



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

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

PURIFICAZIONE E SCREENING DI CONDIZIONI DI
CRISTALLIZZAZIONE DELLA PROTEASI PRINCIPALE DI SARS –
CoV – 2

PURIFICATION AND PRELIMINARY CRYSTALLIZATION
SCREENINGS OF SARS – CoV – 2 MAIN PROTEASE

Tesi di Laurea Magistrale
di: Valentina Camporeale

Relatore
Chiar.mo Prof.
Paolo Mariani

Correlatrice:
Lucia
Silvestrini

Sessione autunnale Ottobre 2021
Anno accademico 2020 - 2021

INDICE

Scopo della tesi	5
CAPITOLO 1: Introduzione.....	7
1.1 M ^{pro}	7
1.2 Quercetina.....	9
1.2.1 Quercetina inibisce SARS – CoV – 2 3CL <i>in vitro</i>	10
1.2.2 Quercetina influisce sulla stabilità termica.....	11
1.2.3 Quercetina interagisce con SARS – CoV – 3CLpro.....	11
1.2.4 Quercetina si lega al sito attivo di SARS – CoV – 3CLpro.....	12
1.3 Cristallizzazione: introduzione.....	15
1.4 Volume del cristallo e qualità.....	16
1.5 Teoria della cristallizzazione.....	17
1.6 Metodo generale: introduzione.....	20
1.7 Modalità e metodologie di cristallizzazione.....	22
1.8 Parametri che influenzano la cristallizzazione delle macromolecole: agenti cristallizzanti.....	25

1.8.1 Altre variabili, chimiche, fisiche e biochimiche.....	26
1.8.2 Additivi.....	27
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI.....	28
2.1 Espressione e purificazione di M ^{pro}	28
2.2 Western Blot.....	30
2.3 Dialisi.....	33
2.4 Determinazione della concentrazione proteica.....	34
2.5 Lisozima e kit di cristallizzazione utilizzati.....	35
2.6 MOSQUITO [®]	36
2.7 Sitting drop attraverso MOSQUITO [®] LCP.....	40
2.8 Materiali per la cristallizzazione.....	41
2.9 Montaggio del cristallo.....	43
2.9.1 Strumenti per il montaggio.....	44
2.10 Cristallografia mediante raggi X.....	49
2.11 Diffrattometro.....	50
CAPITOLO 3: RISULTATI.....	52

3.1 Espressione ricombinante di SARS – CoV – 2 M ^{pro}	52
3.2 Parametri di cristallizzazione utilizzati per M ^{pro}	56
3.3 Settaggio dei primi test di cristallizzazione mediante lisozima...58	
3.4 Screening di condizioni di cristallizzazione per M ^{pro}	60
CAPITOLO 4: DISCUSSIONE.....	70
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....	73
CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA.....	74

SCOPO DELLA TESI

La recente pandemia da COVID-19, purtroppo ancora in corso, ha spinto l'intera comunità scientifica a dedicare enormi sforzi all'identificazione di nuove strategie farmacologiche per bloccare l'infezione da SARS-CoV-2. L'informazione chiave per sviluppare vaccini e farmaci antivirali è legata alla struttura tridimensionale delle biomolecole che sono responsabili dell'infezione e della replicazione virale. Tra le altre molecole virali, la proteasi principale di SARS-CoV-2, nota come M^{pro}, rappresenta un ottimo bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali. Questa proteina infatti è responsabile del taglio delle due grandi poliproteine, la cui sintesi è diretta dal genoma virale durante l'infezione della cellula ospite. La struttura tridimensionale di M^{pro}, anche in presenza di possibili inibitori, può essere studiata mediante tecniche di cristallografia a raggi X. Numerosi lavori sono infatti già stati pubblicati, ma il numero di molecole che potrebbero avere un ruolo attivo come farmaci antivirali cresce continuamente.

Questa tesi si inserisce esattamente su questa tematica, ovvero la valutazione di possibili condizioni di cristallizzazione della proteasi principale di SARS – CoV -2, sia da sola che in presenza di quercetina, che è stata indicata come un possibile inibitore. Lo scopo finale è quello di ottenere cristalli sufficientemente buoni per poter effettuare esperimenti di cristallografia a raggi

X per valutare le modalità di legame della quercetina alla M^{pro} e di poterne comprendere il meccanismo di inibizione.

L'obiettivo di questa tesi di laurea, dunque, è quello di fornire un'analisi accurata di diverse condizioni di cristallizzazione, affinché possano essere ricavate quelle più favorevoli per ottenere cristalli di M^{pro}, per poi adattare per produrre cristalli contenenti anche la quercetina. Per la ricerca delle diverse condizioni è stato fatto sia uno screening di diversi parametri, selezionati a partire dalle informazioni relative alle varie strutture cristallografiche presenti nel PDB e sia l'utilizzo di kit premontati al robot di cristallizzazione presente nel laboratorio MASBIC del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente. I cristalli ottenuti in assenza e in presenza di quercetina (una trentina) sono stati testati al sincrotrone di Amburgo presso la beamline di cristallografia P13 EMBL.

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 M^{pro}

Un nuovo coronavirus, causa della sindrome respiratoria acuta da coronavirus (SARS) 2, o SARS – CoV – 2, ha causato una pandemia mondiale chiamata COVID-19. Il genoma virale è un RNA a singolo filamento ed è molto simile al genoma virale del più vicino SARS coronavirus (SARS-CoV). Alcune proteine virali di SARS-CoV hanno più del 90% di omologia con SARS – CoV – 2, ed è simile a molti altri virus a RNA a singolo filamento. Il filamento genomico codifica per due grandi poliproteine pp1a e pp1ab che vengono scisse in subunità proteiche funzionali grazie all'azione di due proteasi, le proteasi 3CL_M^{pro} o proteasi principale, e la proteasi papain-like, consentendo la produzione di proteine essenziali alla replicazione virale.

3CL M^{pro} taglia le due poliproteine in 11 siti conservati, compresi i siti di autoprocessing all'N-terminale e al C- terminale. L'enzima ha una sequenza di riconoscimento Leu – Gln ↓ Ser – Ala – Gly (↓ segna il sito di taglio).

La struttura della 3CL M^{pro} è composta da 3 domini:

- Dominio I: 8 – 101 residui.
- Dominio II: 102 – 184 residui.

Entrambi sono composti da un foglietto β antiparallelo e sono domini catalitici.

- Dominio III: è composto da 5 α -eliche ed è responsabile della dimerizzazione enzimatica.

Sulla base degli studi su 3CL M^{pro} SARS – CoV, questo dominio ad elica gioca un ruolo essenziale nella funzione della proteasi dato che l'enzima monomero non è cataliticamente attivo. Pertanto, 3CL M^{pro} forma un dimero funzionale attraverso interazioni intermolecolari, soprattutto tra i domini elicoidali.

M^{pro} di SARS-CoV-2 è una cisteina proteasi con una diade catalitica Cys – His. I residui catalitici Cys145 e His41 in 3CL M^{pro} sono situati in una cavità del sito attivo tra i domini I e II.

La struttura cristallina di M^{pro} di SARS – CoV – 2 è stata descritta con una risoluzione di 1.75 Å ed è stato visto che la struttura cristallina è molto simile a quella di SARS – CoV M^{pro}, solo una differenza di 0,53 r.m.s. (rms = root mean square) tra i due enzimi liberi.

SARS – CoV- 2 M^{pro} forma un dimero e l'interfaccia di contatto è principalmente tra il dominio II della molecola A e i residui NH₂-terminali

della B. Il meccanismo di dimerizzazione è un punto fondamentale perché si abbia attività catalitica.

A differenza di SARS – CoV – 2, SARS – CoV M^{pro} dimero ha un'interazione polare tra i due domini III che implica un legame idrogeno di 2.60 Å tra i gruppi idrossilici della catena laterale di Thr²⁸⁵.

In SARS – CoV – 2 M^{pro}, la treonina viene sostituita con alanina e l'isoleucina con leucina. Le sostituzioni di alanina modificano la dinamica dell'enzima e ne aumentano l'attività catalitica consentendo ai due domini III di essere in stretto contatto, sebbene, l'attività catalitica di SARS – CoV – 2 fosse leggermente superiore con simile K_d di dissociazione del dimero (circa 2.5 μM).

L'assoluta dipendenza del virus alla funzione di questa proteasi, insieme all'assenza di una proteasi omologa, rende 3CL M^{pro} un bersaglio attraente per lo sviluppo di nuove molecole in grado di bloccarne la funzione e quindi la replicazione di SARS-CoV-2.

1.2 Quercetina

Partendo da una piccola libreria chimica composta da 150 composti, raccolti da programmi di screening, è stato identificato un composto naturale come inibitore di SARS – CoV - 2 3CL^{pro} con una potenza sufficiente per essere

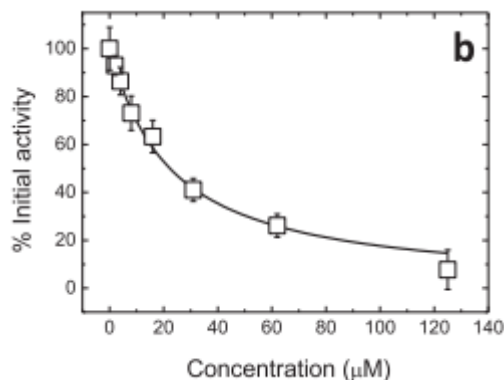
considerato un buon candidato. La quercetina, con note proprietà farmacocinetiche e ADMET (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione e Tossicità), mostra attività antiossidanti, antiallergiche, antinfiammatorie e antiproliferative.

1.2.1 La quercetina inibisce SARS – CoV – 2 3CLpro *in vitro*

Come detto in precedenza, per valutare la potenza *in vitro* dei composti selezionati (inibitori) attraverso lo screening su piccola scala, le loro costanti di inibizione sono stimate dalla curva di inibizione. Quest'ultima è ottenuta misurando l'attività enzimatica, fissando le concentrazioni di enzima e substrato e variando la quantità di composto.

L'analisi di regressione non lineare, ha permesso di stimare una costante di inibizione apparente, K_i di 21 μM per la quercetina, il composto più attivo. Poiché si può presumere che questo composto possa legarsi al sito attivo, quindi, funzionando come un inibitore competitivo con una K_i 7.4 (Fig.1).

Fig.1



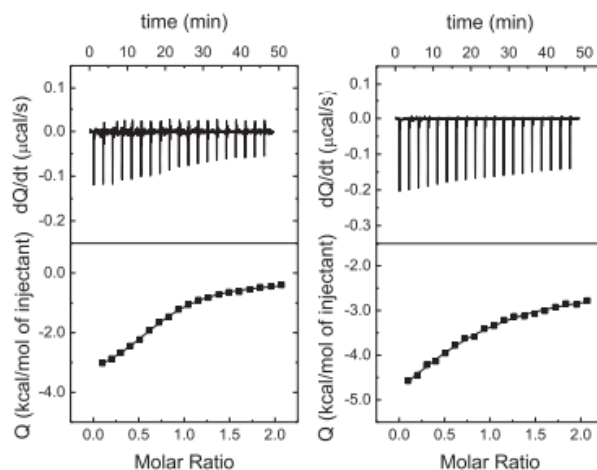
1.2.2 Quercetina influisce sulla stabilità termica

L'interazione preferenziale del ligando con un certo stato conformazionale stabilizza quello stato, determinando un effetto di stabilizzazione globale netto se l'interazione preferenziale avviene con lo stato nativo o una destabilizzazione netta se l'interazione avviene con lo stato non nativo.

Attraverso l'applicazione del Thermal Shift Assay (TSA), che utilizza una sonda fluorescente che riporta la progressione del processo di sviluppo della proteina, è possibile valutare la stabilità termica della proteina misurando la sua T_m apparente in presenza di concentrazioni di un dato composto. In questo caso, quest'ultimo è rappresentato dalla quercetina e si è visto che ha alterato la stabilità termica di 3CLpro causando una destabilizzazione.

1.2.3 Quercetina interagisce con SARS – CoV-2 3CLpro

L'Isothermal Titration Calorimetry (ITC) è considerata il gold standard per la determinazione dell'affinità di legame. Secondo gli esperimenti, la quercetina interagisce con 3CLpro con una costante di dissociazione di 2.7 μM in assenza di NaCl (Fig.2A), e una costante di dissociazione di 10 μM in presenza di NaCl 150 mM (Fig.2B), in accordo con la costante di inibizione stimata attraverso la curva.

Fig.2A**Fig.2B**

1.2.4 Quercetina si lega al sito attivo di SARS – CoV – 2 3CLpro

Il docking molecolare è stato utilizzato per chiarire l'interazione della quercetina con 3CLpro. Sono state considerate due strutture cristallografiche, corrispondenti alla proteina in forma non legata (Fig.4A) e con un inibitore legato nel sito attivo (Fig.4B).

