



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

**Biologia Molecolare e Applicata**

---

STATO DELL'ARTE RELATIVO ALLA PRODUZIONE ETEROLOGA  
DI CXCL12: UN GENE PER SETTE ISOFORME

STATE OF THE ART RELATED TO HETEROLOGOUS  
PRODUCTION OF CXCL12: A GENE FOR SEVEN ISOFORMS

---

**Tesi di Laurea Magistrale:**

Sara D'Angelo

**Relatore:**

Prof.ssa Tiziana Cacciamani

**Correlatore:**

Dott.ssa Chiara Ardiccioni

**Sessione Straordinaria**

Anno Accademico, 2018-2018

# INDICE

INTRODUZIONE.....	2
1. <i>Le Chemochine, struttura e funzione.</i> .....	6
1.1 <i>La famiglia delle chemochine CXC.</i> .....	7
1.1.2 <i>Attività' Biologica.</i> .....	9
1.1.3 <i>Famiglia CXCL12.</i> .....	10
1.2 <i>I recettori delle chemochine CXCL12</i> .....	11
1.2.1 <i>ASSE CXCL12/CXCR4/CXCR7.</i> .....	13
1.2.2 <i>Il recettore CXCR4.</i> .....	14
1.2.3 <i>Il recettore CXCR7.</i> .....	17
1.2.4 <i>Dimerizzazione dei recettori di cxcl12</i> .....	19
1.3 <i>Le chemochine non legano solo recettori.</i> .....	20
1.4 <i>CXCL12 ; Un gene sette isoforme.</i> .....	23
1.4.1 <i>MULTIALLINEAMENTO</i> .....	24
1.4.2 <i>Caratteristiche generali</i> .....	25
1.5 <i>Patologie associate</i> .....	28
1.5.1 <i>HIV : sdf1 e cxcr4</i> .....	29
1.5.2 <i>Cancro</i> .....	31
1.5.3 <i>Sistema nervoso centrale:</i> .....	31
<i>Scopo:</i> .....	33
<b>Materiali e Metodi</b> .....	35
2. <i>Produzione di proteine ricombinanti:</i> .....	35
2.1 <i>Analisi delle caratteristiche dei sistemi di espressione</i> .....	36
2.2 <i>Vettori di clonaggio ed espressione.</i> .....	39
2.2.1 <i>Il vettore pMCSG7</i> .....	39
2.2.2 <i>Modifiche strutturali del vettore pMCSG7(10 His).</i> .....	40
2.2.3 <i>Vettore pMCSG9.</i> .....	42
2.3 <i>Propagazione del vettore p7-EK in cellule competenti, le GC-5.</i> .....	43
2.4 <i>Purificazione del plasmide mediante QIAprep Spin Miniprep Kit</i> .....	44
2.5 <i>Analisi delle sequenze</i> .....	45
2.5.1 <i>Sequenze delle isoforme CXCL12</i> .....	45
2.5.2 <i>Sequenze sintetiche.</i> .....	47
2.5.3 <i>Sequenze clonate di CXCL12</i> .....	47
2.6 <i>LIGATION INDIPENDET CLONING : LIC</i> .....	51

2.6.1	<i>Trattamento del vettore di clonaggio</i>	53
2.6.2	<i>INSERTO</i>	53
2.7	<i>Spettrofotometro, il NanoDrop</i>	57
2.8	<i>PURIFICAZIONE DI PRODOTTI DI PCR ED EDSTRAZIONE DNA DA GEL DI AGAROSIO</i>	59
2.9	<i>Trasformazione mediante heat-shock termico delle cellule competenti GC-5.</i>	59
2.9.1	<i>COLONY-PCR</i>	61
2.10	<i>Ceppi di E.coli utilizzati per la trasformazione.</i>	63
2.10.1	<i>Processo di trasformazione in ceppi di E.coli ed induzione dell'espressione tramite IPTG</i>	66
2.11	<i>Purificazione mediante Cromatografia di affinità</i>	69
2.11.1	<i>La cromatografia liquida a proteine veloci</i>	73
2.11.2	<i>Concentrazione delle proteine.</i>	74
2.11.3	<i>Dialisi</i>	75
2.11.4	<i>DOSAGGIO DI PROTEINE - METODO BRADFORD</i>	77
2.12	<i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	78
2.13	<i>ELETTROFORESI</i>	79
2.14	<i>Scheda delle soluzioni tampone usate</i>	82
	<b>Risultati e Discussione</b>	87
3.	<b>Amplificazione delle isoforme CXCL12.</b>	87
3.1	<i>Estrazione con kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up e quantizzazione al nanoDrop degli amplificati.</i>	90
3.2	<i>Strategie di clonaggio; scelta del vettore.</i>	91
3.2.1	<i>Vettore di clonaggio pMCSG7; caratteristiche generali e modifiche.</i>	91
3.2.2	<i>Propagazione e purificazione del vettore p7-EK in cellule competenti di E.coli; GC-5.</i>	92
3.2.3	<i>Digestione enzimatica del plasmide e purificazione.</i>	92
3.3	<i>Ligation Independent Cloning del vettore p7-EK</i>	93
3.3.1	<i>Trasformazione E. coli GC-5 competenti per l'acquisizione del plasmide ricombinante</i>	93
3.4	<i>PCR COLONY</i>	94
3.5	<i>Sequenziamento, BMR-Genomics</i>	95
3.6	<i>Trasformazione per test di espressione, in cellule di E.coli BL-21(DE3)pLysS competenti per acquisizione del plasmide ricombinante p7-EK e Test di Induzione con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside)</i>	98
3.6.1	<i>Test di purificazione dell'isoforma-γ, cromatografia di affinità.</i>	100
3.7	<i>Vettore pMCSG9</i>	103

3.7.1	<i>Clonaggio LIC in p9-EK di tutte le isoforme CXCL12.</i>	104
3.7.2	<i>Propagazione del vettore in cellule competenti GC-5 di E.Coli; purificazione del plasmide p9-EK ricombinante.</i>	104
3.7.3	<i>Estrazione con nucleospin per l'estrazione del vettore.</i>	105
3.7.4	<i>PCR COLONY</i>	105
3.7.5	<i>Sequenziamento, BMR-Genomics</i>	107
3.8	<i>TEST DI ESPRESSIONE DI TUTTE LE ISOFORME di CXCL12 clonate in p9EK nel ceppo BL21(DE3)pLysS.</i>	108
3.8.1	<i>Induzione in media scala di tutte le isoforme CXCL12.</i>	109
3.9	<i>Purificazione</i>	113
3.9.1	<i>PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE CXCL12-<math>\beta</math></i>	113
3.9.2	<i>PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE CXCL12-<math>\delta</math></i>	121
3.10	<i>Quantizzazione delle due isoforme- <math>\beta</math> e <math>\delta</math> con il metodo Bradford.</i>	124
3.11	<i>Rimozione del TAG con l'utilizzo di una proteasi specifica, l'enterochinasi e recupero di CXCL12.</i>	125
<b>CONCLUSIONI</b>		131



## INTRODUZIONE

Le chemochine rappresentano una grande famiglia all'interno delle citochine, il loro nome sta per citochine chemiotattiche.

### 1. Le Chemochine, struttura e funzione.

In natura sono presenti 47 diverse chemochine, proteine a basso peso molecolare, intorno agli 8-12 kD e contengono al loro interno uno o due ponti disolfuro.

Vengono classificate in quattro famiglie in base alla posizione e numero dei due o quattro residui di cisteina. Le due famiglie maggiormente rappresentate vengono distinte in alfa e beta chemochine.

Le *chemochine-alfa* dette anche CXC hanno i propri residui cisteinici separati da un amminoacido, come riportato nell'esempio in figura:

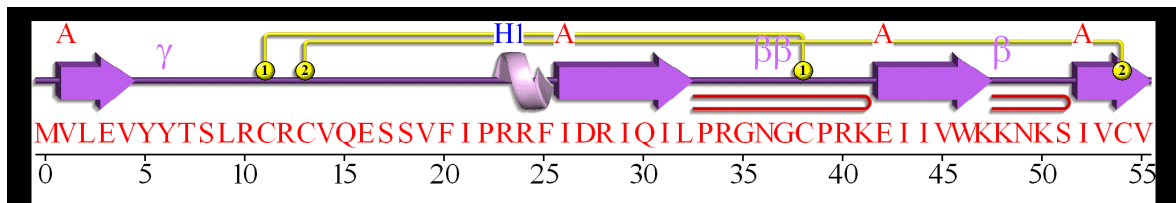


Figura.1 Esempio di citochina CXC, CXCL13 (da PDBsum)

Le *chemochine beta* dette anche CC hanno i propri residui cisteinici adiacenti,

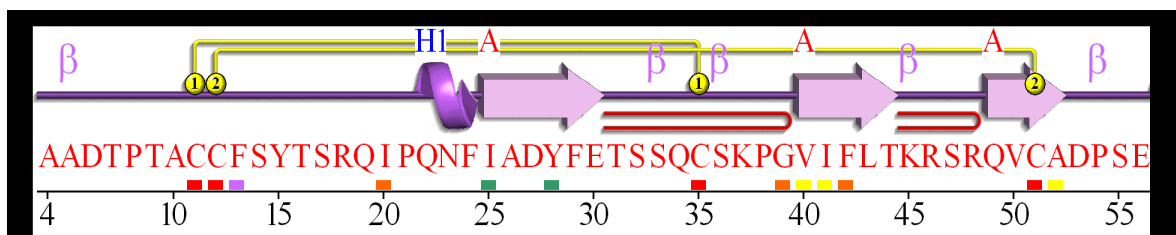


Figura.2 Esempio citochina CC, CCL3 (da PDBsum)

Le altre due famiglie hanno un singolo residuo cisteinico e vengono chiamate *C-family* o due residui separati da tre amminoacidi e vengono dette *CX3C-family*.

### ***1.1 La famiglia delle chemochine CXC.***

Nella famiglia delle CXC ci sono due varianti strutturali, quelle che presentano un motivo detto ERL antecedente alla prima cisteina, ovvero formato da tre amminoacidi, acido glutammico, leucina, arginina e quelle di cui ne sono sprovviste.

Quelle che presentano il motivo ERL svolgono prevalentemente il ruolo di richiamo neutrofilo mentre CXC senza il motivo ERL agisce su una più vasta gamma cellulare come linfociti, monociti e leucociti.

