soumillion & David Alsteens. *Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor*.

*Nature communications* 11, 4541 2020;  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2100425118>

[37] Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. *Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2.*

*Science.* 2020; 367(6485):1444-1448. DOI: [10.1126/science.abb2762](https://doi.org/10.1126/science.abb2762)

[38] Prasun K. Datta, Fengming Liu, Tracy Fischer, Jay Rappaport and Xuebin. *SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy.*

*Theranostics* 2020; 10(16) : 7448-7464. DOI: [10.7150/thno.48076](https://doi.org/10.7150/thno.48076)

[39] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.*

*Cell.* 2020; 181(2):271-280.e8. DOI: [10.1016/j.cell.2020.02.052](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052).

[34] Davidson AM, Wysocki J, Battle D. *Interaction of SARS-CoV-2 and Other Coronavirus With ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-2 as Their Main Receptor: Therapeutic Implications.*

*Hypertension.* 2020; 76(5):1339-1349. DOI:  
[10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15256](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15256).