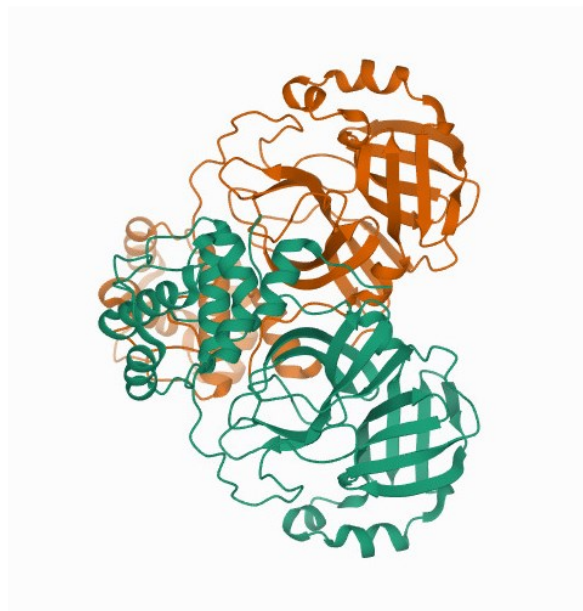


Fig. 3A Rappresenta la proteina in forma non legata

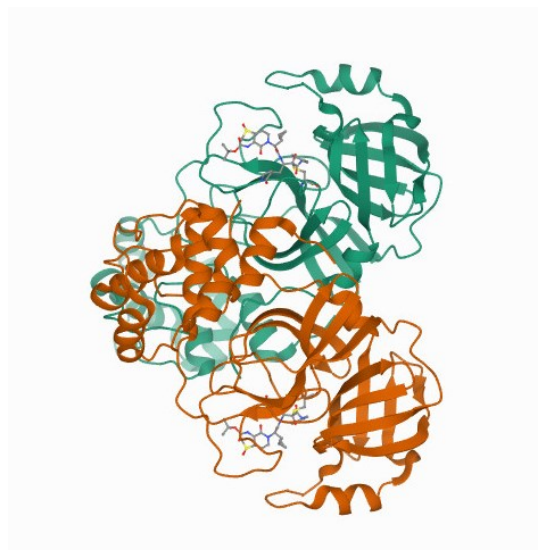


Fig. 3B Rappresenta la proteina in forma legata all'inibitore

In quest'ultimo, le interazioni con un numero di residui proteici contribuiscono a legare la quercetina al sito di legame 3CLpro. Il residuo chiave è Met¹⁶⁵, che può formare sia legami idrogeno che interazioni idrofobiche con la quercetina. Ulteriori legami idrogeno possono essere formati con i due residui Ser¹⁴⁴ e Asn¹⁴². Contributi energetici sono dovuti anche alle interazioni idrofobiche supplementari con Met¹⁴⁹, Phe¹⁴⁰ e Leu¹⁴¹, e all'interazione elettrostatica formata con il residuo polare His¹⁶⁴ e il residuo carico Glu¹⁶⁶.

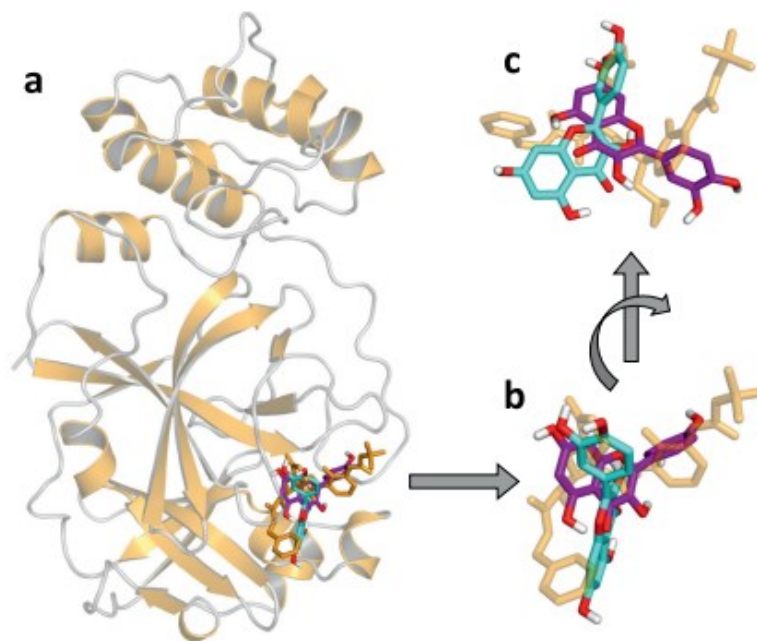


Fig. 4 Docking molecolare per spiegare come la quercetina interagisce con M^{pro}.

1.3 CRISTALLIZZAZIONE: Introduzione

Le macromolecole biologiche sono il macchinario della vita, visualizzare la loro struttura tridimensionale ci aiuta a comprendere appieno la loro funzione. Comprendere la struttura tridimensionale macromolecolare ci aiuta a comprendere dei concetti di processi biologici, cause di malattie, aiuta la progettazione farmaceutica e può portare alla progettazione di macromolecole con nuove proprietà. Per fare tutto ciò possiamo utilizzare la cristallografia.

Un cristallo, secondo una definizione di tipo fisico-chimico definisce è un solido omogeneo in cui le più piccole particelle (atomi, molecole, e/o ioni) che lo compongono sono disposte in un modello ordinato tridimensionale che si ripete indefinitamente nello spazio con schemi geometrici simmetrici che ne determinano la forma e le caratteristiche.

La prima osservazione pubblicata sulla cristallizzazione è legata all'emoglobina, notata da Hunfeld.

Ma, la prima struttura biomolecolare determinata fu la vitamina B-12 (1957) da Dorothy Croofoot Hodgkin che in seguito vinse il premio Nobel per la chimica come risultato del lavoro.

Inizialmente non vi erano regole o metodi prestabiliti su dove iniziare la cristallizzazione di una macromolecola. La cristallizzazione è ancora in

gran parte empirica. Nel 1979 è stato introdotto un metodo di screening dato da numerosi esperimenti che richiedevano un pipettaggio ripetitivo, laborioso e lungo. Ma, alla fine degli anni '80 e all'inizio degli anni '90, lo sviluppo di mezzi automatici per dispensare diverse prove di cristallizzazione, hanno mostrato la prospettiva di uno screening progettato.

1.4 Volume del cristallo e qualità

Un cristallo di alta qualità fornisce informazioni strutturali, sufficientemente dettagliate, in modo così da rispondere alla domanda strutturale che uno si pone. Il primo requisito richiesto è il volume del campione, ed è facilmente quantificabile. A differenza di quest'ultimo, il requisito per l'ordine all'interno del cristallo può essere determinato solo con i metodi di diffrazione (raggi X o neutroni). Cosa determina l'ordine all'interno di un cristallo? Idealmente macromolecole cristalline ben ordinate sarebbero in conformazioni identiche, fino alla posizione della catena laterale su ciascun residuo amminoacidico. Se una singola catena laterale su un residuo amminoacidico sequenzialmente identico mantiene due posizioni stazionarie, abbiamo quello che è definito: disordine statico. Un cristallo viene definito

imperfetto anche se, ad esempio, il 40% di esso è ordinato in un modo e il 60% in un altro.

L'ordine all'interno dei cristalli può essere:

- Ordine a corto raggio (intermolecolare): un buon ordine a corto-raggio in un cristallo è una necessità primaria per il cristallografo. Gli atomi possono esser spostati da vibrazioni termiche, possono avere occupazioni multiple o parziali, la loro posizione può essere incerta e possono esserci delle variazioni nella catena principale o nelle catene laterali e nell'impacchettamento intermolecolare.
- Ordine a lungo raggio (dominio strutturale): l'ordine a lungo raggio è un effetto a lunga scala sull'intero cristallo. Un buon ordine a lungo raggio si traduce rapporto segnale-rumore nei profili di riflessione. L'intensità della riflessione è direttamente proporzionale al volume illuminato.

1.5 Teoria della cristallizzazione

La cristallizzazione è un fenomeno di transizione di fase. La crescita dei cristalli avviene in una soluzione acquosa proteica, quando la soluzione viene portata in sovrasaturazione. La sovrasaturazione si ottiene esaminando la

composizione chimica e le concentrazioni di proteine, precipitanti e additivi e variando alcuni parametri noti che influenzano la solubilità come il pH e la temperatura.

La cristallizzazione è data da due fasi, nucleazione e crescita. La nucleazione è la fase durante la quale si forma un aggregato molecolare di dimensioni critiche, che consente la successiva crescita dei cristalli. Questa fase viene raggiunta da livelli di sovrasaturazione significativamente più elevati rispetto a quelli della crescita dei cristalli. Una volta che il nucleo cristallino si è formato, la crescita dei cristalli segue spontaneamente.

Il processo di cristallizzazione può essere efficacemente illustrato utilizzando un diagramma di fase (Fig.1). Un diagramma di fase indica quale stato (liquido, cristallino, solido amorfo) è stabile in diverse condizioni chimiche e fisiche. Fornisce un mezzo per quantificare l'influenza di parametri come le concentrazioni di proteine, precipitanti, additivi sulla produzione di cristalli. Inoltre, questi diagrammi forniscono un mezzo per poter progettare degli esperimenti di ottimizzazione dei cristalli.

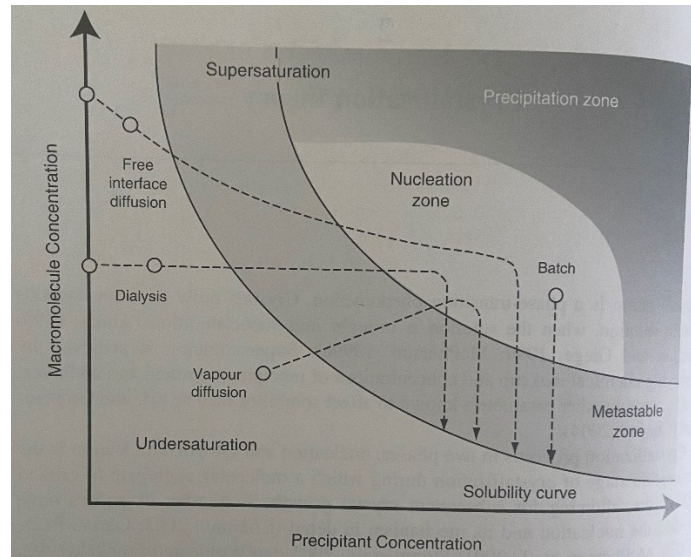


Fig. 1 Esempio di un tipico diagramma di fase di cristallizzazione. La figura illustra in modo schematico 4 aree:

1. Un'area di sovrassaturazione molto elevata in cui la proteina precipiterà.
2. Un'area moderata di sovrassaturazione dove avrà luogo la nucleazione spontanea.
3. Un'area di sovrassaturazione inferiore appena al di sotto della zona di nucleazione, in cui i cristalli sono stabili e possono crescere, ma, non si verificherà un'ulteriore nucleazione (questa è indicata come zona metastabile).
4. Un'area sottosaturata in cui la proteina è completamente disciolta e non cristallizzerà mai.

1.6 Metodo generale: Introduzione

La cristallizzazione delle macromolecole biologiche è stata spesso considerata impraticabile, ma attualmente siamo a conoscenza che segue gli stessi principi della cristallizzazione di piccole molecole. È, quindi, un processo multiparametrico.

I cristalli macromolecolari sono unici. Sono composti in media dal 50% di solvente, anche se questo può variare dal 25 al 90%, a seconda della particolare macromolecola. La proteina o l'acido nucleico occupa il volume restante in modo che l'intero cristallo sia, per molti versi, un gel ordinato con ampi spazi interstiziali attraverso i quali il solvente e altre piccole molecole possono diffondersi liberamente. In proporzione alla massa molecolare, il numero di legami che la molecola forma con i suoi vicini in un cristallo supera di gran lunga i pochi delle macromolecole. Poiché questi legami forniscono interazioni reticolari responsabili dell'integrità dei cristalli, ciò spiega in gran parte la differenza tra i cristalli di piccole molecole e quelli di macromolecole. Dato che, le macromolecole sono labili e perdono facilmente la loro struttura nativa, le uniche condizioni che possono supportare la crescita dei cristalli sono quelle che causano poca o nessuna perturbazione delle loro proprietà molecolari. Pertanto, i cristalli devono crescere in soluzioni a cui sono tolleranti, entro un range di pH, temperatura e forza ionica.

La completa idratazione è essenziale per il mantenimento della struttura, i cristalli di macromolecole sono sempre, anche durante la raccolta dei dati, immerse in acque madri.

Sebbene morfologicamente indistinguibili, esistono importanti differenze tra cristalli di composti a bassa massa molecolare e cristalli di macromolecole. I cristalli di piccole molecole mostrano solide forze reticolari, sono altamente ordinati, sono facili da manipolare, possono essere solitamente esposti all'aria, hanno forti proprietà ottiche e diffrangono i raggi X intensamente. I cristalli delle macromolecole, invece, si frantumano facilmente, si disintegrano se lasciati disidratare, mostrano proprietà ottiche deboli e diffrange male i raggi X. Sono sensibili alla temperatura e subiscono molti danni dopo una prolungata esposizione alle radiazioni. A causa degli spazi relativamente grandi tra le molecole adiacenti e delle forze reticolari di conseguenza deboli, ogni molecola nel cristallo potrebbe non occupare orientamenti e posizioni esattamente equivalenti. Inoltre, a causa della loro complessità strutturale e della dinamica conformazionale, le macromolecole in un particolare cristallo possono presentare lievi variazioni nei loro schemi di piegatura o nelle disposizioni dei gruppi laterali.