Sono prodotte dai leucociti e da vari tipologie di cellule presenti in vari tessuti come cellule endoteliali, epiteliali, macrofagi, fibroblasti e altre cellule stromali anche in risposta alla stimolazione da parte di citochine infiammatorie come TNF , IL-17 .

*La nomenclatura attuale identifica le chemochine attraverso il recettore che esse legano.*

Chemokine	Original Name	Chemokine Receptor	Major Function
<b>CC Chemokines</b>			
CCL2	MCP-1	CCR2	Mixed leukocyte recruitment
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5	Mixed leukocyte recruitment
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5	T cell, dendritic cell, monocyte, and NK recruitment; HIV coreceptor
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	Mixed leukocyte recruitment
CCL11	Eotaxin	CCR3	Eosinophil, basophil, and Th2 recruitment
CCL17	TARC	CCR4	T cell recruitment
CCL19	MIP-3 $\beta$ /ELC	CCR7	T cell and dendritic cell migration into parafollicular zones of lymph nodes
CCL21	SLC	CCR7	T cell and dendritic cell migration into parafollicular zones of lymph nodes
CCL22	MDC	CCR4	NK cell, T cell recruitment
CCL25	TECK	CCR9	Lymphocyte recruitment into intestine
CCL27	CTACK	CCR10	T cell recruitment into skin
<b>CXC Chemokines</b>			
CXCL1	GR $\alpha$	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR-2	Neutrophil recruitment
CXCL9	Mig	CXCR3	Effector T cell recruitment
CXCL10	IP-10	CXCR3	Effector T cell recruitment
CXCL12	SDF1	CXCR4	B cell migration into lymph nodes; plasma cell migration into bone marrow
CXCL13	BCA-1	CXCR5	B cell migration into lymph nodes and into follicles; T follicular helper cell migration into follicles
<b>C Chemokines</b>			
XCL1	Lymphotactin	XCR1	T cell and NK cell recruitment
<b>CX3C Chemokines</b>			
CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1	T cell, NK cell, and monocyte recruitment

Tabella.1; **Le chemochine con il relativo recettore.** ( Le CXC chemochine sono chiamate CXCL1 e legano il recettore CCXR2)



### ***1.1.2 Attivita' Biologica.***

Molte chemochine sono prodotte in risposta a stimoli esterni dovuti ai processi infiammatori. Alcuni vengono costitutivamente espresse perché contribuiscono al mantenimento cellulare in determinati organi come linfonodi e dunque per la presenza costante di cellule B – T.

**PROCESSI INFIAMMATORI:** in queste situazioni le chemochine sono molto importanti per il reclutamento dei leucociti a livello vasale e nei distretti extra-vascolari. Le chemochine qui assumono due ruoli importanti

1) Incremento di adesione tra endoteli e leucociti. Le chemochine prodotte nel tessuto legano l'eparan solfato, un proteoglicano presente nelle cellule endoteliali che rivestono venule post-capillari

2) Migrazione di leucociti attraverso il circolo sanguigno verso il sito d'infiammazione o del tessuto danneggiato. Le chemochine prodotte nel tessuto extravascolare agiscono sui leucociti che hanno aderito all'endotelio e che sono usciti in circolazione. Esse stimolano il movimento dei leucociti secondo un gradiente di concentrazione di proteine secrete verso la fonte, un processo chiamato chemiotassi , così che i leucociti migrano verso tessuti infetti e danneggiati, dove le chemochine sono prodotte.

**CHEMIOCHINE RICHIESTE PER LA MIGRAZIONE DI DCs** dal sito d'infezione all'interno dei nodi linfatici. DCs sono attivati da infezioni

microbiche in tessuti periferici e essi migrano nei nodi linfatici e informano i linfociti T della presenza di un'infezione. la migrazione dipende dall'espressione del recettore che lega la chemiochina, CCR7, che è indotto quando DCs incontra i microrganismi e le chemiochine vengono prodotte dai tessuti linfatici e linfoidi che legano CCR7. Anche le cellule T naive esprimono ccr7 e questo spiega come DC e cellule T naive si localizzano nello stesso posto nei linfonodi, consentendo ai DC di presentare l'antigene alle cellule T.

### **1.1.3 Famiglia CXCL12.**

La famiglia CXCL12 che ritroviamo all'interno delle chemochine con motivo C-X-C, sono state descritte inizialmente come pre-B growth factor ( PBGF) , fattore che interviene nei processi come linfopoiesi e embriogenesi. Successivamente sono state rinominate stromal-derived factor-1 (sdf-1) perché è stata evidenziata la loro espressione in modo costitutivo dalle cellule stromali del midollo osseo, funzione importante per preservare le cellule progenitrici ematopoietiche e staminali.

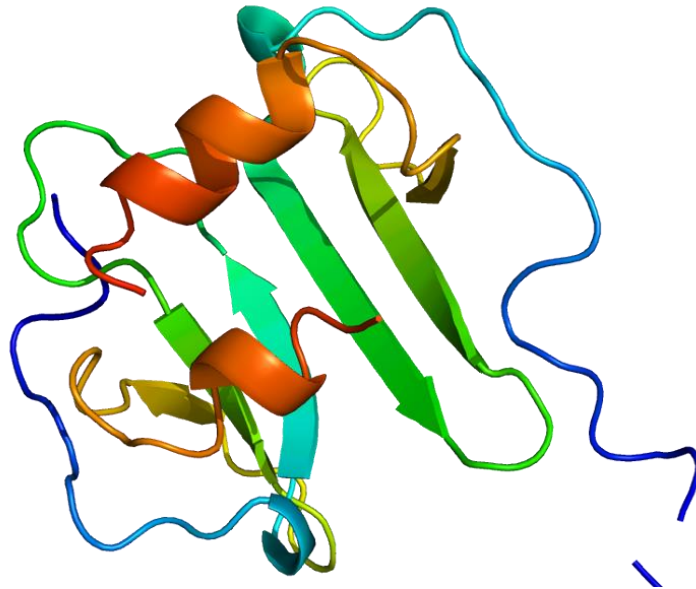


Figura.3 **Struttura terziaria di CXCL12- $\alpha$**

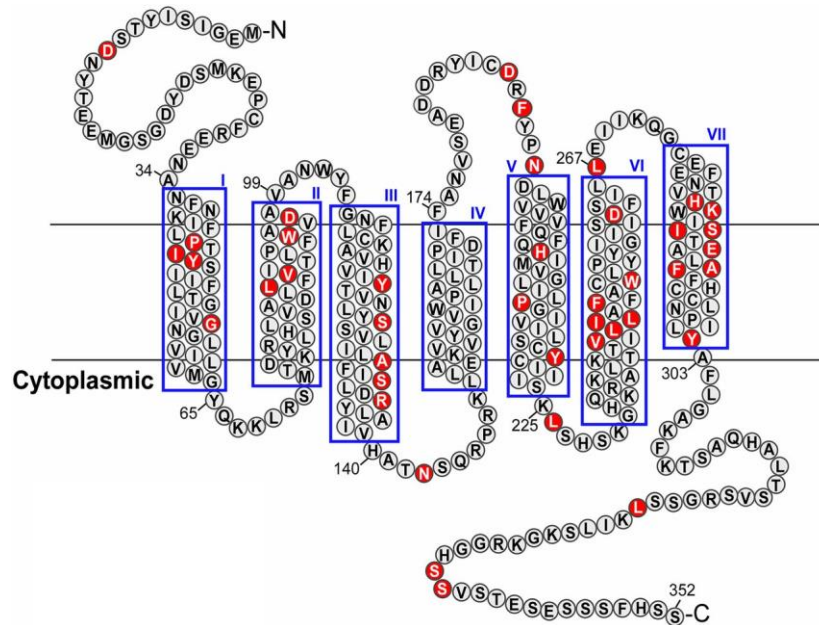
Come riportato anche in Tabella.1 CXCL12 è l'unico ligando di CXCR4 , si è poi anche evidenziato che cxcl12 puo' legare un altro recettore molto importante che è appunto CXCR7.

### ***1.2 I recettori delle chemochine CXCL12***

I recettori per le chemochine fanno parte della famiglia dei GPCR (*G-Protein Coupled Receptors*), recettori accoppiati alle proteine G.

Strutturalmente sono perciò formati da una regione extracellulare che lega la chemochina, da sette  $\alpha$ -eliche transmembrana associati ad una proteina G sul

versante citoplasmatico. Il legame della chemochina attiva il recettore ma al contempo ne diminuisce l'espressione sulla superficie cellulare.



**Figura.4, Recettore CXCR4.**

I recettori transmembrana presentano 7 domini ad alfa-elica transmembrana (rettangolo blu), l'N-terminale si trova sul versante extracellulare mentre il C-terminale è rivolto verso il citoplasma della cellula. Questi recettori iniziano la risposta intracellulare associandosi a proteine G, questo media il legame tra il ligando e il recettore con la quale inizia la cascata di eventi per la trasduzione del segnale.

Sinora si conoscono 10 recettori CCR che legano le chemochine CC, 7 recettori CXCR che legano le chemochine CXC, 2 recettori XCL che legano le chemochine C e un solo recettore CX<sub>3</sub>CR che lega le chemochine CX<sub>3</sub>R. Di alcune chemochine, però, non si conosce il recettore corrispondente

### 1.2.1 ASSE CXCL12/CXCR4/CXCR7.

Da alcuni studi effettuati su modelli murini si sono compresi alcuni processi in cui i legami tra i due recettori e questa famiglia di chemochine risultano essere importanti durante lo sviluppo. Grazie a questi esperimenti di knockout genici per l'espressione del recettore *cxcr4* si è mostrata una precoce morte dei topi in fase perinatale mostrando difetti nello sviluppo dei setti ventricolari cardiaci, nella ematopoiesi e nella neurogenesi. Questi ultimi risultati sono comparabili alle evidenze osservate con il knockout per l'espressione di *cxcl12* sempre nel modello murino. Sono stati effettuati altri esperimenti per comprendere e sottolineare la stretta connessione tra il legame di *cxcl12/cxcr4/cxcr7* durante la cardiogenesi dove si sono osservati difetti con riscontro fatale.