A causa dell'elevato contenuto di solvente, le singole macromolecole nei cristalli sono circondate da strati di idratazione che mantengono la loro

struttura praticamente invariata rispetto a quella che si trova disciolta nel solvente.

I cristalli proteici subiscono un processo di nucleazione ad alti livelli di sovrasaturazione. È un alto grado di sovrasaturazione che, in gran parte, distingue la formazione di cristalli di proteine da quelli convenzionali. Cioè, una volta formatosi un nucleo stabile, cresce successivamente in condizioni molto sfavorevoli di eccessiva sovrasaturazione. Lontano dalla zona metastabile, dove potrebbe verificarsi una crescita ordinata, i cristalli accumulano contemporaneamente disordine e difetti che superano quelli osservati per la maggior parte dei cristalli convenzionali.

1.7 Modalità e metodologie di cristallizzazione

Molti metodi possono essere usati per la cristallizzazione delle macromolecole, il cui obiettivo è portare queste ultime ad un appropriato stato di sovrasaturazione. Tra i metodi abbiamo:

Cristallizzazione in batch: i metodi batch sono le tecniche più semplici utilizzate per produrre cristalli di macromolecole. Non richiedono altro che la semplice miscelazione della soluzione macromolecolare con agenti cristallizzanti fino a raggiungere la sovrasaturazione. La cristallizzazione in batch è stata utilizzata per far crescere da campioni di millilitri a

microdroplets di pochi μl , a anche più piccoli nell'intervallo di μl nei capillari.

Un sistema automatizzato per la cristallizzazione e lo screening di microbatch consente di analizzare campioni inferiori a 2 μl . La riproducibilità è garantita perché i campioni vengono dispensati e incubati, prevenendo così l'evaporazione e le variazioni di concentrazione dei componenti nelle microdroplets.

I metodi batch sono adatti per la cristallizzazione basata sulla termonucleazione. Questo può essere fatto facilmente da un termostato ad un altro mantenuto ad una temperatura più alta o più bassa, a seconda che la proteina abbia una solubilità normale o tardiva.

Metodi di dialisi: la dialisi consente una veloce variazione di molti parametri che influenzano la cristallizzazione delle macromolecole. Possono essere utilizzati diversi tipi di sistemi, ma tutti seguono lo stesso principio generale ovvero, la macromolecola è separata da un grande volume mediante una membrana semipermeabile che permette il passaggio di piccole molecole e impedisce quello delle macromolecole. La tecnica più semplice che viene utilizzata è una sacca per dialisi (es. di diametro di circa 2 mm), ma questa di solito richiede almeno 100 μl di soluzione di macromolecola.

Metodi di diffusione di vapore: la cristallizzazione per diffusione di vapore è stata introdotta in biologia per la preparazione di cristalli di tRNA. È adatto per piccoli volumi (fino a 2 μ l o meno) ed è diventato il metodo prescelto per la maggior parte degli sperimentatori. È praticato in una varietà di forme ed è il metodo di scelta per le applicazioni di robotica. In tutte le sue versioni, una goccia contenente la macromolecola da cristallizzare insieme a tampone, precipitante e additivi, viene equilibrata rispetto ad un reservoir contenente una soluzione di precipitante a concentrazione superiore a quella goccia.

L'equilibrio procede per diffusione delle specie volatili fino a quando la pressione di vapore della goccia eguaglia quella del reservoir. Se l'equilibrio avviene per scambio di acqua dalla goccia al reservoir, si determina una diminuzione di volume della goccia per cui la concentrazione di tutti i costituenti della goccia aumentano. La situazione è inversa se la concentrazione iniziale dell'agente cristallizzante nel reservoir è inferiore a quella nella goccia. In questo caso, lo scambio d'acqua avviene dal reservoir alla goccia. La cristallizzazione di diverse molecole è stata ottenuta utilizzando questa procedura "inversa".

L'Hanging drops (goccia pendente) sono spesso distribuite nelle piastre per coltura Linbro. Queste piastre contengono 24 pozzetti con volumi di circa 2 mm e diametro interno di 16 mm. Ogni pozzetto è coperto da un vetrino

coprioggetto di 22 mm di diametro. Le gocce si formano mescolando aliquote 2-10 μl della macromolecola con aliquote del precipitante e componenti aggiuntivi secondo necessità, o meglio, si ottiene miscelando una goccia di proteina al doppio della concentrazione finale desiderata con un volume uguale del reservoir alla concentrazione corretta (per evitare che le gocce cadono nel reservoir, il loro volume finale non deve superare i 25 μl). Quando non si osservano cristalli o precipitati nelle gocce, o non è stata raggiunta una sovrasaturazione sufficiente o, forse, è stata raggiunta solo la zona metastabile. In quest'ultimo caso, può essere sufficiente cambiare la temperatura di pochi gradi per avviare la nucleazione.

Il Sitting drops (gocce pendenti) possono essere posizionate in una varietà di dispositivi diversi. Possono essere utilizzate piastre in polistirene con 24 pozzetti sigillabile singolarmente. Le gocce possono anche essere posizionate su microponti o supportate da colonnine di plastica al centro dei pozzetti. Inoltre, vi sono piastre con 96 pozzetti, sigillate con un nastro sigillante trasparente e, queste, sono convenienti per lo screening di grandi matrici.

1.8 Parametri che influenzano la cristallizzazione delle macromolecole: agenti cristallizzanti

Gli agenti cristallizzanti per le macromolecole si dividono in quattro categorie: sali, solventi organici, polimeri a catena lunga e polimeri a bassa

massa molecolare e composti organici non volatili. Le prime due classi sono caratterizzate da solfato di ammonio ed etanolo; polimeri superiori, come PEG 4000 sono caratteristici del terzo. Nella quarta sono posti composti come MPD e PEG a bassa massa molecolare.

1.8.1 Altre variabili chimiche, fisiche e biochimiche

Molte variabili fisiche, chimiche e biologiche influenzano, in misura maggiore o minore, la cristallizzazione delle macromolecole. Tra i parametri fisici, solo la temperatura e il pH sono stati studiati con attenzione, per pressione o campi magnetici ed elettrici, sono state fatte poche indagini, e non si sa praticamente nulla degli effetti del suono, delle vibrazioni sulla crescita o qualità finale dei cristalli proteici.

La temperatura può essere di grande importanza o può avere poca influenza. In generale, è consigliabile condurre indagini parallele a 4 °C e 20 °C. Anche se non si osservano cristalli a nessuna delle due temperature, le differenze nel comportamento di solubilità di una proteina con diversi agenti cristallizzanti e con varie molecole effettrici, possono dare qualche indicazione sulla probabilità che la temperatura giochi un ruolo importante. Generalmente, la solubilità di una proteina è più sensibile alla temperatura a bassa forza ionica che ad alta.

Un'altra importante variabile è il pH. Non solo la carica netta cambia con il pH (e la distribuzione di carica), ma anche il suo momento di dipolo, la sua conformazione e spesso il suo stato di aggregazione.

Nell'affinare il pH per una crescita ottimale, va ricordato che la differenza tra il precipitato amorfo, microcristalli e cristalli grandi può essere solo un ΔpH non superiore a 0.5.

1.8.2 Additivi

Per ottenere una cristallizzazione ottimale vengono utilizzati, anche, degli additivi. Alcuni additivi utili per le proteine sono quelli che mantengono la loro struttura in un unico stato omogeneo e invariante.

Tali effettori sono alcoli polivalenti, come glicerolo, zuccheri, amminoacidi e metilamminoacidi. Agenti riducenti, come il glutatione o il 2-mercaptoetanololo, che prevengono l'ossidazione, possono essere additivi importanti, così come i composti chelanti, come l'EDTA, che proteggono le proteine dagli ioni dei metalli pesanti o di transizione.

L'inclusione di questi composti può essere desiderabile quando la cristallizzazione richiede un lungo periodo di tempo per raggiungere il completamento.

Capitolo secondo

MATERIALI E METODI

2.1 Espressione e purificazione di M^{pro}

Per l'espressione e la purificazione di M^{pro}, bisogna procedere con la preparazione del terreno di coltura per la crescita delle cellule di *E. Coli* BL21(DE3) pLysS, dove verrà espresso il cDNA di Mpro dal plasmide pGEX-6p-1. Per la trasformazione dal plasmide, verranno prelevati ca. 30 ng e usati per trasformare le cellule di *E. Coli*. Per favorire l'entrata del plasmide attraverso pori transienti sulla membrana si effettua uno shock termico a 42°C per 20-25 sec. Il terreno di coltura è dispensato in una microprovetta contenente le cellule trasformate e il tutto viene incubato a 37 °C per 1h, in agitazione (225 rpm).

Una volta terminato il tempo di incubazione, la sospensione viene seminata con ansa sterile su LB agarizzato contenente Ampicillina (Amp) e Cloramfenicolo (Clo) come antibiotici di selezione.

Dopodiché, possiamo procedere con la preparazione del terreno di coltura, ovvero LB composto da:

- 1% (w/v) tryptone
- 0,5% (w/v) Yeast extract

- 1% (w/v) NaCl

Le singole colonie ottenute verranno coltivate in LB liquido contenente Amp e Clo a 37°C in agitazione per circa 3h. Nel frattempo la crescita viene monitorata mediante lettura della densità ottica OD600 che misura il grado di torbidità (più il terreno è torbido più le cellule sono cresciute).

Una volta che si è constatato che le cellule hanno raggiunto una OD600 compresa tra 0,6 e 0,8, l'espressione proteica verrà indotta mediante aggiunta di IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside) 0,5 mM. L'induzione avviene per 3h a 37°C.

Trascorse le 3 h, la biomassa viene raccolta mediante centrifugazione a 4000-6000 rpm per 15 minuti. L'estratto proteico ottenuto mediante sonicazione della biomassa, dopo la risospensione della stessa nel tampone di lisi (Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, NaCl 300 mM), utile a regolare l'osmolarità e il pH del lisato. Il lisato ottenuto dalla sonicazione verrà nuovamente centrifugato per 1h in modo da separare l'estratto proteico dai detriti cellulari. L'estratto proteico è poi incubato con una resina al nichel per purificare la M^{pro} mediante cromatografia di affinità per 3h a 4°C su piattaforma rotante. M^{pro} possiede difatti una coda di istidine in C-terminale che ne permette l'interazione e, quindi, il legame al nichel stesso. La proteina viene poi staccata dal metallo mediante l'uso di un tampone di eluizione contenente imidazolo.

La purezza della proteina viene controllata mediante separazione elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). Gli eluati con una buona quantità di proteina vengono poi ultracentrifugati al fine di eliminare l'imidazolo che potrebbe far precipitare la proteina di interesse (paragrafo 4.3).

2.2 Western blot

Per dimostrare che la proteina di interesse è quella espressa si possono applicare diverse tecniche. Tra queste, la tecnica di Western blot permette di trasferire le proteine separate su gel di acrilammide su una membrana di nylon che viene poi decorata da anticorpi specifici in grado di rilevare un tag presente solamente nella proteina di interesse. Il segnale chemiluminescente viene attivato mediante un kit che combina l'azione della perossidasi e del luminolo (Clarity Western ECL – Biorad).

Per il trasferimento di proteine da gel a membrana si costruisce un "sandwich" costituito da:

- Cassetta con elettrodo +
- Foglietti: tagliati in base alla grandezza del gel e bagnati nel TB (transfer buffer)
- Membrana: va tenuta in acqua nel momento del montaggio, dopodiché va presa con una pinza da un lato.

- Gel
- Foglietti (sempre bagnati nel TB),
- Cassetta con elettrodo –

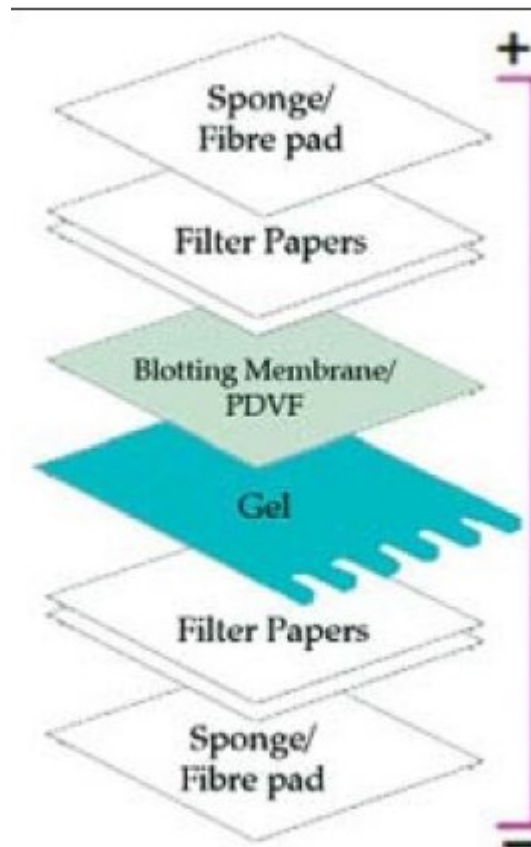


Fig. 1 schema Western Blot.

Una volta preparato il sandwich, questo viene montato nell'apposito strumento (TransBlot Turbo - Biorad) e programmato per il trasferimento.

Una volta trascorso il tempo necessario al trasferimento, la membrana si colora con una soluzione contenente Ponceau S in modo da valutare se il trasferimento è avvenuto correttamente. In caso positivo, la membrana con le proteine

immobilizzate è pronta per essere utilizzata nel processo di ibridazione e detection del segnale di interesse. Dopo essere stata lavata in tampone TBS (Tris-buffer-saline), la membrana viene immersa in una soluzione di bloccaggio contenente BSA 5%, in agitazione per 1h. Questa soluzione serve a bloccare i legami non specifici. Trascorso il tempo di incubazione necessario, la membrana viene lavata e incubata per 16 h a 4°C con l'anticorpo primario in grado di riconoscere la coda di istidine (6xHis Antibody Invitrogen). La soluzione anticorpale viene poi rimossa, la membrana lavata, e una soluzione con anticorpo secondario HRP-coniugato (Anti-m) viene poi aliquotata sulla membrana, che si lascia in incubazione per 2h a temperatura ambiente. Per rilevare il segnale, in questo caso relativo a M^{pro}, viene utilizzata la reazione luminolo-perossidasi. Quindi, bisogna prelevare la membrana, porla in un foglio lucido per il segnale e sulla membrana verrà aliquotata una soluzione contenente luminolo e perossidasi. Il segnale chemiluminescente emesso verrà acquisito mediante Chemidoc (Biorad).



Fig. 2 Chemidoc™ (Biorad).

2.3 Dialisi

Una volta purificata, la soluzione proteica viene sottoposta a dialisi. La dialisi è una tecnica che consente di separare una o più molecole disciolte in una soluzione sulla base delle loro dimensioni. La procedura prevede l'utilizzo di una membrana semipermeabile che permette il passaggio selettivo di molecole. A fronte di ciò, si utilizzano concentratori per ultrafiltrazione che presentano delle membrane con un cut-off specifico. Una volta lavate le membrane, gli eluati ottenuti dalla cromatografia di affinità vengono caricati e centrifugati più volte in modo da scambiare il tampone contenente imidazolo con il nuovo

tampone di conservazione. Ad ogni centrifugazione, la soluzione proteica è concentrata e scambiata con il nuovo tampone (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM). Esperimenti successivi hanno portato all'eliminazione di NaCl poiché alcuni studi hanno dimostrato che questo sale poteva inibire l'attività di M^{pro}.

Dopo l'ultimo lavaggio, verrà prelevato con una Pasteur tutto quello che vi è tra le membrane e posto in un eppendorf, che verrà messa in ghiaccio.

Successivamente, verrà utilizzato un concentratore con membrana il cut-off è di 50 kDa per provare a separare il dimero (ca. 70kDa) di M^{pro} dal monomero (ca. 35kDa) che solitamente raggiungono un equilibrio quando sono in soluzione. L'ultracentrifugazione è stata anche utilizzata per scambiare il buffer della proteina con il buffer che occorre alla proteasi Prescission per il taglio del tag di istidine in C-terminale a M^{pro}.

2.4 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata sia mediante un metodo colorimetrico di Bradford sia mediante una valutazione spettrofotometrica a 280 nm.

Il metodo colorimetrico utilizzato è quello di Bradford (1976) impiegando il kit BioRadProtein assay (BioRad®) secondo le specifiche indicate dalla ditta ed

utilizzando come riferimento la siero – albumina bovina (Sigma®). Per la valutazione spettrofotometrica invece è stata saggiata l'assorbanza dei campioni proteici alla lunghezza d'onda di 280 nm.

2.5 Lisozima e kit di cristallizzazione utilizzati

I kit di cristallizzazione che sono stati utilizzati sono:

JBS Protein Crystallization Starter kit (Jena Bioscience) presenta:

1. 2 piastre SuperClear™ da 24 pozzetti per sospensione a goccia cristallizzazione
2. 1 siringa con 5 ml di grasso al silicone per sigillare le piastre
3. 100 vetrini di copertura per la cristallizzazione
4. 1 vetrino per microscopio
5. 20 ml di soluzione di NaCl al 20% (m/v)
6. 3 ml ciascuno di tampone Na-acetato 250 mM pH 4.0, 4.4, 4.8 e 5.2
7. 200 µl di soluzione di lisozima (20 mg/ml) in acqua,
8. 1 ml di soluzione precipitante per la cristallizzazione in batch (30% (m/v) PEG 5000-MME, 1 M NaCl, 50 mM Na-acetato pH 4.4

JBScreen PACT++ HTS Crystal Screening kit (Jena Bioscience) presenta:
piastra contenente per ogni pozzetto (96) da 1,7 ml una soluzione diversa.

JBScreen JCSG++ HTS Crystal Screening kit (Jena Bioscience) presenta:
piastra contenente per ogni pozzetto (96) da 1,7 circa una soluzione diversa.

2.6 Mosquito®

Per procedere con la cristallizzazione di M^{pro} si è utilizzato un macchinario di nuova generazione, MOSQUITO®. Quest'ultimo rappresenta una soluzione di pipettaggio robotizzato dove si combina la potenza della miniaturizzazione e dell'automazione per ridurre i costi, migliorare la produttività e massimizzare i risultati della ricerca.

Presenta un'esclusiva tecnologia, ovvero è in grado di lavorare nel range dei nanolitri. Lo strumento utilizza micropipette a spostamento positivo per gestire piccoli volumi di liquido da piastra a piastra o trasferimenti intra-piastra.

Nello specifico, tra le diverse tipologie di MOSQUITO® quella che verrà utilizzato è il MOSQUITO® LCP. Offre uno screening, ottimizzazione e scale up automatizzati per le proteine di membrana per potenziare la ricerca sulla cristallizzazione delle proteine.



Fig. 3 MOSQUITO® LCP.

Questo macchinario consente un'automazione accurata e riproducibile per le configurazioni in LCP (fase cubica liquida). L'innovativa tecnologia di spostamento positivo supera i problemi comuni riscontrati con l'erogazione accurata dei materiali LCP, altamente viscosi. La calibrazione automatizzata del posizionamento della siringa e della pipetta garantisce un posizionamento goccia su goccia per un facile imaging automatizzato.

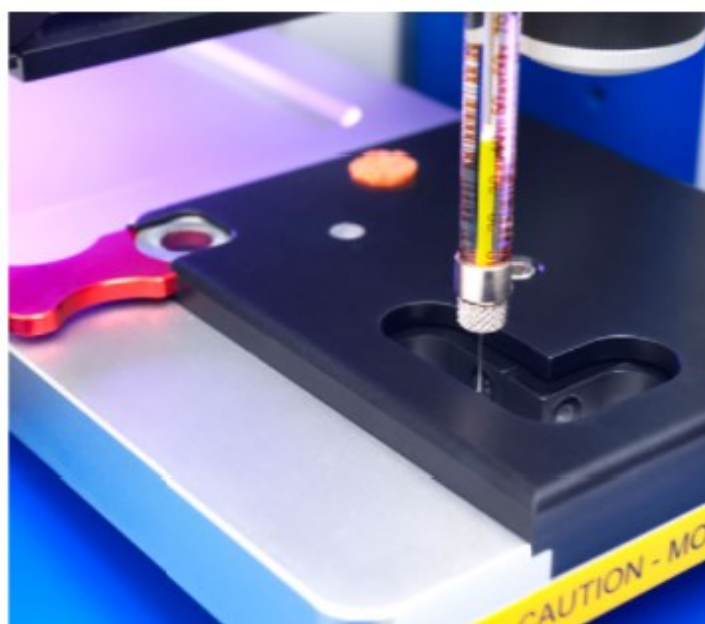


Fig. 4 Siringa utilizzata per la tecnica dell'hanging drop nella cristallizzazione.

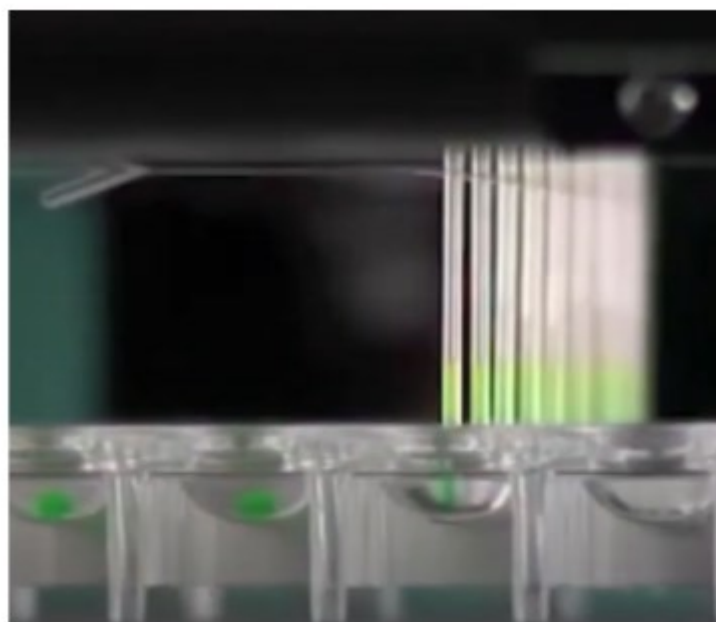


Fig. 5 Puntali monouso utilizzati per la tecnica del sitting drop nella cristallizzazione.

Lo strumento sfrutta un pipettaggio a spostamento positivo utilizzando micropipette monouso con pistoni individuali per fornire un'accuratezza e una precisione eccezionale, indipendentemente dal liquido. Lo strumento presenta una camera di umidità che aumenta la resa qualitativa dell'esperimento riducendo le incongruenze sperimentali causate dalla variazione dell'umidità. Inoltre, questa camera consente una riduzione dell'evaporazione delle gocce fino al 90%.



Fig. 6 Mostra la camera di umidità che consente una riduzione dell'evaporazione delle gocce presenti nei pozzetti delle piastre.

Dettaglio sul mosquito:

Pipetting range	25 nL – 1.2 µl
Primary sbs plate formats	48, 96 e 384
Wight	34 Kg
Technical variants	2 or 4 position desk
Accessories	Camera di umidità, spool cover e miscelatore LCP.
Throughput	2 minuti/ standard 96-well plate 4 minuti/ 96-well LCP plate.

2.7 Sitting drop attraverso MOSQUITO® LCP

La cristallizzazione attraverso il sitting drop è un metodo di cristallografia comunemente usato. Per il sitting drop, il pipettaggio preciso del MOSQUITO garantisce un posizionamento goccia su goccia accurato al centro del pozzetto per un imaging perfettamente automatizzato evitando che le gocce si disperdano nelle pareti dei pozzetti.

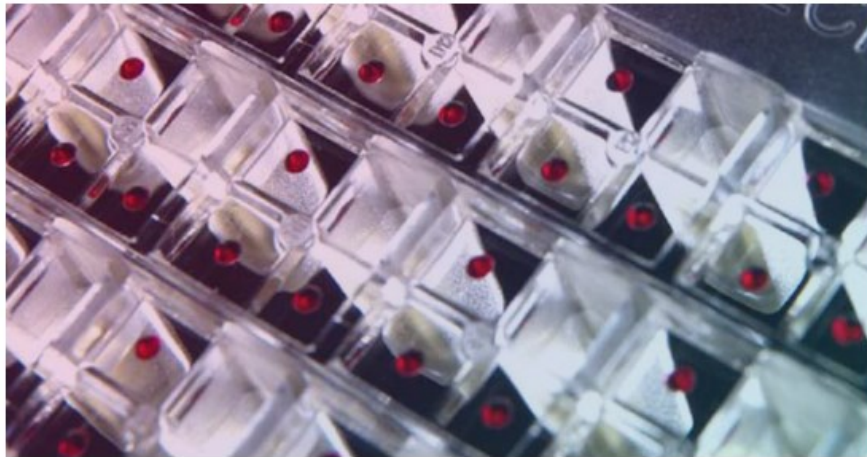


Fig. 7 il mosquito permette il posizionamento goccia su goccia.

2.8 Materiali per la cristallizzazione

PEG: sono polimeri di varia lunghezza utili nella cristallografia. Le specie a bassa massa molecolare sono liquidi oleosi, mentre quelle $M > 1000$ esistono sia come solidi cerosi che come polveri a temperatura ambiente. I PEG condividono caratteristiche con sali che competono per l'acqua e producono disidratazione e con solventi organici che riducono le proprietà dielettriche del mezzo. I PEG hanno anche il vantaggio di essere efficaci con una forza ionica minima e di fornire mezzi a bassa densità di elettroni. La prima caratteristica è importante perché fornisce migliori affinità per il legame con il ligando rispetto ai mezzi ad alta forza ionica. Pertanto, vi è maggiore facilità nell'ottenere derivati di atomi pesanti e nella formazione di complessi proteina – ligando.