*CXCR4* e *CXCR7* sono espressi in molti tipi cellulari risulta facile comprendere come il controllo e l'attivazione da parte di *cxcl12* sia fondamentale nel

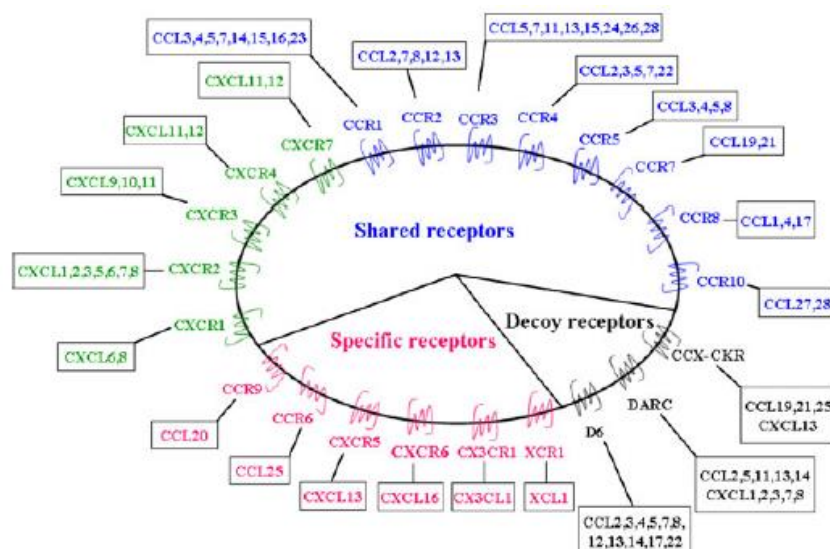


Fig. 5 Le quattro famiglie di chemochine e i relativi recettori.

regolare il bilancio omeostatico e come alcuni squilibri derivati da questo asse cxcl12/cxcr4/cxcr7 siano alla base di alcune patologie come cancro, sclerosi multipla e artrite reumatoide. Dunque l'attività delle chemochine in associazione con un determinato recettore evidenziano come questi giochi un ruolo importante in numerosi processi infiammatori, allergie malattie cardiovascolari e nei tumori maligni.

### ***1.2.2 Il recettore CXCR4.***

È un recettore seven-span transmembrane altamente conservato e lega le chemochine CXCL12. CXCR4 è stato categorizzato come recettore di chemochine associato a proteine G. Viene espresso da vari tipi cellulari a livello della membrana superficiale. Questi tipi di cellule comprendono la maggior parte dei sottogruppi di leucociti, progenitori ematopoietici e cellule staminali presenti nella circolazione e cellule di organi linfoidi come il midollo osseo, il timo e i linfonodi. Le cellule endoteliali e le cellule stromali ed epiteliali nel midollo osseo, nel polmone e nell'intestino tenue esprimono anche CXCR4.

Il legame avviene tramite l'estremità N-terminale di CXCL12 dove i primi otto amminoacidi risultano essere fondamentali e di cui i primi due amminoacidi, Lys e Pro, sono assolutamente necessari. Inoltre, un motivo di legame presente sul N-terminale di CXCR4 (RFFESH) migliora il legame di CXCL12 al suo recettore (entrambi i siti di legame CXCR4 sono mostrati nella Figura 2).

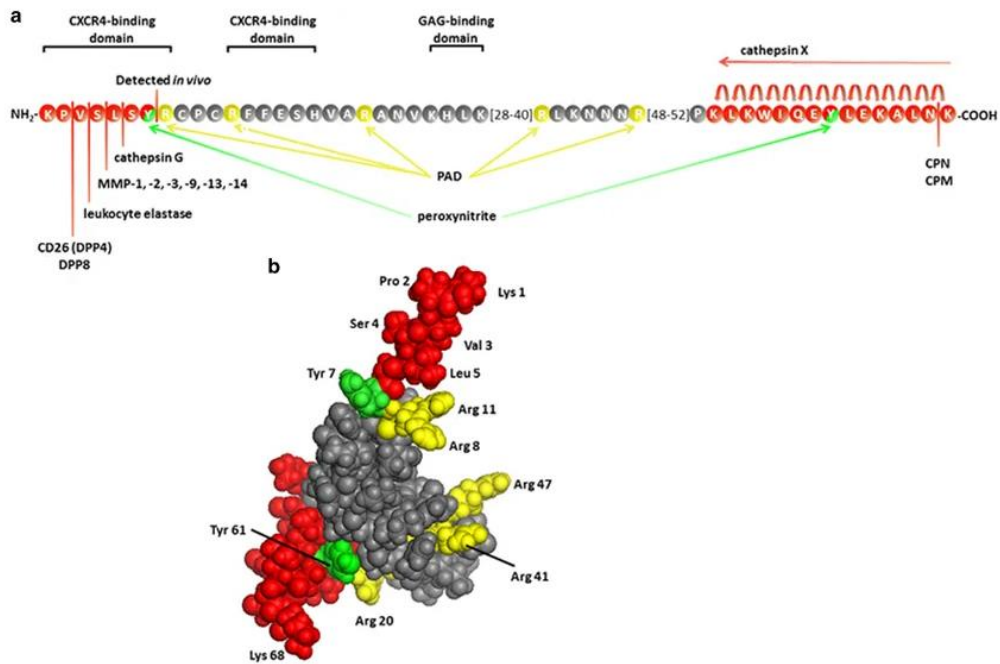


Figura.6 CXCL12- $\alpha$ , domini di legame con il recettore CXCR4.

Il motivo RFFESH è responsabile del contatto iniziale tra CXCL12 e CXCR4 e induce un cambiamento conformazionale che consente agli aminoacidi N-terminali di attivare il recettore. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che l'interazione tra le chemochine e i loro recettori è più complessa e coinvolge molti altri domini sia nella chemochina che nel recettore.

### Trasduzione del segnale del legame tra cxcl12 e cxcr4

La chemochina lega la porzione extracellulare del recettore e induce un cambiamento conformazionale del recettore il quale attiva l'eterotrimerico  $G_{\beta\gamma}$  (legare la sequenza amminoacidica DRYLEIV nel secondo ciclo intracellulare del recettore).

La subunità  $\alpha$  dell'eterotrimerico è legata al GDP, l'attivazione del complesso comporta la conversione del GDP in GTP a partire dalla dissociazione delle subunità  $G\beta\gamma$  e  $G\alpha$ .

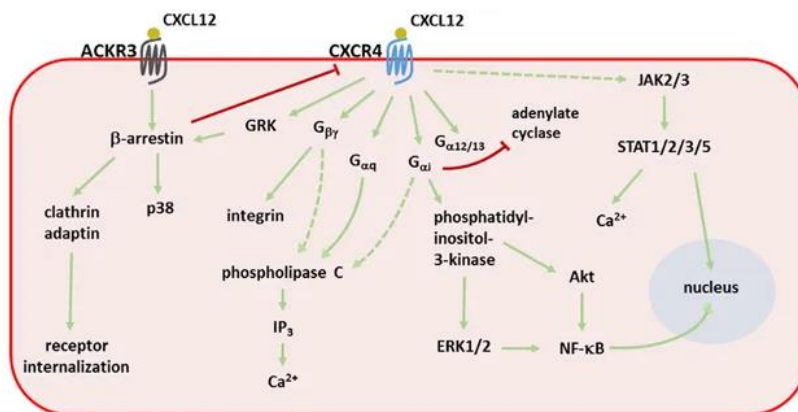


Figura.7 Pathway attivato da CXCR4-CXCL12.

Dopo il legame con CXCL12 il recettore viene internalizzato e degradato. La subunità  $G\alpha$  può essere accoppiato a  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  o  $G\alpha_{12/13}$ , con conseguente attivazione di diverse vie di segnalazione.

Ciò si traduce in una cascata di segnalazione complessa che coinvolge, tra l'altro, la proteina chinasi attivata da mitogeno (MAPK), la fosfolipasi C e la fosfatidilinositolo-3 -kinase e termina con il rilascio di calcio e dunque la migrazione cellulare o l'attivazione di molecole di adesione in cellule target.

CXCL12 è l'unico ligando chemochine per CXCR4 tuttavia, altri ligandi non chemochine possono legare e indurre la trasduzione del segnale tramite CXCR4, ovvero fattore inibitorio sulla migrazione dei macrofagi (MIF), ubiquitina extracellulare e la proteina dell'involucro dell'HIV gp120.



Dal legame con CXCL12 viene stimolata la trasduzione del segnale mediata dalla  $\beta$ -arrestina. Dopo il suo richiamo è direttamente attiva su alcune vie di segnalazione, p38 MAPK ma dall'altra parte il reclutamento della beta arrestina su cxcr4 può essere negativo perché blocca il recettore e stimola l'internalizzazione dei recettori con il richiamo di clatrina.

I ligandi antagonizzanti per CXCR4 sono la  $\beta$ 3-defensina umana endogena.

### ***1.2.3 Il recettore CXCR7.***

ACKR3 è il secondo recettore che lega le CXCL12, inizialmente scoperto come recettore orfano delle chemochine RDC1/CXCR7. Il legame di CXCL12 si verifica con un'affinità dieci volte superiore a quella per CXCR4 (KD di 0,4 nM per ACKR3).

L'ACKR3 è espresso su molti tipi di cellule, comprese le cellule ematopoietiche, cellule progenitrici neuronali e cellule endoteliali. È stato osservato anche nella placenta e nelle cellule ematopoietiche fetali. L'attivazione di ACKR3 media un aumento della sopravvivenza e dell'adesione cellulare, caratteristiche importanti che stimolano la crescita tumorale. È stato dimostrato che diversi tipi di tumore esprimono ACKR3 ma allo stesso tempo è stato evidenziato un altro aspetto che sembra essere importante per prevenire l'insorgenza dei tumori perché previene il legame della chemochina con cxcr4 sottraendolo per il proprio legame. Questa caratteristica di cxcr7 fa sì che si

abbia un gradiente delle chemochine che portano alla segnalazione differenziale di cxcr4.

La trasduzione del segnale indotta da CXCL12 o CXCL11 attraverso ACKR3 è iniziata dalle  $\beta$ -arrestine e non dalle classiche proteine G, quindi, è classificato come recettore delle chemochine *atipico*.

L'attivazione di ACKR3 da parte di CXCL12 comporta anche la trasduzione del segnale mediata da MAPK (ERK1-ERK2) e ne consegue la migrazione e adesione cellulare.

Oltre alle sue proprietà di segnalazione, ACKR3 ha principalmente una funzione di evacuazione e rimuove CXCL12 dall'ambiente. Insieme all'elevata affinità di legame CXCL12, questo sequestering è ottenuto dalla continua internalizzazione e riciclaggio di ACKR3. Contrariamente a CXCR4, l'internalizzazione di ACKR3 avviene anche senza legame con i ligandi e non provoca degradazione del recettore.

Studi in vivo hanno dimostrato come l'inibizione del recettore porti ad un aumento di CXCL12 nel plasma e questo implica che il recettore è importante per regolare la concentrazione di CXCL12. In embrioni di zebrafish è stato osservato come il legame di cxcl12 con il recettore risulti essere importante per la migrazione e distribuzione delle cellule nel tronco e nella coda. Il gradiente di cxcl12 è importante per promuovere la sopravvivenza delle cellule neuronali

progenitrici e anche un importante ruolo chemiotatico nel successo terapeutico contro il trattamento tumori anche aggressivi.

#### ***1.2.4 Dimerizzazione dei recettori di cxcl12***

i recettori CXCR4 e ACKR3 possono essere presenti in omodimeri o eterodimeri sulle membrane cellulari questo dipende se le CXCL12 legano uno o l'altro attivando segnali diversi e dunque attivi in momenti diversi.

Il segnale innescato dal recettore *CXCR4 in forma monomerica* induce l'attivazione delle proteine G che a sua volta attiverà la via mediata da MAPK/PI3K. CXCR4 *in forma omodimerica* invece sembra attivare la via di traduzione del segnale in modo indipendente dalle proteine G o delle beta-arrestine ma coinvolge il pathway JAK/STAT. STAT sono fattori di trascrizione, e sono inoltre collegati alla mobilizzazione e alla chemiotassi del calcio intracellulare G $\alpha$ i-dipendenti.

Il recettore *ACKR3 in forma monomerica* è importante per lo scavenger di cxcl12 e attiva il segnale ERK1/2 attraverso le beta-arrestine.

Infine possiamo osservare l'*eterodimero* formato dai due recettori che attuano una risposta indipendente sempre dalle proteine G ma basata sull'attività da parte delle beta-arrestine. L'attività delle beta-arrestine causa l'internalizzazione del CXCR4, il sequestro delle chemochine CXCL12, l'attivazione della via ERK1/2 e sembra essere importante per migliorare la

sopravvivenza cellulare. Quando il recettore CXCR4 viene internalizzato e degradato dopo il legame con cxcl12 a differenza del ackr3 che viene continuamente internalizzato indipendentemente dal legame con il ligando e non viene degradato.

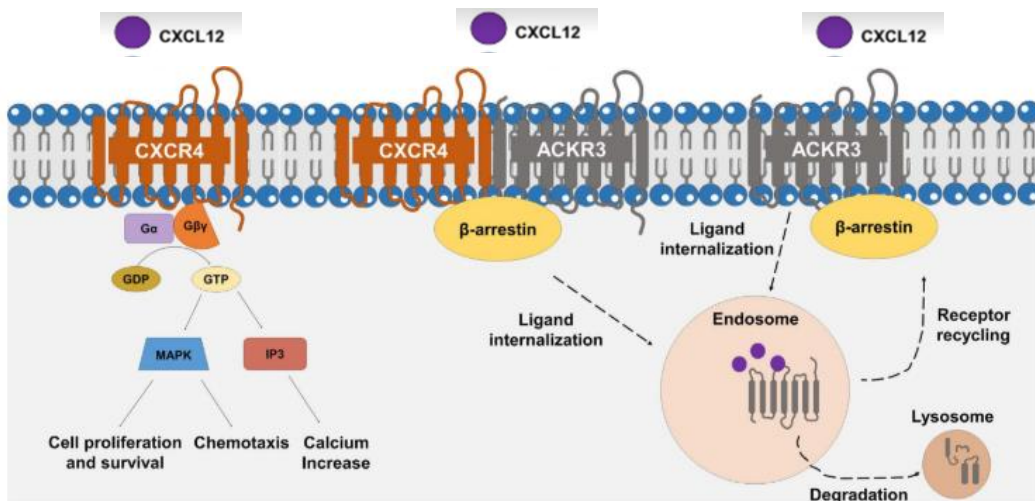


Figura.8 Dimerizzazione dei recettori CXCR4-ACKR3

### 1.3 Le chemochine non legano solo recettori.

Le chemochine hanno un'altra importante interazione con altri partners non recettoriali, i glicosamminoglicani (GAGs) come eparina e eparan solfato.

Importanti partner di interazione per le chemochine, oltre ai loro recettori, sono glicosaminoglicani (GAG) come eparina e eparan solfato.

I GAG sono polimeri lunghi e non ramificati di unità disaccaridiche solfatate con carica negativa con enorme eterogeneità. Costituiscono la parte glicanica

dei proteoglicani e formano una matrice extracellulare caricata negativamente che consente l'interazione con strutture proteiche caricate positivamente.

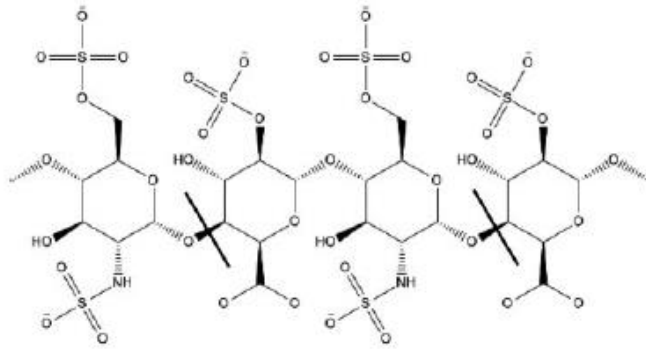


Figura.9 Eparina

I GAG sono componenti critici per l'attività chemiotattica delle chemochine poiché l'interazione chemochina-GAG è indispensabile nella formazione dei gradienti di chemochine. l'interazione con I GAG sono cruciali per la corretta funzione CXCL12 in vivo perché l'interazione con GAG protegge CXCL12 dal troncamento e inattivazione del terminale NH<sub>2</sub> da parte di CD26 una peptidasi. L'indagine strutturale di CXCL12 ha mostrato che un gruppo di aminoacidi caricati positivamente è presente nel primo  $\beta$ -strand della sequenza aminoacidica, cioè nel dominio **BBXB**, dove B sta per un amminoacido basico e X per qualsiasi altro residuo. Nel caso di CXCL12, questo dominio è costituito da Lys24, His25, Leu26 e Lys27, come mostrato nella figura 10

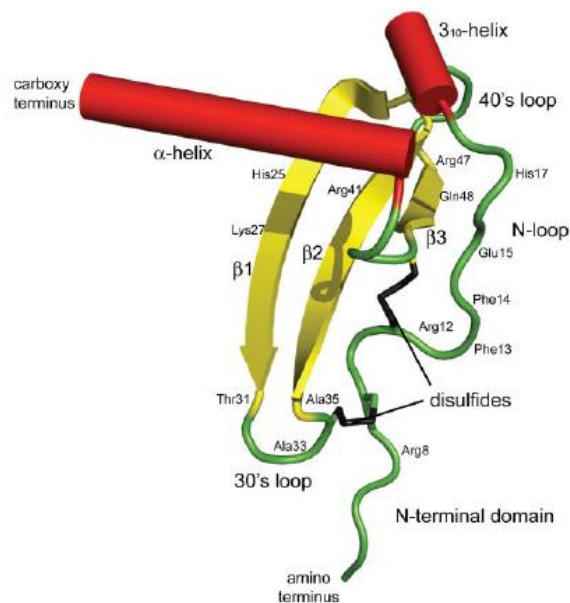


Figura.10 CXCL12-alfa

La modifica di Lys e dei suoi residui in questo dominio in Ser ha comportato un ridotto GAG e il legame delle cellule endoteliali di CXCL12 e una ridotta migrazione transendoteliale di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) in vitro. Inoltre, a causa di questa mutazione, la CXCL12 ha perso la sua potenza per attirare linfociti e monociti.

Anche se questo dominio è indubbiamente necessario per il legame GAG, anche altri aminoacidi carichi positivamente sono coinvolti in questa interazione. È stato dimostrato che il troncamento del terminale NH<sub>2</sub> di CXCL12 da parte di uno o due aminoacidi ha ridotto il potenziale di legame con eparina, poiché viene rimosso un Lys caricato positivamente.

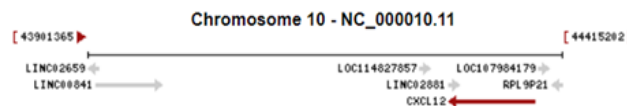
### 1.4 CXCL12 ; Un gene sette isoforme.

Il gene che codifica questa famiglia di chemiochine è presente sul cromosoma 10 sul braccio lungo del cromosoma in corrispondenza della banda 11.21 come riportato nella figura che segue.

Location: 10q11.21

Exon count: 9

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
109.20191205	current	GRCh38.p13 (GCF_000001405.39)	10	NC_000010.11 (44292088..44385097, complement)
<a href="#">105</a>	previous assembly	GRCh37.p13 (GCF_000001405.25)	10	NC_000010.10 (44865601..44880545, complement)



**Figura.11** viene riportata in figura l' informazione relativa al gene codificante le isoforma CXCL12. Il gene codificante risulta essere presente sul filamento 3'→5'

Da un unico gene grazie allo splicing alternativo risultano essere prodotte sette isoforme, CXCL12  $\alpha, \beta, \delta, \gamma, \epsilon, \theta$  e l'isoforma7 predetta computazionalmente.

Lo splicing alternativo è un processo che genera variabilità a partire da un unico pre-mRNA. Questo è possibile perché il messaggero prodotto dal processo di trascrizione in organismi eucariotici porta al riarrangiamento di introni ed esoni durante la formazione di un mRNA così detto maturo. L'mRNA maturo verrà tradotto poi nella relativa sequenza a.a. (amminoacidica) che corrisponderà al prodotto finale , ovvero la proteina.