I PEG più utili nella cristallografia sono quelli nell'intervallo 2000 – 6000. Questo parametro, però, deve essere ottimizzato con mezzi empirici. Un vantaggio del PEG rispetto ad altri agenti è che la maggior parte delle proteine cristallizza in un intervallo piuttosto ristretto di concentrazione di PEG (circa 4 – 18%).

Poiché il PEG non è volatile, questo agente deve essere utilizzato come il sale ed equilibrato con la proteina mediante dialisi, miscelazione lenta e diffusione del vapore. Quest'ultimo approccio si è rivelato il più popolare. La cristallizzazione delle proteine con PEG si è dimostrato più efficace quando la forza ionica è bassa e più difficile quando è alta.

Il PEG può essere utilizzato nell'intero intervallo di pH e in un ampio intervallo di temperatura.

DMSO (dimetilsolfossido): è un composto organico appartenente alla categoria dei solfossidi. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore e inodore particolarmente igroscopico. È un solvente aprotico, miscibile con una vasta gamma di solventi.

MES: è uno dei tamponi di Goods, i tamponi biologici più utilizzati. Il MES è un acido amminosolfonico zwitterionico N-sostituito con un anello morfolinico. Non forma complessi con la maggior parte dei metalli utilizzati

negli studi biologici. È facilmente solubile in acqua e ha una liposolubilità minima, rendendolo impermeabile alle membrane.

Buffer protein: Tris HCl, NaCl e glicerolo.

2.9 Montaggio del cristallo

Una volta che i cristalli sono stati ottenuti e caratterizzati visivamente, la procedura successiva è il trasferimento di un cristallo selezionato su un dispositivo di montaggio appropriato in modo che il cristallo possa essere caratterizzato mediante raggi X. I cristalli macromolecolari sono generalmente ottenuti da e conservati in una soluzione contenente il precipitante o i precipitanti e altre sostanze come proteine non cristallizzate o altre macromolecole. Lo scopo è montare il cristallo in modo tale che non venga danneggiato da rotture, essiccamenti, dissolvimenti etc. durante questa operazione.

In generale, la parte più difficile del montaggio dei cristalli macromolecolari è il trasferimento del cristallo da una soluzione di contenimento ad un supporto adatto.

2.9.1 Strumenti per il montaggio dei cristalli

Al fine di facilitare il processo di montaggio di cristalli macromolecolari per esperimenti di diffrazione dei raggi X, è necessario disporre degli strumenti appropriati per il compito. Tra gli strumenti utilizzati, abbiamo:

Stereomicroscopio modulare OPTECH GZ 808 è l'attrezzatura più importante per esaminare e montare i cristalli. Deve avere capacità di zoom variabili e dovrebbe esserci una distanza sufficiente (ad esempio 5-10 cm) tra l'obiettivo del microscopio e il tavolino del microscopio per ospitare l'attrezzatura e consentire la manipolazione dei cristalli e delle soluzioni. Un ingrandimento compreso tra 10 e 40 è probabilmente il migliore in pratica. È anche importante assicurarsi che la sorgente luminosa del microscopio non sia così intensa da riscaldare il tavolino del microscopio, danneggiando così i cristalli macromolecolari. Se il microscopio è dotato di polarizzatori incrociati, è possibile valutare la qualità dei cristalli.



Fig. 8 STEREO-MICROSCOPIO OPTECH GZ 808.

Magnetic Cryo Wand: è stata progettata per essere utilizzata, ad esempio, con i Crystalcap SPINE durante il trasferimento di questi ultimi dalla fiala alla testa del goniometro e viceversa. Presenta un alloggiamento in plastica che racchiude uno stantuffo a molla che, quando viene premuto, allontana una piattaforma in acciaio non magnetico dal magnete alloggiato all'estremità della bacchetta. Ciò fa sì che il CrystalCap in acciaio si stacchi dalla bacchetta e

venga facilmente inserito nella fiala. Quando la piattaforma è retratta, la bacchetta tiene saldamente il CrystalCap Magnetic in acciaio.



Fig. 9 Magnetic Cryo Wand.

Loop: presentano anelli di nylon di diverso diametro. Questi loop sono legati a tubi di acciaio inossidabile e vengono utilizzati per montare, congelare e fissare il cristallo durante le procedure criocristalline e la raccolta dei dati a raggi X. Gli anelli di nylon mostrano un a diffrazione minima, sono sottili e forti. Il loop è parte del CrystalCap.

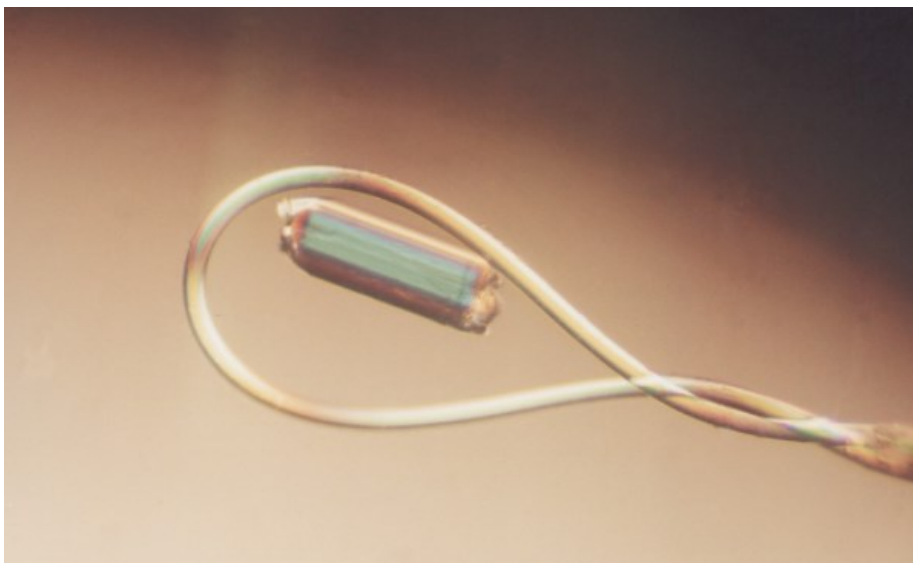


Fig. 10 Loop utilizzato per raccogliere il cristallo da studiare.

Vial per scambiatori di campioni EMBL/ESRF: fiale per raccogliere il loop contenente il cristallo.



Fig. 11 Vial.

Montaggio: l'intera procedura di montaggio avviene in azoto liquido, ovvero lo SPINE progettato per la conservazione e il trasporto locale di campioni criomontati e il trasferimento di campioni allo scambiatore di campioni robotizzato EMBL/ESRF per l'uso presso l'ESRF con scambiatori di campioni SC3 e Irelec.



Fig. 12 Spine.

Dopodiché, la piastra viene posta sul tavolino del microscopio e solo all'altezza del pozzetto di nostro interesse viene fatta un'incisione sul film in modo così da prelevare il cristallo. Una volta prelevato va messo nella vial che è tenuta nello SPINE in azoto liquido.

2.10 *Cristallografia mediante raggi X*

La diffrazione mediante raggi X è il metodo ideale per comprendere le strutture dei materiali cristallini su scala atomica. Essa permette quindi di stabilire le relazioni tra struttura e proprietà chimico-fisiche del materiale investigato, oppure permette l'investigazione delle relazioni tra struttura cristallina e condizioni termodinamiche nelle quali esso si forma.

L'analisi strutturale dei cristalli si basa su fenomeni di diffrazione causata dall'interazione della materia con radiazioni di diversa natura aventi λ paragonabili alle distanze interatomiche presenti nel cristallo (0.1 – 2.0 Å)

L'impiego dei raggi X nell'analisi dei materiali è dovuto in massima parte alla loro elevata penetrazione in molti materiali.

La cristallografia sfrutta la diffrazione dei raggi X dai cristalli per calcolarne le mappe di densità elettronica le quali, in pratica sono immagini della distribuzione dei diversi atomi del cristallo all'interno del reticolo cristallino. Attraverso ciò, è possibile non solo misurare le distanze fra piani reticolari, ma localizzare la posizione degli ioni, degli atomi, ecc. e quindi determinare le strutture.

2.11 *Diffrattometro*

Il diffrattometro è composto da un tubo a raggi X, che fornisce la radiazione, la quale viene monocromatizzata e collimata, da un goniometro atto a posizionare cristallo e rivelatore in condizioni particolari che consentono la diffrazione, da un rivelatore di radiazione X, che consente la misurazione delle intensità diffratte.

Il cristallo viene posto al centro del goniometro in modo da essere colpito dalla radiazione incidente. Esso viene posizionato su una testina goniometrica, che consente di muovere il cristallo in precise posizioni senza farlo uscire dal fascio incidente.

Il rivelatore è una parte essenziale in quanto l'esperimento di diffrazione necessita di un'accurata misura dell'intensità diffratta dal cristallo. La radiazione X viene assorbita prima da uno schermo che "traduce il segnale X in un segnale di luce e poi passa al rivelatore a CCD, da cui è possibile leggere l'immagine digitalizzata della diffrazione.

La sorgente dei raggi X è costituito da un tubo a raggi X. Un fascio di elettroni (ottenuti da un filamento, con correnti dell'ordine di alcune decine di milliAmpere) viene accelerato ad elevato voltaggio (ordine di decine di

kilovolts) contro un anodo metallico. L'energia viene principalmente dissipata come calore e in parte minore utilizzata per l'emissione di radiazioni X.

Come funziona un diffrattometro? Un fascio di raggi X largo circa 1 mm viene proiettato su un cristallo di dimensioni dell'ordine di qualche decina di micron. Il fascio viene diffratto dal cristallo, cioè viene deviato in tanti raggi la cui direzione dipende dalla struttura intima del cristallo. La posizione e l'intensità dei raggi diffratti è misurata con un detector sensibile ai raggi X, come una lastra fotografica.

L'elaborazione matematica di questi dati permette di ricostruire l'immagine della struttura cristallina.

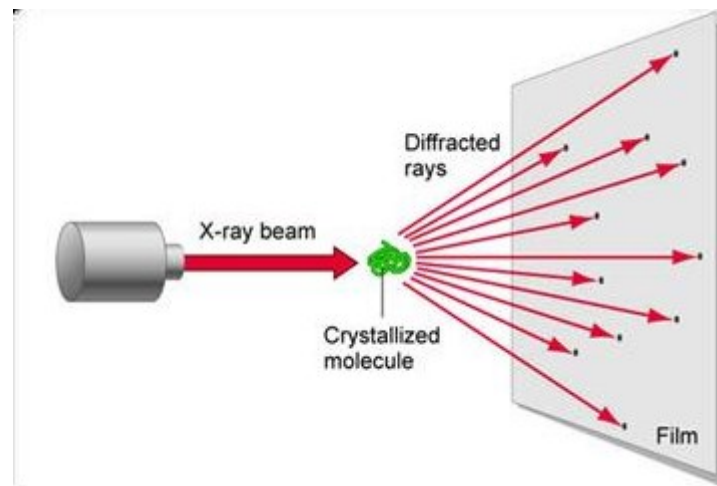


Fig. 13 Schema di come funziona un diffrattometro.

Capitolo terzo

RISULTATI

3.1 Espressione ricombinante di SARS-CoV-2 Mpro

Il ceppo di *E. coli* BL21DE3pLys contenente il plasmide pGEX-6p-1-Mpro è stato coltivato in LB contenente Ampicillina e cloramfenicolo fino al raggiungimento di una densità ottica OD600 compresa tra 0.6 e 0.8. Una volta raggiunto questo valore, le cellule sono state indotte con IPTG 0,5 mM e lasciate in coltura per 3h a 37°C, 180 rpm. Gli estratti totali, ottenuti mediante sonicazione e centrifugazione, sono stati passati in colonna cromatografica per purificare M^{pro} mediante l'interazione tra il nichel della resina e il tag di istidine posizionato in C-terminale alla proteina stessa. Il risultato ottenuto dall'espressione di M^{pro} è:

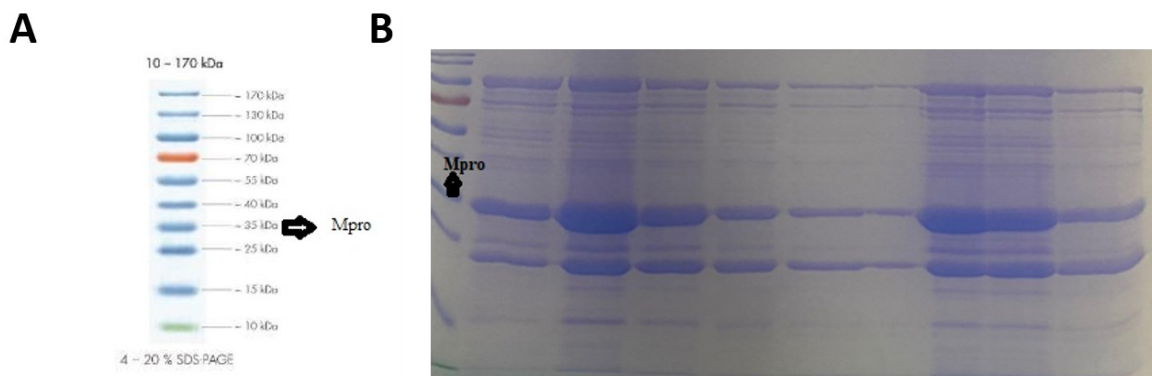


Fig. 1 Espressione ricombinante di SARS-CoV-2 M^{pro} in *E. coli* BL21DE3pLysS. (A) peqGOLD protein marker IV è utilizzato come scala di riferimento della taglia proteica nel gel di poliacrilammide. (B) Overespressione di M^{pro} da *E. coli* dopo cromatografia di affinità. M^{pro} (ca. 35kDa) è indicata dalla freccia.