Lo splicing alternativo può portare al prodotto di proteine che hanno funzioni simili ma che vengono espressi in tessuti diversi in risposta a stimoli diversi e magari in condizioni fisiologiche caratteristiche. In altri casi invece si hanno dei cambiamenti nella sequenza degli a.a. che riflettono un cambiamento in quello che sarà il prodotto proteico e dunque funzionale.

### 1.4.1 MULTIALLINEAMENTO

È stato eseguito un multiallineamento delle isoforme utilizzando le sequenze amminoacidiche riportate in UniProt.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Isoforma-7      KPVSLSYRCPCRFFESHYCTCLIRVSFHGATPLT-----QGSWVLY      41
Isoforma-θ      KPVSLSYRCPCRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE      60
Isoforma-γ      KPVSLSYRCPCRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE      60
Isoforma-β      KPVSLSYRCPCRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE      60
Isoforma-α      KPVSLSYRCPCRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE      60
Isoforma-δ      KPVSLSYRCPCRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE      60
Isoforma-ε      KPVSLSYRCPCRFFESHVARAMVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE      60
                  ***** . . : : ** : .*:

Isoforma-7      SLSCAGGET-----GLREPGPMVSPRVESHQEGRL-----GVPGPVNLG      80
Isoforma-θ      YLEKALNKIWL YGNAETSR-----                          79
Isoforma-γ      YLEKALNKGREEKVGKKEKIGKKRQKKRKAQKR-KN-----          98
Isoforma-β      YLEKALNKRFKM-----                          72
Isoforma-α      YLEKALNK-----                          68
Isoforma-δ      YLEKALNNLISAAPAGKRVIAGARALHPSPPRACPTARALCEIRLWPPPEWSPSPGDV-      119
Isoforma-ε      YLEKALNNC-----                          69
                  *. * .:

Isoforma-7      KA      82
Isoforma-θ      --      79
Isoforma-γ      --      98
Isoforma-β      --      72
Isoforma-α      --      68
Isoforma-δ      --      119
Isoforma-ε      --      69

```

Figura.12 L'allineamento è stato condotto con il Tool Clustal Omega.



Il multiallineamento (Fig.12) è stato condotto con le sequenze amminoacidiche escludendo quelli che all’N-terminale che codificano per il segnale di esportazione. Possiamo notare come ci sia un’alta conservazione all’estremità N-terminale per le varie isoforme cosa invece che non si osserva al C-terminale.

**CXCL12- $\alpha$  è stata caratterizzata e viene di seguito riportata la struttura ottenuta con la spettroscopia a NMR:**

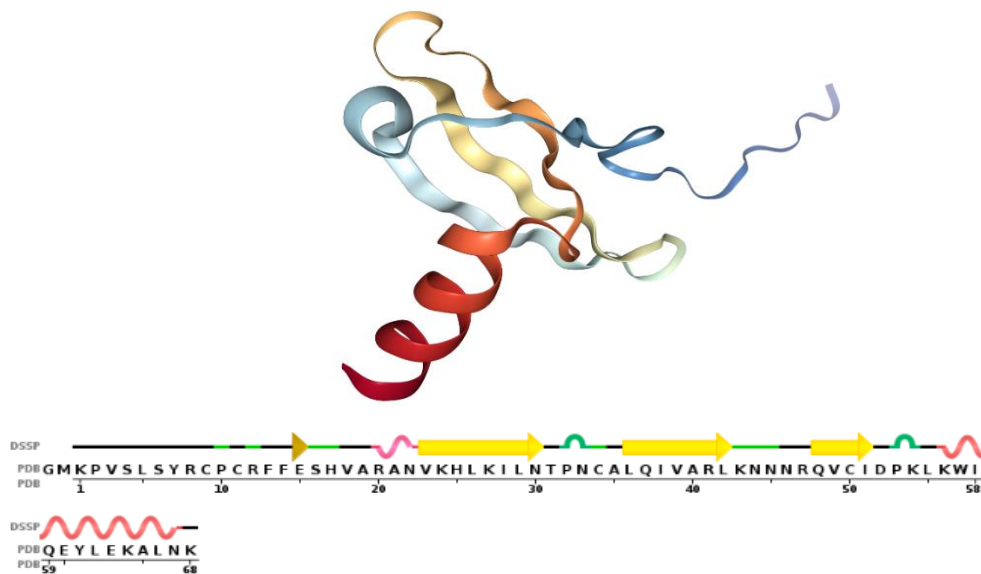


Figura.12 Struttura terziaria e secondaria della CXCL12- $\alpha$ . Sono presenti tre B-strand, un motivo alfa-elica al C-terminale.

### 1.4.2 Caratteristiche generali

Grazie ad alcuni studi effettuati tramite analisi di identificazione e di espressione di queste isoforme nei tessuti umani nè si è compresa la loro distribuzione nei vari tessuti a livello embrionale ed adulto. Questo è un piccolo punto di partenza per poter comprendere quale eventualmente isoforma puo' risultare maggiormente espressa in alcuni casi rispetto ad altri e anomalie per quanto riguarda siti in cui normalmente non sono espresse.

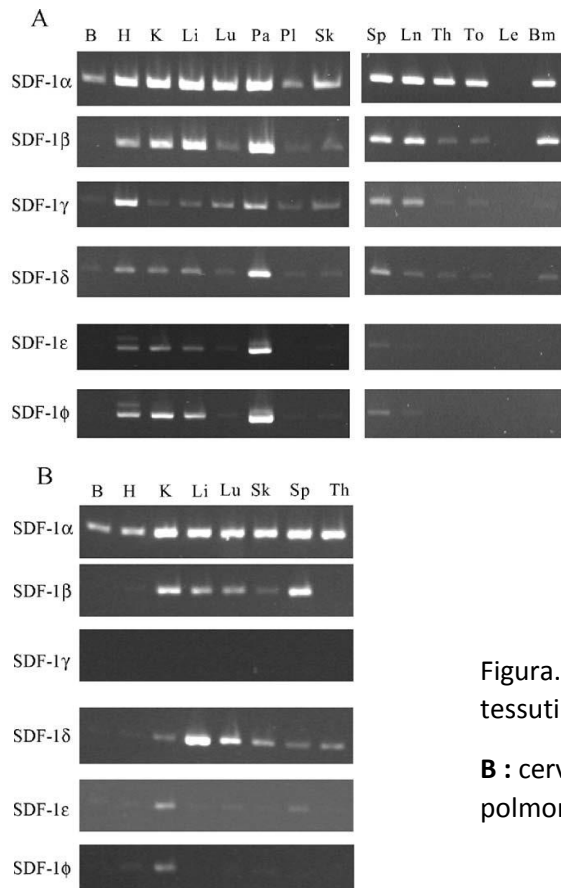


Figura.13 Distribuzione delle isoforme nei vari tessuti.

**B** : cervello; **H** : cuore; **K** : rene; **Li** : fegato; **Lu** : polmone ; **SK**: cute ; **Sp** : milza, **Th** : timo

**Isoforma- $\alpha$**  : non è presente nel circolo sanguigno a causa della sua degradazione enzimatica ma è altamente espressa nei tessuti ( fig13) molto di più nei tessuti adulti rispetto a quelli fetali. L'espressione risulta essere maggiormente presente nel midollo osseo , pancreas , fegato, polmone , cuore, rene , timo, nodi linfatici , sono stati anche osservati nel piccolo intestino , neuroni. Gli studi effettuati in vitro dimostrano come questa isoforma sia importante nel promuovere l'angiogenesi, nel guidare le cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo , nel guidare le cellule germinali durante lo sviluppo e nell' indurre neurostimolazione nel SNC . Nel tumore al seno

risultano essere espresse in basse concentrazioni e ciò corrisponde ad una minor metastadizzazione .

***Isoforma- $\beta$*** : è molto simile strutturalmente e funzionalmente all'isoforma- $\alpha$ . Presenta però delle divergenze al C-terminale ( quarto esone) e presenta quattro a.a. in piu' che risultano essere utili per la sua miglior circolarizzazione a livello vascolare. Questa isforoma non risulta essere degradata dalla carbossipeptidasi N nel sangue. Presenta un motivo strutturale per il legame con HS (eparan solfato). È altamente espresso in organi altamente vascolarizzati come fegato, milza, pancreas midollo osseo, rene, nelle cellule endoteliali e nei tessuti fetali come fegato e polmone. Abbiamo casi in cui la presenza dell'espressione dell'isofoma- $\beta$  nel tumore alla vescica è nota di una cattiva prognosi a differenza della bassa espressione nel tumore al seno che denota una prognosi libera da metastasi e una situazione in cui si ha sopravvivenza senza recidive.

***Isoforma- $\gamma$***  : presenta al C-terminale sequenza che sono necessarie per avere un maggior legame con i GAGs ed è importante per evitare la degradazione proteolitica da parte degli enzimi. Non è espressa nei tessuti fetali ma altamente espressa nei tessuti meno vascolarizzati. In vivo risulta essere quella che maggiormente stimola l'attività chemiotattica. Grazie alla sua miglior stabilità d'interazione si osserva anche una migliore effetto a lungo termine rispetto alle altre isoforme. A livello tumorale sembra essere indice di alcune situazioni cliniche particolari; nel tumore al colon-retto la sua concentrazione è in

relazione alla dimensione del tumore. Nel tumore alla prostata gioca un ruolo importante nell'indurre le cellule staminali ed endocrine verso uno stato canceroso che promuovono la formazione di metastasi , resistenza del tumore agli agenti chemioterapici .

Le caratteristiche e funzioni relative alle altre isoforme sono ancora poco conosciute;

***Isoforma- $\theta$ - $\epsilon$***  : maggiormente espresse nel cuore, rene e fegato;

***Isoforma- $\delta$***  : delta è espressa nel fegato, milza, polmoni e risulta essere altamente espressa nel tumore al seno ed è segno prognostico di una miglior sopravvivenza.

***Isoforma-7*** : *non si hanno ancora dati e rimane ancora predetta.*

### ***1.5 Patologie associate***

Negli ultimi anni le ricerche concentrate su questo gruppo di chemochine hanno fatto emergere la loro importanza in alcune condizioni patologiche ed hanno evidenziato in loro un'attività come fattore mitogeno. Inoltre essendo esse ligandi del recettore cxcr4 la loro importanza e dunque il loro studio risulta essere fondamentale per comprendere alcuni processi come: sviluppo encefalico, cardiovascolare e nella formazione di masse tumorali e non solo

### ***1.5.1 HIV : sdf1 e cxcr4***

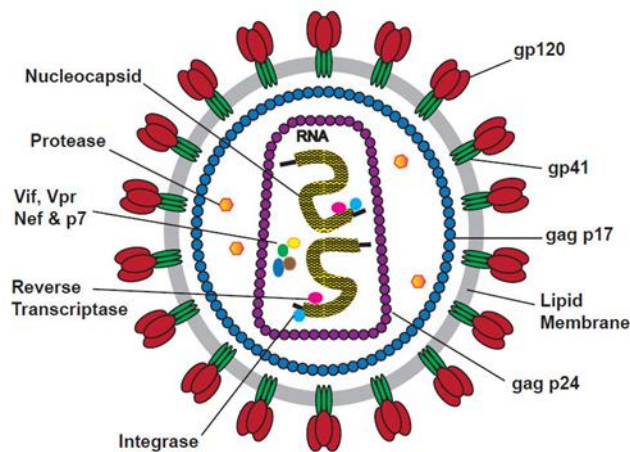
Il virus dell'immunodeficienza umana conosciuto come HIV, è un virus che appartiene alla famiglia dei Retrovirus, possiede delle caratteristiche peculiari rispetto a tutte le altre famiglie conosciute. Parliamo di retrovirus appunto perché presentano associato al loro genoma ad RNA una particolare polimerasi chiamata RETROTRASCRIPTASI, capace di retrotrascrivere il genoma a rna in DNA.

Che legame c'è tra HIV e le chemochine ?

Ciò che li accomuna è che entrambi sono dei ligandi per lo stesso recettore, CXCR4.

Come descritto anche in precedenza, la famiglia CXCL12 ha un'affinità di legame quasi esclusiva per il suo recettore CXCR4.

Mentre per HIV il recettore CXCR4 risulta essere fondamentale per il processo di internalizzazione nella cellula ospite durante le fasi iniziali del proprio ciclo replicativo. Partendo dalla descrizione della struttura del virione, osserviamo la presenza di strutture glicoproteiche dove le gp120 e gp41 risultano essere fondamentali per il processo d'infezione.



L'internalizzazione del virus Avviene in cellule che esprimono la molecola CD4 che è il recettore per la gp120 dell'envelope

– linfociti T, monociti, macrofagi, cellule dendritiche e della microglia

È anche indispensabile l'interazione con un corecettore;

- CCR5 (macrofagi e linfociti e RANTES) - Ceppi macrofagotropici, NSI, R5-tropici
- CXCR4 (linfociti, SDF-1) - Ceppi linfotropici, SI, X4-tropici

L'interazione di gp120 con i recettori provoca una modifica della conformazione di gp41 che media la fusione tra cellula ed envelope virale e Il virus entra quindi per FUSIONE.

Alcuni studi hanno dimostrato che CXCL12 / SDF-1 ha potentemente impedito l'accumulo di DNA provirale HIV caratteristica necessaria per l'infezione produttiva. l'attività anti-HIV-1 di CXCL12 ha coinvolto l'esaurimento di

CXCR4 sulla superficie cellulare e la sua capacità di indurre l'internalizzazione di CXCR4. Dunque l'azione anti-HIV di CXCL12 si basa su meccanismi che prevedono la competizione per i siti di legame e l'internalizzazione del recettore indotta da CXCL12. CXCL12 $\gamma$ , un chemioattrattore più debole, è il più potente inibitore dell'infezione da HIV-1 in vitro tra le varie CXCL12. La potenza anti-HIV-1 è correlata al numero di domini BBXB che conferiscono il legame GAG presenti in ciascuna variante CXCL12 e dunque più stabile.

### ***1.5.2 Cancro***

Cxcr4 è il recettore per chemochine maggiormente espresso in più di 23 tumori umani che includono tumore al seno, ovarico e tumore prostatico (PCa) e di notevole importanza dato che normalmente la sua espressione è bassa e assente in situazioni normali.

Le chemochine e i loro recettori sono associati alla progressione del cancro. L'inattivazione dei geni soppressori tumorali e la continua stimolazione di oncogeni creano alcuni disequilibri sulla produzione di molti fattori/molecole tra cui le chemochine e i loro recettori e vengono a creare un microambiente favorevole per la crescita delle cellule tumorali e delle loro metastasi.

### ***1.5.3 Sistema nervoso centrale:***

CXCL12 risulta essere indispensabile per lo sviluppo del sistema nervoso centrale SNC. È IMPORTANTE PER LA CORRETTA organizzazione della

corceccia cererale regolando la migrazione delle cellule neuronali progenitrici. Per il corretto sviluppo assonale dei neuroni. Nell'adulto è anche importante per la neurogenesi per il legame cxcr4 e cxcl12. Per il recettore ackr3 sembra essere importante per mantenere il giusto equilibrio per le cxcl12 mantenendo l'omeostasi quando il sangue arriva alla barriera ematencefalica.

Ne consegue che molte malattie neurodegenerative come: Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica e la sclerosi multipla risultano essere correlate al disequilibrio tra l'asse cxcl12/cxcr2/ackr3.

Hanno un ruolo importante anche in altre patologie come ,malattie reumatiche,malattie sistemiche (lupus),malattie oculari,malattie respiratorie

CXCL12 è espresso in modo costitutivo e onnipresente ed è spesso considerata una chemochina omeostatica. Tuttavia, le malattie prima elencate mostrano una maggiore espressione di CXCL12 in generale o a upregulation specifico di una delle varianti di giunzione CXCL12. Questo suggerisce che CXCL12 potrebbe essere classificato come chemochina infiammatoria.



## ***Scopo:***

Le *proteine CXCL12* appartengono alla famiglia CXC delle chemochine, risultano essere costitutivamente espresse ed intervengono in numerosi processi fisiologici sia durante lo sviluppo a livello embrionale sia nell'adulto regolandone l'omeostasi cellulare. Ad oggi sono ampiamente studiate per definire a fondo il ruolo che assumono in determinate condizioni fisiologiche e patologiche. Le chemochine CXCL12 sono presenti in sette varianti diverse, ottenute tramite splicing alternativo, le quali vengono espresse in modo differenziale a livello dei vari tessuti e in condizioni fisiologiche caratteristiche.

Il nostro lavoro svolto presso il New York - Marche Structural Biology Center (NY-MaSBiC) si è concentrato sulla produzione delle CXCL12 per via ricombinante, parte integrante di un progetto in collaborazione con il laboratorio del Prof. Francesco Piva.

Partendo dalle informazioni presenti in letteratura sono state valutate le strategie di clonaggio ed espressione più idonee per le sette isoforme, tra cui la scelta del vettore di espressione, del sistema cellulare per la produzione e purificazione proteica.

In questa tesi verranno trattate nello specifico l'approccio gli approcci di purificazione per le isoforme- $\beta$  e  $\delta$ .

## **MATERIALI E METODI**

## **Materiali e Metodi**

### **2. *Produzione di proteine ricombinanti:***

La produzione di proteine ricombinanti prevede l'espressione eterologa in organismi ospite. Per espressione eterologa si intende la produzione di proteine specifiche in organismi che normalmente non la esprimono. Questo è possibile grazie all'utilizzo di tecniche di ingegneria genetica che prevedono la sintesi del gene d'interesse, il quale codifica per la specifica proteina. Il gene viene poi clonato all'interno di un vettore che permette l'espressione della proteina in un sistema ospite. Si possono utilizzare diversi tipi cellulari dai più semplici ai più complessi come batteri, lieviti, cellule di mammifero o di insetto. La selezione su questa vasta gamma di sistemi cellulari si basa sulle caratteristiche della proteina, in quanto alcune proteine espresse dalle cellule eucariotiche spesso subiscono alcune modifiche post-traduzionali come glicosilazione, fosforilazione, acilazione e molte altre, che sono fondamentali per dar vita ad un prodotto proteico funzionalmente attivo. Solo nel caso in cui la proteina d'interesse non presenta queste modifiche, si può utilizzare il sistema di espressione procariotico. *Escherichia coli* è uno dei sistemi batterici più usati perché è in grado di dare una resa proteica finale maggiore rispetto ai sistemi eucariotici. Tra i vantaggi di questo sistema ci sono un minor costo per quanto riguarda i terreni di crescita, la strumentazione e la manipolazione delle cellule risulta essere più semplice. Uno svantaggio legato all'elevata sovra-

espressione riguarda la possibile formazione di aggregati proteici poco solubili (chiamati corpi di inclusione), formati dalla proteina ricombinante non correttamente ripiegata. Anche in questo caso si può ottenere la proteina ricombinante, ma per la solubilizzazione e/o purificazione occorrono elevate concentrazioni di agenti denaturanti. Questo trattamento compromette l'attività biologica della proteina ricombinante che deve essere ripristinata con opportune soluzioni (refolding) e trattamenti, non sempre facilmente identificabili; questo comporta in genere una resa molto limitata in termini di proteina funzionalmente attiva. Quest'ultima problematica può essere risolta aiutando la solubilità del prodotto con l'utilizzo di Tag specifici.

### ***2.1 Analisi delle caratteristiche dei sistemi di espressione***

Un vettore di espressione per organismi procarioti deve contenere una serie di elementi genetici perfettamente configurati, i quali influenzano gli aspetti trascrizionali e traduzionali legati alla produzione della proteina. Inoltre, l'aggiunta di un gene che conferisce antibiotico-resistenza facilita la selezione del vettore.

I componenti essenziali associati ad un sistema di espressione sono:

- **Promotore:** viene utilizzato per dare inizio alla trascrizione ed è posizionato a monte della sequenza che codifica per la proteina di interesse; generalmente ha la caratteristica di essere inducibile e, quindi, la trascrizione ha inizio solo

nel momento in cui viene aggiunto un induttore specifico. Inoltre, questo elemento deve avere caratteristiche che favoriscano al massimo l'espressione come ad esempio un basso livello trascrizionale basale ma anche un'induzione semplice e conveniente.

- **Terminatore di trascrizione:** Il terminatore viene posizionato dalla parte opposta rispetto al promotore, a valle della sequenza, e determina il blocco della trascrizione.

- **Origine di replicazione:** Questa sequenza viene utilizzata per dare il via alla replicazione del DNA e determina il numero di copie del gene clonato.

- **Resistenza ad antibiotico (marker di selezione):** I marcatori di resistenza vengono utilizzati per conferire maggiore stabilità al sistema di espressione e possono essere di vari tipi; generalmente la resistenza conferita avviene nei confronti di antibiotici quali ampicillina, tetraciclina o cloramfenicolo.

- **Utilizzo dei codoni :** I codoni vengono utilizzati per porre fine al processo di traduzione e lo migliorano aumentandone l'efficienza.

- **Shine/Dalgarno:** sequenza necessaria per la traduzione che viene riconosciuta dal 16S della subunità minore del ribosoma per il legame con l'mRNA.

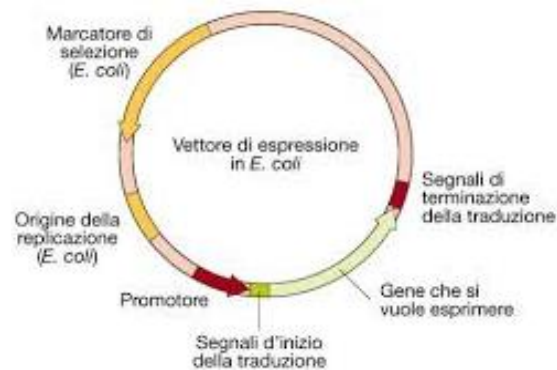


Figura.1 Rappresentazione di un vettore di espressione.

Tra i vettori in uso nel nostro laboratorio abbiamo scelto di usare quelli della serie pMCSG originariamente prodotti dal Midwest Center for Structural Genomics (MCSG), modificati all'NYCOMPS con l'aggiunta di 4 istidine per un totale di 10(His) all'estremità N-terminale.

## 2.2 Vettori di clonaggio ed espressione.

### 2.2.1 Il vettore pMCSG7

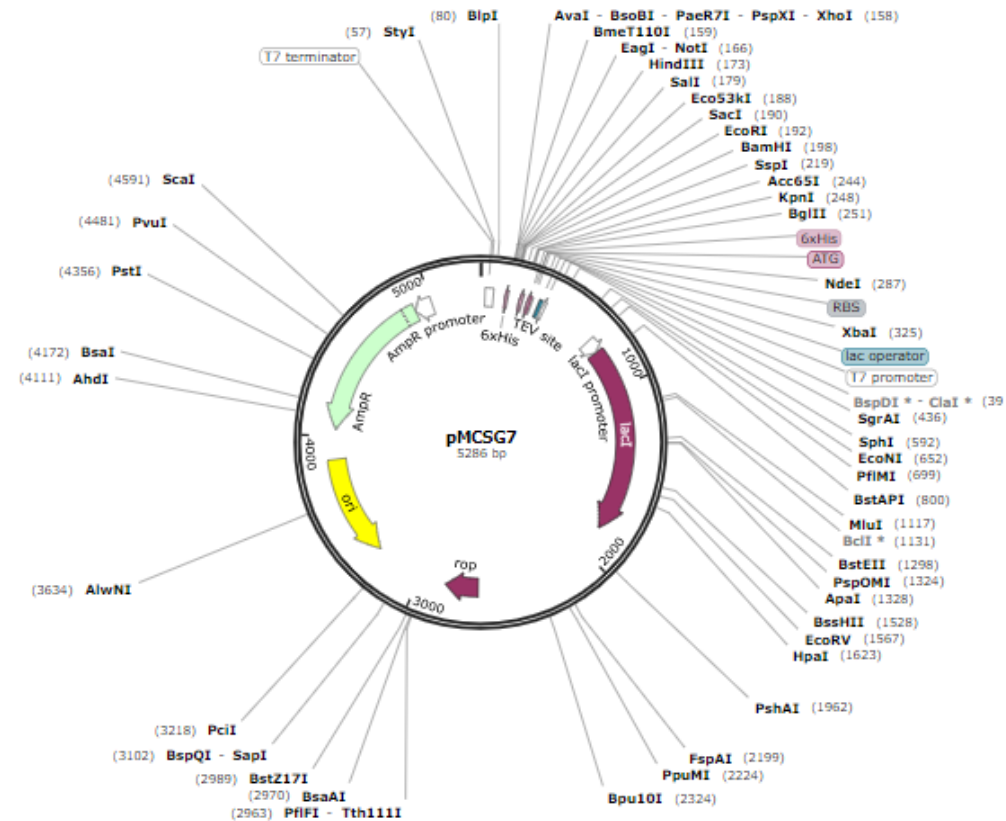


Figura.2 Mappa del vettore pMCSG7.

Il vettore per l'espressione eterologa possiede delle sequenze necessarie per una corretta espressione della proteina ricombinante ed elementi necessari per l'acquisizione della sequenza da codificare.

In questo caso il vettore possiede :

- ✦ promotore forte di T7, promotore del gene 10 del batteriofago T7;

- ✦ operatore lac, per controllo produzione e induzione del gene target;
- ✦ sequenze RBS, per la traduzione;
- ✦ 10X His-tag, per purificazione proteina di interesse;
- ✦ sito di taglio TEV, proteasi;
- ✦ sito di clonaggio LIC;
- ✦ codone di STOP;
- ✦ terminatore di T7.

I vettori appena descritti possono essere utilizzati sia come vettori di clonaggio sia come vettori di espressione date le caratteristiche precedentemente elencate.

### ***2.2.2 Modifiche strutturali del vettore pMCSG7(10 His).***

In questo caso il vettore viene utilizzato per il clonaggio e l'espressione di una famiglia di citochine, le chemochine. Queste proteine risultano essere molto importanti per studi *in vitro* data la loro notevole importanza in alcuni processi patologici. L'attività di queste proteine viene esplicitata dalla loro capacità di legare alcuni recettori transmembrana attraverso la loro estremità N-terminale mentre il C-terminale prende contatti con altri elementi regolativi extracellulari.



Considerando che le citochine CXCL12 richiedono l’N-terminale naturale per la loro funzione, i vettori pMCSG7 e 9 sono stati modificati introducendo il sito di taglio per l’enterochinasi al posto della TEV (Fig.3), in quanto quest’ultima non risulta effettuare un taglio netto, lasciando due residui a.a. all’estremità N-term della proteina presa in esame.

Date le modifiche della sequenza riconosciuta dalla proteasi, è stato anche necessario modificare la sequenza riconosciuta dall’enzima di restrizione per la linearizzazione del plasmide (Fig.3), che ha richiesto anche la modifica del sito BseRI al posto di SspI.

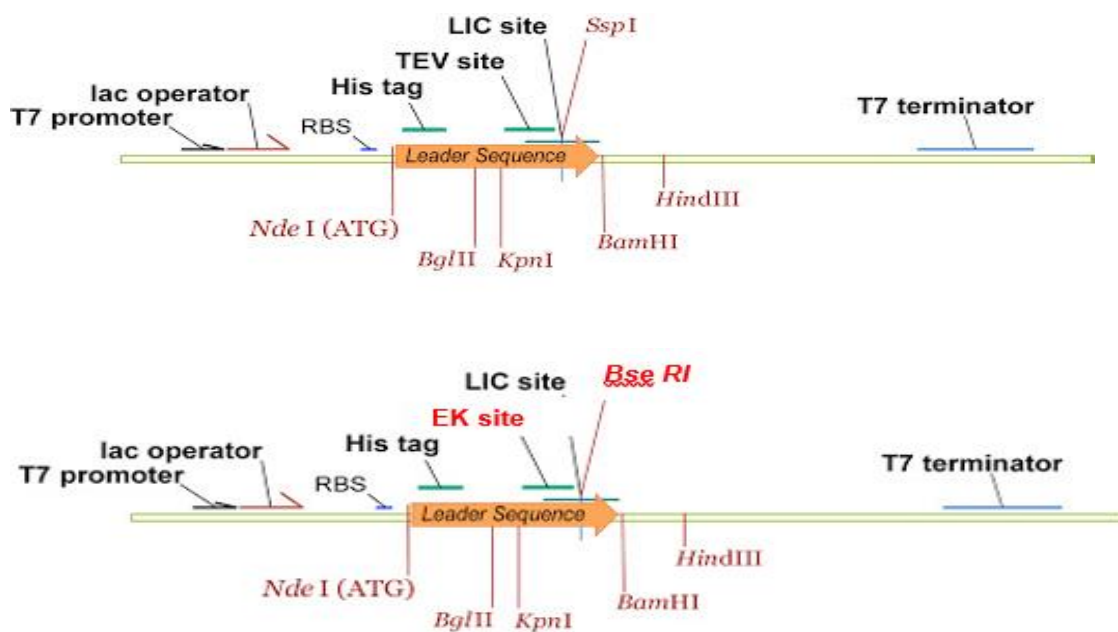


Figura.3 Modifiche del vettore pMCSG7 in p7-EK.

L'enterochinasi è una specifica proteasi che taglia la sequenza amminoacidica in corrispondenza del residuo K ovvero la lisina. La sequenza che riconosce è la seguente:

Asp-Asp-Asp-Asp-Lys▼

D - D - D - D - K

A differenza di altre proteasi, l'enterochinasi ( EK ) non lascia nessun residuo a.a. dopo la sua attività dunque non altera la sequenza del prodotto finale. L'applicazione può essere estremamente vantaggiosa per la produzione di una sequenza proteica nativa al 100%.

### ***2.2.3 Vettore pMCSG9.***

Il vettore pMCSG9 deriva dal vettore pMCSG7, presentano dunque le stesse caratteristiche ma con l'aggiunta di una sequenza, posta a valle delle code His-Tag, che codifica per la maltose binding protein (MBP). La MBP è un target presente all'N-terminale che viene utilizzato per aumentare la solubilità della proteina durante l'espressione in sistemi procariotici, limitando la formazione dei corpi d'inclusione.

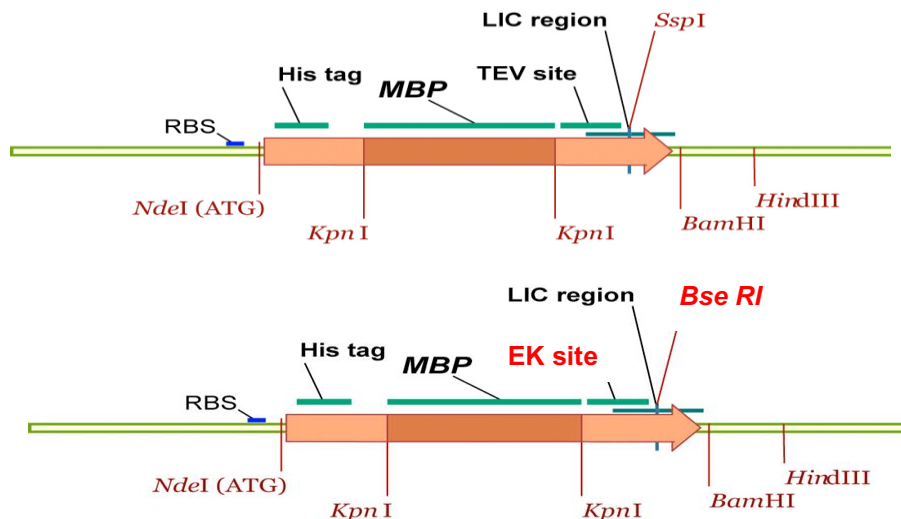


Figura.4 Modifiche del vettore pMCSG9 in p9-EK.

*I vettori utilizzati presentano le modifiche prima citate e dunque da ora in poi verranno chiamati p7-EK e p9-EK.*

### **2.3 Propagazione del vettore p7-EK in cellule competenti, le GC-5.**

Prima del clonaggio si effettua il passaggio che prevede la propagazione del vettore, utilizzando cellule competenti le GC-5. Circa 10ng di plasmide p7-EK sono stati usati per trasformare 50ul di cellule. Le cellule sono state trasformate tramite shock-termico, che prevede di lasciare le cellule 15 minuti in ghiaccio, 45 secondi a 42°C (nel bagnetto termostato) e incubate altri 2 minuti in ghiaccio. Vengono poi aggiunti 950ul di S.O.C Medium per la ripresa delle cellule, lasciate poi incubare per circa 1 ora.

Prima del pre-inoculo viene effettuata una centrifuga a 500g per 5 minuti, il sovrnatante verrà allontanato dal pellet formato. Il pellet viene risospeso per poi effettuare la semina su terreno solido LB+ Amp (100 ug/ul) incubazione

over night a 37°C. Le colonie che cresceranno sono quelle che hanno acquisito il plasmide dato che esso conferisce la resistenza all'ampicillina. Una colonia viene presa per preparare il pre-inoculo in 5ml LB+Amp dopo incubazione la si utilizza per inoculare una quantità maggiore dello stesso terreno, 50ml e lasciati over night in agitazione a 37°C. Si ottiene così una quantità maggiore delle cellule che presentano il plasmide da utilizzare per il clonaggio che verrà successivamente purificazione dalle stesse cellule utilizzando un kit per l'estrazione.

#### ***2.4 Purificazione del plasmide mediante QIAprep Spin Miniprep Kit***

MINI PREP (MINIPREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO, fino a 10ml di coltura): kit **QIAprep Miniprep** e permette la rapida estrazione di DNA plasmidico, subito disponibile all'uso ed eluito in un piccolo volume.

Il metodo si basa sulla lisi alcalina delle cellule batteriche seguita dall'assorbimento del DNA su membrana di silice.



Figura.5 schematizzazione del protocollo di purificazione del plasmide.

## ***2.5 Analisi delle sequenze***

### ***2.5.1 Sequenze delle isoforme CXCL12***

Tramite l'utilizzo di banche dati si può risalire a quella che è la sequenza nucleotidica codificante per un determinato prodotto proteico e tutte le informazioni relative ad esso. In questo caso si può notare che partendo da un gene si ottengono sette prodotti diversi. L'eterogenità del prodotto finale è il risultato della variabilità genetica ottenuta tramite un processo che viene chiamato splicing alternativo. Il riarrangiamento dei vari esoni ed introni presenti sul pre-mRNA danno vita a 7 trascritti maturi che codificano per sette proteine diverse. Il gene preso in esame codifica per proteine che appartengono ad una famiglia di citochine, le CXCL12.

Vengono riportate di seguito le sequenze nucleotidiche;

- **NucleotideSequence(270nt):alfa**