Dopo due step successivi di purificazione mediante cromatografia di affinità, il preparato proteico è stato analizzato mediante Western blot (Fig. 2), in modo da dimostrare che la proteina ottenuta è riconosciuta in modo specifico da un anticorpo capace di legare la coda di polistidine presente in M^{pro}. In figura 2, è indicata la banda rilevata corrispondente ad M^{pro}.

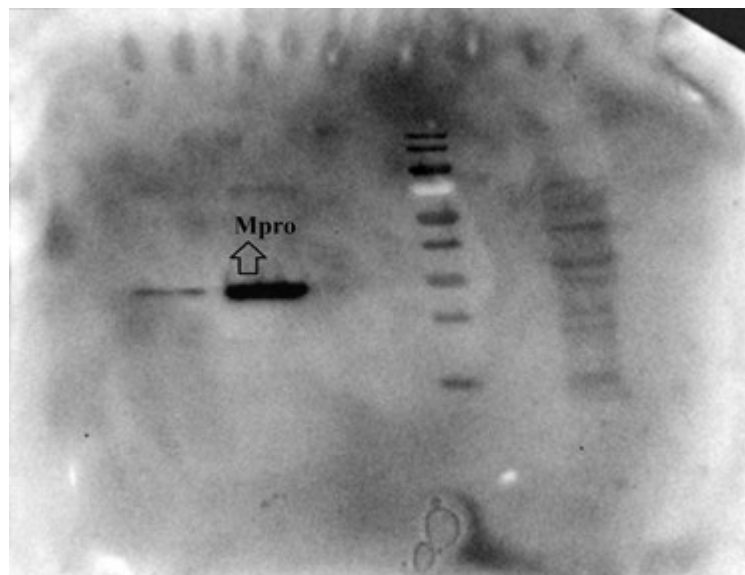


Fig.2 Western blot per il rilevamento di M^{pro} prodotta per via ricombinante.

La banda indicata corrisponde alla proteina M^{pro} (ca.35 kDa)

Una volta appurata l'espressione di M^{pro}, si procede con la concentrazione della proteina. Si è prima utilizzato un concentratore per ultrafiltrazione con un cut-off pari a 30 kDa, dove appunto vi era l'eluato ottenuto dalla purificazione ed è stato aggiunto lo storage buffer per quattro lavaggi in centrifuga per 15 minuti.

Una volta terminata la centrifugazione si va a raccogliere tutto quello che è al di sopra dei 30 kDa, poiché come detto in precedenza M^{pro} ha un peso molecolare di 35 kDa.

Successivamente, è stata presa una eppendorf ed è stato aggiunto:

- 1 μ l di M^{pro}
- 8 μ l di H₂O (acqua di II livello)
- 3 μ l di Sample Buffer 4X

La proteina viene denaturata mediante bollitura a 98°C per 2 min. Il campione viene separato mediante corsa elettroforetica in SDS-PAGE.

Dopodiché, è stata utilizzata una falcon con membrana, ma questa volta con un cut – off pari a 50 kDa, perché, come abbiamo visto in precedenza M^{pro} può presentarsi sia in forma monomerica e sia in forma dimerica (70 kDa). Ed è stata aliquotata sia quella al di sopra di 50 kDa che quella al di sotto.

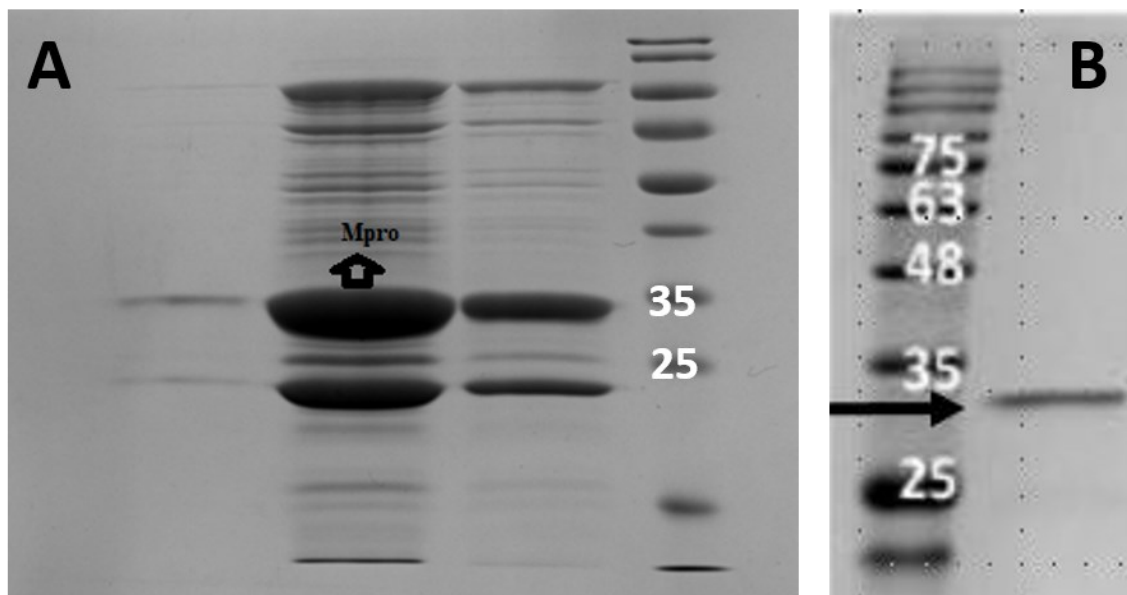


Fig.3 (A) la banda più grande rappresenta M^{pro} ottenuta dall'utilizzo di un concentratore la cui membrana ha un cut-off di 50 kDa. **(B)** M^{pro} ottenuta durante il processo finale di purificazione attraverso doppia cromatografia di affinità.

La quantità finale di M^{pro} ottenuta dopo la concentrazione è di 6mg/ml. La proteina è stata quantificata sia a 280 nm che mediante metodo di Bradford.

3.2 Parametri di cristallizzazione utilizzati per M^{pro}

Una volta ottenuta la proteina si può passare alla seconda fase di cristallizzazione. Per prima cosa, si è ricercato attraverso PDB (Protein Data Bank) diversi parametri riguardanti M^{pro} (Fig.4).

Crystallization Experiments					
Codice PDB	ID	Method	Temperature	Details	pH
6WTT		1 Vapor diffusion, hanging drop	298	15% PEG 2k, 10% 1,6-HexD, 0,2 M NaCl	
6M2N		1 Vapor diffusion, hanging drop	293	100 mM MES, pH 5.8, 2% PEG6000, 3% DMSO, 1mM DTT	
6XMK		1 Vapor diffusion	293	20% (w/v) PEG6000, 100 mM Tris, 200 mM NaCl	8
7K3T		1 Vapor diffusion, sitting drop	298	20% PEG3350, 0,1 M MES pH 6.5, 5% DMSO	06:05
7BUY		1 Vapor diffusion, hanging drop	293,15	5% PEG6000, 3% DMSO, 0,1M MES buffer (pH 6,0), protein concentration 5 mg/ml	5,6
7D3I		1 Vapor diffusion, sitting drop	291	0.1% w/v n-octyl-beta-D-glucoside, 0.1 M sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5, 22% w/v PEG3,350	
6WTK		1 Vapor diffusion, sitting drop	295	0.2 M sodium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.0, 20% w/v PEG6000	7

Fig.4 Strutture di SARS-CoV-2 M^{pro} complessata con inibitori, depositate in PDB. Sono indicate le rispettive condizioni di cristallizzazione e le temperature (gradi Kelvin).

La figura 4 mostra una serie di strutture risolte di SARS-CoV-2 M^{pro} depositate in Protein Data Bank (pdb). Nella tabella sono indicate le condizioni di cristallizzazione, la temperatura e il metodo utilizzato. Di seguito una spiegazione dettagliata partendo dalla prima colonna da sinistra di ciò che è riportato:

- **6WTT:** Crystals Structure of the SARS-CoV-2 (COVID-19) main protease with inhibitor GC-376.
- **6M2N:** SARS-CoV-2 3CL protease (3CL pro) in complex with a novel inhibitor.
- **6XMK:** 1.70 Å resolution structure of SARS-CoV-2 3CL protease in complex with inhibitor 7j.
- **7K3T:** Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease (3CLpro/Mpro) in the Apo Form at 1.2 Å Resolution.
- **7BUY:** The crystal structure of COVID-19 main protease in complex with carmofur.
- **7D3I:** Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with MI-23.
- **6WTK:** Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication

Nelle colonne successive a quest'ultima, vi è il metodo, pH, temperatura e altri parametri relativi ad ogni codice, e quindi a M^{pro}.

Dopo aver preso visione dei diversi parametri, la scelta del metodo di cristallizzazione è stata proiettata sul sitting drop (vedi cap. Materiali e metodi 4.7).

3.3 Settaggio dei primi test di cristallizzazione mediante lisozima

Come prima prova di cristallizzazione, la proteina più conveniente con cui iniziare è il lisozima dell'albumine dell'uovo di gallina. Si è usato il kit “**JBS Protein Crystallization Starter Kit**” (Jena Biosciences). Il kit contiene tutti i componenti necessari per esplorare la nucleazione e la crescita dei cristalli del lisozima utilizzando il metodo di diffusione di vapore con il sitting drop. Il kit permette di testare diversi valori di pH e di concentrazione del precipitante (NaCl).

L'esperimento è impostato in un'organizzazione a griglia (Fig. 5) per consentire la visualizzazione diretta degli effetti delle due variabili sulla nucleazione, sulla morfologia del cristallo (forma) e sulla dimensione finale del cristallo.

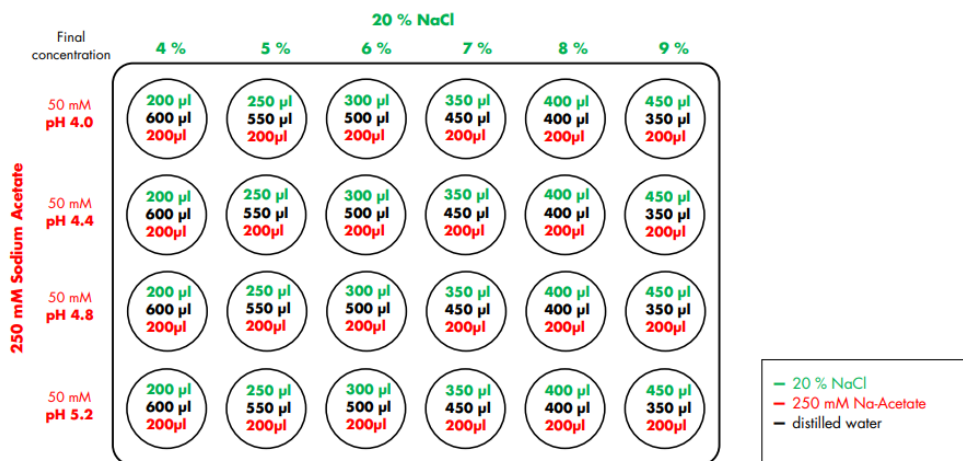


Fig.5

Per la preparazione della piastra di cristallizzazione da 96 condizioni viene utilizzato il MOSQUITO[®] per applicare la tecnica del sitting drop e, quindi, viene inserita la piastra contenente 100 µl di buffer in ogni pozzetto e un'ulteriore piastra dove nel pozzetto verranno aliquotati 500 nL. Dopodiché nella strip (8-well micro-reservoir strip) del MOSQUITO[®] vengono aliquotati 5 µl di lisozima, e da quest'ultima il macchinario andrà ad aliquotare 500 nL di proteina in ogni pozzetto contenente il un tampone per una condizione specifica di cristallizzazione.

Una volta terminato il procedimento, la piastra viene sigillata da un film plastificato per evitare l'evaporazione dei costituenti e l'essiccazione della goccia, e viene posta in un frigorifero a 20-22°C (Fig.6).

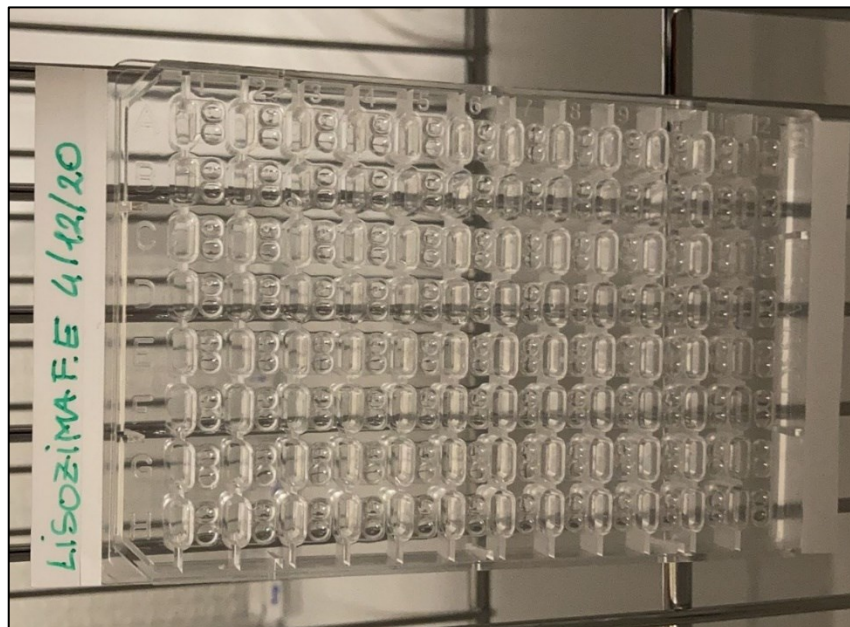


Fig.6 Piastra di lisozima a 20-22h per 20h.

Dopo 20h è possibile vedere il risultato e quello riportato in Fig.7 è quello che si è ottenuto:

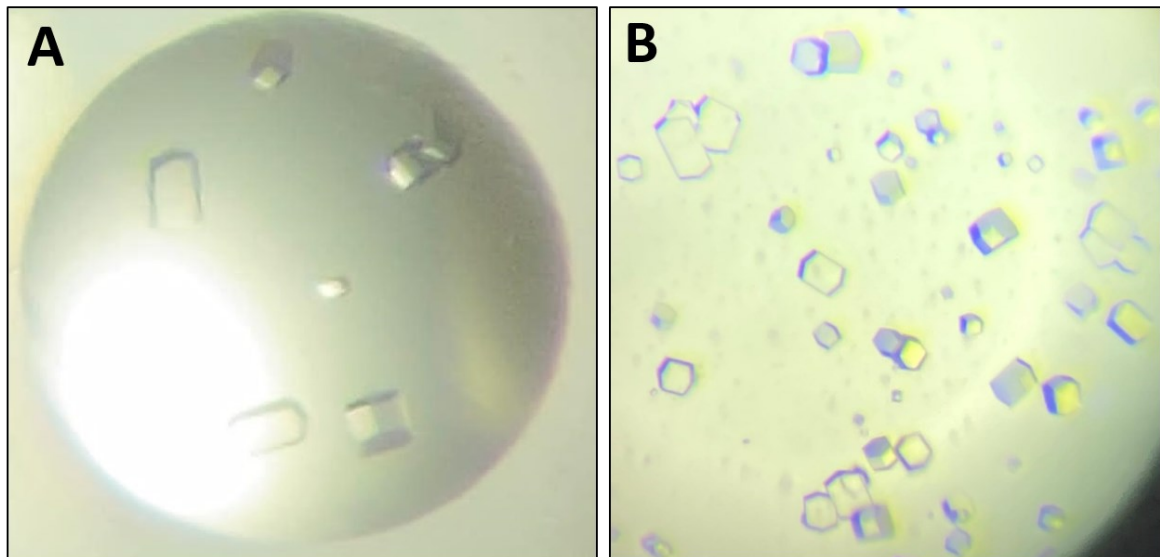


Fig.7 (A) Cristalli di lisozima. **(B)** Cristalli di lisozima ottenuto a livello del pozzetto B5.

3.4 Screening di condizioni di cristallizzazione per M^{pro}

Una volta calibrato il processo di distribuzione robotizzata del campione proteico e individuate le possibili condizioni di cristallizzazione da testare riportate in figura nelle quali ho ottenuto questo risultato, è stata stilata una griglia di varie componenti, a diverse condizioni, che verranno aggiunte al buffer protein (Tris HCl 20 mM, NaCl 100 mM, glicerolo 20%).

La tabella è la seguente:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PEG2000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
B	PEG4000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
C	PEG6000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
D	PEG4000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
E	PEG4000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
F	PEG4000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
G	PEG6000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
H	PEG6000 (%)	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25
	5% DMSO, 0.1 M MES	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
	pH	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Fig. 8. Condizioni iniziali per testare la cristallizzazione di M^{pro} .

Inizialmente è stato preparato il tampone base per M^{pro} . Ad esso sono state aggiunte PEG di diverso peso, MES e DMSO. Le soluzioni così ottenute sono state inizialmente aliquotate in una piastra da 96 pozzetti corrispondenti a 96 diverse condizioni da cui il Mosquito potesse prelevare la quantità necessaria da dispensare nelle singole gocce dell'ambiente di formazione dei cristalli.

Dopodiché, sono state calcolate in riferimento alla tabella le diverse concentrazioni di PEG (2000-4000-6000), MES e DMSO, dove questi ultimi due elementi avevano una quantità fissa in ogni pozzetto. Sono stati inoltre saggiati 3 diversi valori di pH (6,5/ 7 / 7,5), misurati sul buffer base di M^{pro}

(Fig.8). Come possiamo notare dalla figura 8, all'aumentare della concentrazione del PEG, diminuisce la concentrazione di buffer protein.

Ad esempio, nel pozzetto C abbiamo:

	PEG	DMSO	MES	Totale	Totale + buffer
1C	400 µl	100 µl	400 µl	900 µl	1100 µl
2C	480 µl	100 µl	400 µl	980 µl	1020 µl
3C	560 µl	100 µl	400 µl	1060 µl	940 µl
4C	600 µl	100 µl	400 µl	1100 µl	900 µl
5C	640 µl	100 µl	400 µl	1140 µl	860 µl
6C	680 µl	100 µl	400 µl	1180 µl	820 µl
7C	722 µl	100 µl	400 µl	1222 µl	778 µl
8C	760 µl	100 µl	400 µl	1260 µl	740 µl
9C	800 µl	100 µl	400 µl	1300 µl	700 µl
10C	840 µl	100 µl	400 µl	1340 µl	660 µl
11C	922 µl	100 µl	400 µl	1422 µl	578 µl
12C	1000 µl	100 µl	400 µl	1500 µl	500 µl

Quindi come possiamo vedere, il volume finale è di 2 ml corrispondente con quello del pozzetto.

Quindi una volta preparati i buffer con diverse condizioni, verranno preparati i campioni di M^{pro} e quercetina.

Per quanto riguarda, la proteina sarà utilizzata ad una concentrazione pari a 70 µl. Invece, la quercetina prima dell'utilizzo verrà incubata con M^{pro}, ovvero 70 µl e 3, di quercetina (stock 100 mM). Inoltre, sono state utilizzati dei kit di buffer:

JBScreen PACT++ HTS Crystal Screening kit	Store at 8-10°C 96 solutions (1,7 ml each)
JBScreen JCSG++ HTS Crystal Screening kit	Store at 8-10°C 96 solutions (1,7 ml each)

Successivamente per la preparazione delle piastre con il MOSQUITO® con tecnica del sitting drop le quantità che si sono aliquotate sono:

Piastra nativa	Nella strip sono stati aggiungere circa 5µl e 100 µl.	La goccia finale è data da 500 nL di M ^{pro} e 500 nL di buffer proteico
Piastra: M ^{pro} + quercetina 1:10	Nella strip aggiungere 5 µl di M ^{pro} + quercetina e 100 µl di buffer proteico	La goccia finale è data da 500 nL di M ^{pro} + quercetina e 500 nL di buffer proteico.

Piastra: M ^{pro} + quercetina 1:25	Nella strip aggiungere circa 5 µl + quercetina e 100 µl di buffer proteico	La goccia finale è data da 500 nL di M ^{pro} + quercetina e 500 nL di buffer proteico.
Piastra: M ^{pro} + JBScreen PACT++ HTS	Nella strip aggiungere circa 5 µl e 100 µl di buffer proteico	La goccia finale è data da 500 nL di M ^{pro} e 500 nL di buffer proteico.
Piastra: M ^{pro} + JBScreen JCSG++ HTS	Nella strip aggiungere circa 5 µl e 100 µl di buffer proteico.	La goccia finale è data da 500 nL di M ^{pro} e 500 nL di buffer proteico.
Piastra: M ^{pro} + Quercetina + JBScreen PACT++ HTS	Nella strip aggiungere circa 5 µl + quercetina e 100 µl di buffer proteico.	La goccia finale è data da 500 nL di M ^{pro} +quercetina e 500 nL di buffer proteico.

Piastra: M ^{pro} + quercetina + JBScreen JCSG++ HTS	Nella strip aggiungere circa 5 μ l + quercetina e 100 μ l di buffer proteico.	La goccia finale è data da 500 nL di M ^{pro} +quercetina e 500 nL di buffer proteico.
--	---	--

Una volta preparate le quattro piastre, vanno sigillate con un film e poste nel frigorifero a 4°C.

Dopo circa 24h alcuni dei risultati visti in laboratorio sono:

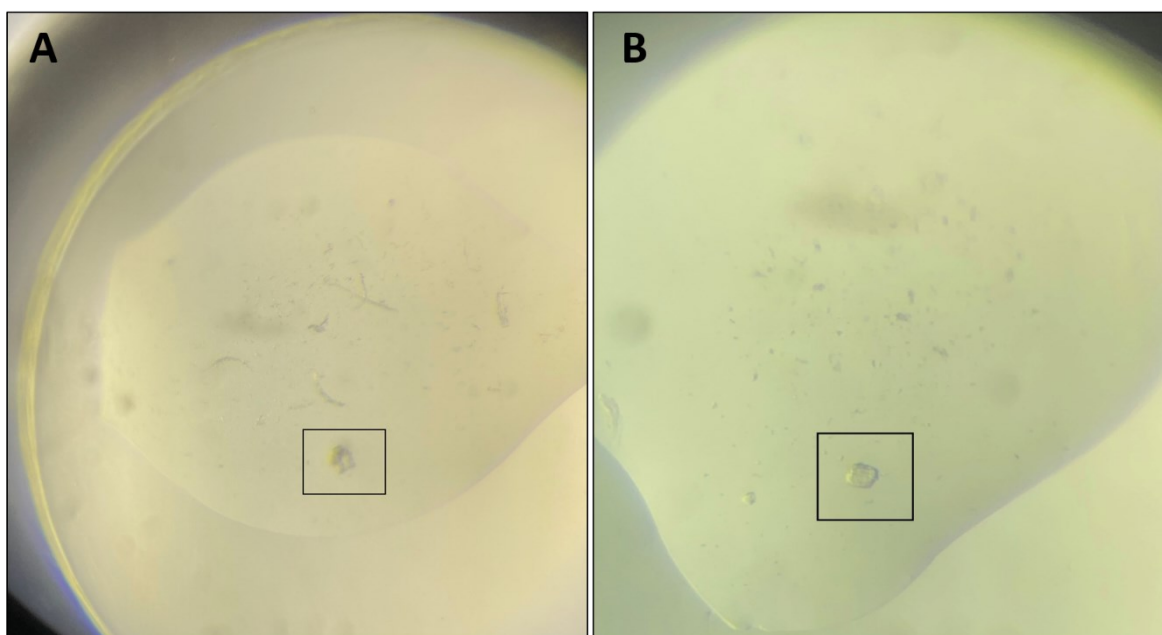


Fig.8 (A) e (B) Possibili cristalli di M^{pro} derivanti dalla piastra nativa. Nella Fig. A possibile cristallo dato dalle condizioni nella Fig. 8 di D4 e in B dalle condizioni date dalla Fig.8 di G7.