```
ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCT
GCCTCAGCGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCC
GATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAT
TCTCAACACTCCAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAAC
ACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAGGAG
TACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGTAA
```

- **Nucleotide Sequence (282 nt): beta**

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCT  
GCCTCAGCGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCC  
GATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAT  
TCTCAACACTCCAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAAC  
AACACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAGGAG  
TACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGAGGTTCAAGATGTGA

- **Nucleotide Sequence (360 nt): gamma**

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCG  
CCTCAGCGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCG  
ATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAT  
CTCAACACTCCAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACA  
ACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAGGAGT  
ACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGGGGCGCAGAGAAGAAAAGTGGGG  
AAAAAAGAAAAGATAGGAAAAAAGAAGCGACAGAAGAAGAGAAAGG  
CTGCCAGAAAAGGAAAACTAG

- **Nucleotide Sequence (423 nt): delta**

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCT  
GCCTCAGCGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCC  
GATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAT  
TCTCAACACTCCAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAAC  
AACACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAGGAG  
TACCTGGAGAAAGCTTTAAACAACCTGATCAGCGCCGCACCAGCCGGG  
AAGAGGGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCCTGCATCCCTCTCCTCCAGGG

CCTGCCCCACAGCTCGGGCCCTCTGTGAGATCCGTCTTTGGCCTCCTCCA  
GAATGGAGCTGGCCCTCTCCTGGGGATGTGTAA

- **NucleotideSequence(312nt):iso7**

ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCT  
GCCTCAGCGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCC  
GATTCTTCGAAA GCCATTATTGTA CTTCCTTATTAGAGTGTCTTTCCAC  
GGAGCCACTCCTCTGACTCAGGGCTCCTGGGTTTTGTATTCTCTGAGCTG  
TGCAGGTGGGGAGACTGGGCTGAGGGAGCCTGGCCCCATGGTCAGCCC  
TAGGGTGGAGAGCCACCAAGAGGGACGCCTGGGGGTGCCAGGACCAGT  
CAACCTGGGCAAAGCCTAG

**Epsilon e theta** : le sequenze nucleotidiche sono state ottenute tramite tool bioinformatici.

### ***2.5.2 Sequenze sintetiche.***

I colori ci indicano gli esoni colorati in nero e gli introni colorati in azzurro.

Una volta ottenute le sequenze tramite ricerche bioinformatiche è stata commissionata la sintesi delle sequenze ad una ditta esterna, la GenSript.

### ***2.5.3 Sequenze clonate di CXCL12***

Per la sintesi della forma matura del prodotto proteico si è omessa una sequenza al 5' che codifica il peptide leader (ATGAACGCCAAGGTCGTG GTCGTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGG).

Il peptide leader è un segnale di secrezione utilizzato dalla cellula eucariotica

per l'esportazione del prodotto nell'ambiente extracellulare. Un segnale che dunque in un sistema procariotico non risulta essere utile perché esso non riconosce questa sequenza per la relativa funzione. La forma matura viene ottenuta disegnando un appropriato primer ;

- FORWARD : è stato costruito a valle dell'ATG d'inizio tralasciando la leader peptide.
- REVERSE : sono specifici al 3' per la presenza di sequenze diverse.

Quindi le sequenze clonate sono :

- **Nucleotide Sequence alfa :**