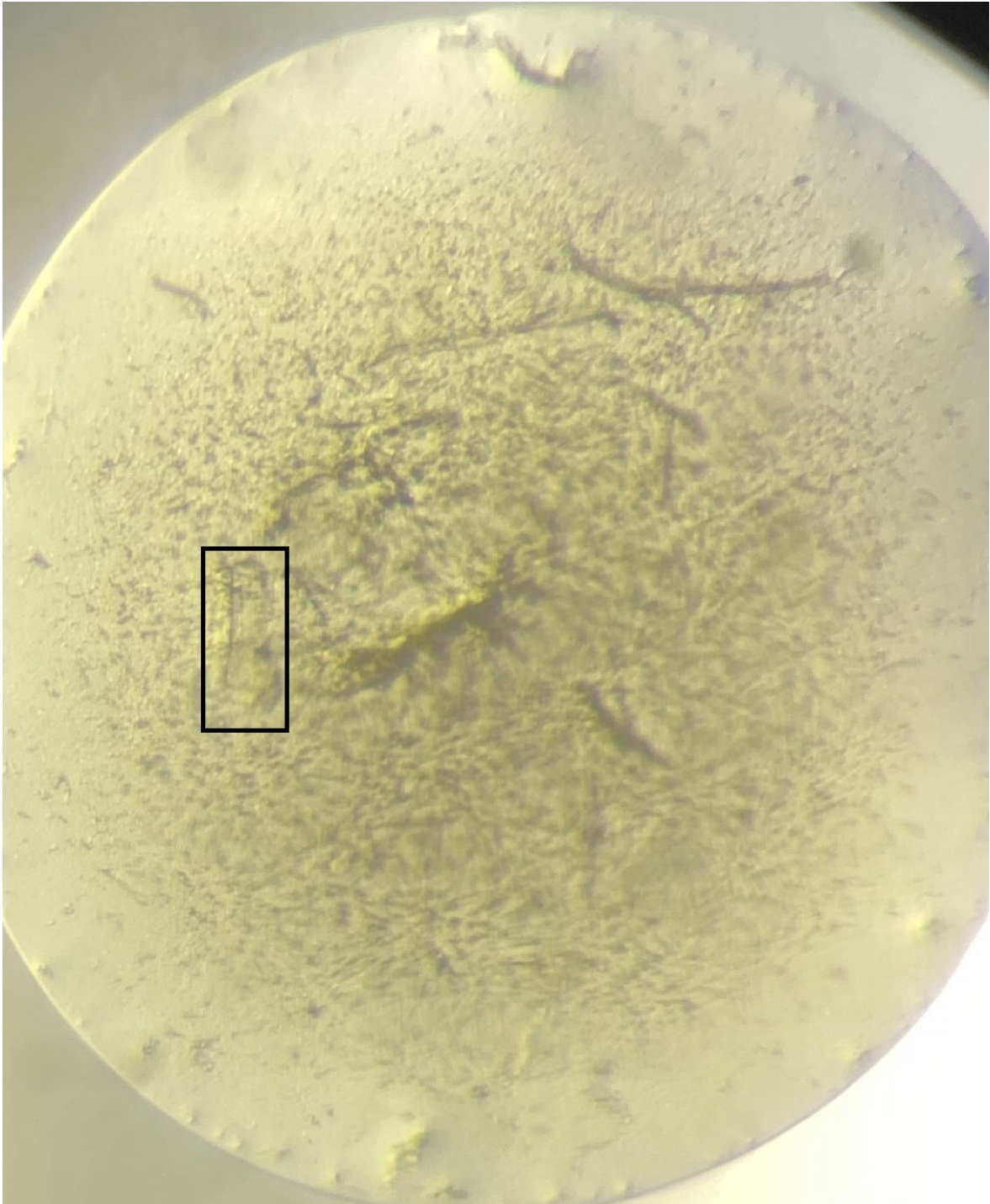


Fig.10 Possibile cristallo di M^{pro} + quercetina 1:10 corrispondente al pozzetto H5.

Una volta visti i possibili risultati di cristalli, oltre a quelli mostrati in figura precedentemente, si è passato al montaggio e spedizione.

Durante il montaggio, sono state preparate schede che riassumono i diversi cristalli che sono stati prelevati e il tutto è stato inviato al sincrotrone di Amburgo presso la linea di luce P13 EMBL.

Date of Beamtime	Synchrotron and Beamline	SPINE PUCK position
06/07/2023	AMBURGO P13	HH 055
1	D4 Mpro PIASRA NATIVA KIT 01 11/06/2023	
2	D12 Mpro PIASRA NATIVA KIT 01 11/06/2023	
3	D4 Mpro PIASRA NATIVA KIT 01 11/06/2023	
4	G7 Mpro PIASRA NATIVA KIT 01 11/06/2023	
5	H42 Mpro + PACT 15/06/2023	
6	G40 Mpro + QUERCETINA 1:40 15/06/2023	
7	H5 Mpro + QUERCETINA 1:40 15/06/2023	
8	H5 Mpro + QUERCETINA 1:40 15/06/2023	
9	D4 Mpro + QUERCETINA 1:25 KIT 01 11/06/2023	
10	B5 Mpro + QUERCETINA 1:25 KIT 01 11/06/2023	

Date of Beamtime	Synchrotron and Beamline	SPINE PUCK position
06/07/2024	AMBURGO P13	HH 056
1	C7 Mpro + QUERCETINA 1:25 11/06/2023 KIT 01	
2	B2 Mpro + QUERCETINA + SC68 15/06/2023	
3	B3 Mpro + QUERCETINA + SC68 15/06/2023	
4	B2 Mpro + QUERCETINA + SC68 15/06/2023	
5	E3 Mpro + QUERCETINA + SC68 15/06/2023	
6	E3 Mpro + QUERCETINA + SC68 15/06/2023	
7	D8 Mpro + QUERCETINA + PACT 15/06/2023	
8	A2 Mpro + QUERCETINA + PACT 15/06/2023	
9	EB Mpro + QUERCETINA + PACT 15/06/2023	
10	EB Mpro + QUERCETINA + PACT 15/06/2023	

Fig.11 Schede per il Beamtime.

I 30 cristalli sono stati testati per diffrazione di tipo proteico, senza risultati.

Le immagini di diffrazione indicano una matrice di tipo non proteico in aggregato polveroso, probabilmente quercetina (Fig. 12).

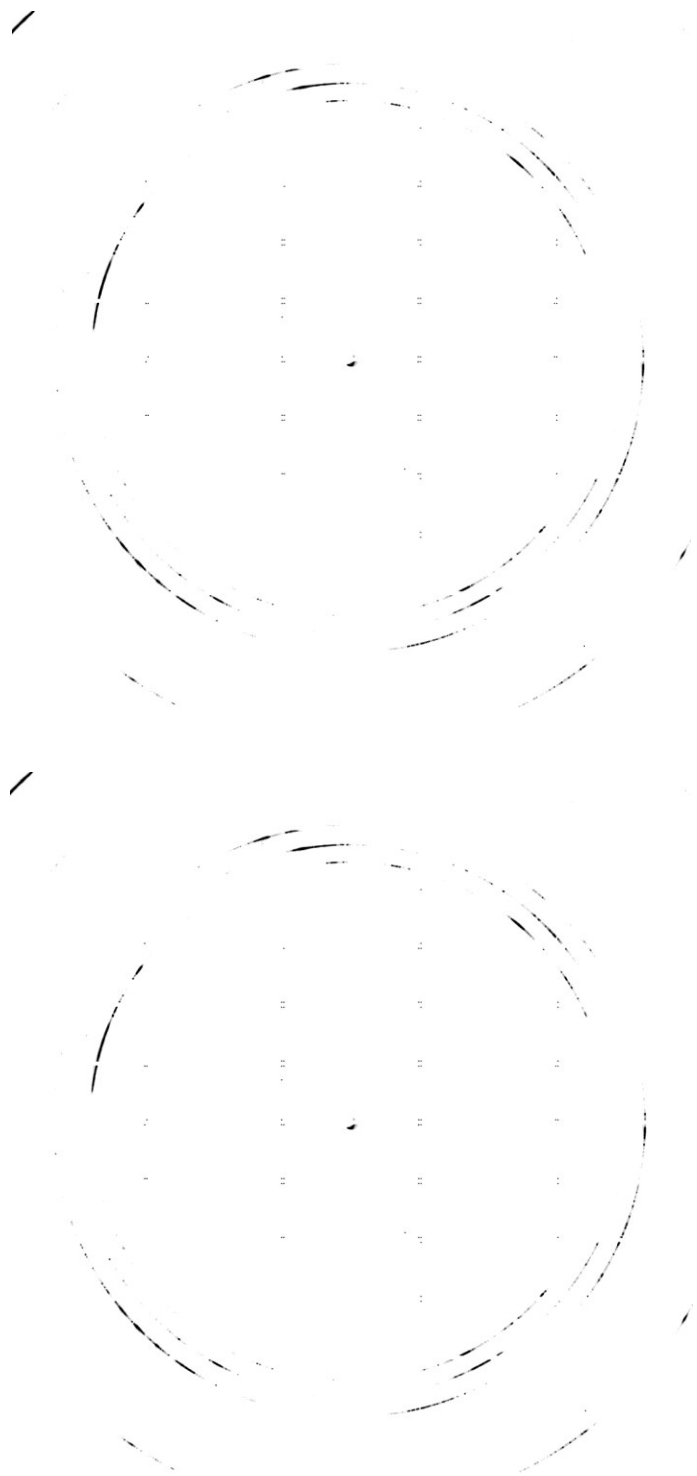


Fig.12 Immagini ottenute dalla diffrazione.

Capitolo quarto

DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi la produzione ricombinante di M^{pro} in *E. coli* ha permesso di procedere con un primo screening di condizioni di cristallizzazione proteica robotizzata partendo dalla calibrazione dei volumi del robot utilizzato per la dispensazione delle micro-aliquote di proteina sulle apposite piastre. Utilizzando prima il lisozima poi la M^{pro} stessa è stato possibile ottenere dei primi cristalli nonostante, per quanto riguarda M^{pro}, l'immagine di diffrazione raccolta non abbia dato i risultati attesi. Durante l'iniziale procedimento di espressione di M^{pro} si sono riscontrate delle difficoltà, in quanto dalla banda relativa a 35 kDa, la proteina era poco visibile.

Quindi, per confermare che effettivamente M^{pro} venisse prodotta dalle cellule di *E. Coli* BL21 (DE3) pLysS, la prova fondamentale è stata quella del Western Blot. Abbiamo così potuto appurare che la proteina venisse effettivamente prodotta da *E. Coli* e per far fronte a questo problema, tra le diverse soluzioni pensate, quella che ha avuto esito positivo è stata quella di inoculare le colonie di *E. Coli* direttamente dalla piastra agarizzata (LB) alla beuta contenete LB liquido. In questo modo la proteina è stata nuovamente

espressa ed attraverso i diversi passaggi utilizzati per la produzione abbiamo ottenuto una concentrazione pari a 6mg/ml.

Riassumendo, per quanto riguarda lo screening delle condizioni di cristallizzazione, una prova utile al nostro fine, è stata quella della cristallizzazione del Lisozima, poiché:

- ha permesso di settare il MOSQUITO® e ciò è stato fondamentale per preparare le diverse piastre di cristalli di M^{pro},
- per avere le prime condizioni di cristallizzazione,
- per vedere come debba essere un cristallo, cioè una forma ben definita e priva di contaminazioni.

Invece, per quanto riguarda la piastra di buffer a diverse condizioni (Vedi Fig. 8 Capitolo 5) preparata sperimentalmente, la diffrazione non ha dato risultati. Ma analizzando le diverse condizioni, nella piastra nativa utilizzando il PEG 2000 non vi era nessuna formazione, invece quelle che mostravano delle possibili formazioni cristalline presentavano un PEG 4000 e 6000 avendo in entrambe la stessa quantità di DMSO 100 µl e MES 400 µl e, anche, lo stesso pH pari a 6,5.

Invece per quanto riguarda la piastra di Mpro + quercetina 1:25, vi erano delle formazioni granulose color giallo intenso, dopo 1h erano già presenti, quindi non hanno dato un buon risultato.

A differenza della piastra Mpro + quercetina 1:10 dove vi erano delle possibili formazioni cristalline.

Capitolo quinto

CONCLUSIONI

Il risultato di questo lavoro, basato sulla purificazione e screening delle possibili e iniziali condizioni di cristallizzazione della proteasi principale (M^{pro}) di SARS – CoV – 2, attraverso le diverse prove effettuate, è stato quello di testare diverse condizioni che dovranno essere approfondite attraverso studi futuri. In conclusione, possiamo affermare però che questo studio può essere visto come una base di partenza per lo screening e la messa a punto delle condizioni di cristallizzazione di M^{pro} .

Questo lavoro di tesi rappresenta, inoltre, il punto di partenza per l'avvio del processo di cristallizzazione robotizzata recentemente introdotto.

In particolare due sono i punti fondamentali analizzati:

- Lo screening di diverse condizioni di cristallizzazione proteica.
- La calibrazione volumetrica del MOSQUITO®, che ha permesso di settare la tecnica di cristallizzazione del sitting drop in modo preciso e accurato, utilizzando volumi di soluzione proteica ridotti.

Capitolo sesto

BIBLIOGRAFIA

Kneller, D.W., Phillips, G., O'Neill, H.M. et al. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. *Nat Commun* 11, 3202 (2020).

Mengist, H.M., Fan, X. & Jin, T. Designing of improved drugs for COVID-19: Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease Mpro. *Sig Transduct Target Ther* 5, 67 (2020).

Abian O., Ortega-Alarcon D., et al. Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening. *International Journal of Biological Macromolecules* 164 (2020) 1693-1703.

Chayen Naomi E., Helliwell John R., Snell Edward H. *Macromolecular Crystallization and Crystal Perfection*. IUCr Monographs on Crystallography 24

Jan Drenth, *Principles of Protein X-Ray Crystallography*

M. G. Rossmann and E. Arnold *International Tables for Crystallography Volume F Crystallography of biological macromolecules*.

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-88-470-1827-3_1

<https://hamptonresearch.com/>

[https://www.sptlabtech.com/products/mosquito,](https://www.sptlabtech.com/products/mosquito)

<https://www.jenabioscience.com/crystallography-cryo-em/get-started/protein-crystallization-starter-kit>

<http://www.geo.uniba.it>

<http://www.chimdocet>