```
AAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT  
TGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAAACTGTGCC  
TTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCG  
AAGCTAAAGTGGATTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGTAA
```

- **Nucleotide Sequence Beta :**

```
AAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT  
TGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAAACTGTGCC  
TTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCG  
AAGCTAAAGTGGATTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGAGGTTCA  
AGATGTGA
```

- **Nucleotide Sequence gamma :**



AGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTT  
GCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAATTCTCAAACTCCAACTGTGCCCT  
TCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGA  
AGCTAAAGTGGATTACAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGGGGCGCAG  
AGAAGAAAAGTGGGGAAAAAAGAAAAGATAGGAAAAAGAAGCGACAGAA  
GAAGAGAAAGGCTGCCCAGAAAAGGAAAAACTAG

- **Nucleotide Sequence Delta :**

AAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT  
TGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAATTCTCAAACTCCAACTGTGCC  
TTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCG  
AAGCTAAAGTGGATTACAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAACCTGATCAG  
CGCCGCACCAGCCGGGAAGAGGGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCCTGCATCCCT  
CTCCTCCCAGGGCCTGCCCCACAGCTCGGGCCCTCTGTGAGATCCGTCTTTGGC  
CTCCTCCAGAATGGAGCTGGCCCTCTCCTGGGGATGTG

- **Nucleotide Sequence Iso7 :**

AAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATTA  
TTGTACTIONGCCTTATTAGAGTGTCTTTCCACGGAGCCACTCCTCTGACTCAGGG  
CTCCTGGGTTTTGTATTCTCTGAGCTGTGCAGGTGGGGAGACTGGGCTGAGGG  
AGCCTGGCCCCATGGTCAGCCCTAGGGTGGAGAGCCACCAAGAGGGACGCCT  
GGGGGTGCCAGGACCAGTCAACCTGGGCAAAGCCTAG

**Sono riportate anche le relative sequenze amminoacidiche:**

CXCL12- $\alpha$

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLK  
WIQEYLEKALNK

CXCL12- $\beta$

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLK  
WIQEYLEKALNKRFBKM

CXCL12- $\gamma$

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLK  
WIQEYLEKALNKGREEKVGKKEKIGKKKRQKKRCAAQKRKN

CXCL12- $\delta$

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLK  
WIQEYLEKALNKLISAAPAGKRVIAGARALHPSPPRACPTARALCEIRLWPPPEWS  
WSPGDV

CXCL12-Iso7

KPVSLSYRCPCRFFESHYCTCLIRVSFHGATPLTQGSWVLYSLSCAGGETGLREPGP  
MVSPRVESHQEGRLGVPGPVNLGKA

Theta e epsilon : le sequenze nucleotidiche sono state ottenute tramite tool bioinformatici.

## **2.6 LIGATION INDIPENDET CLONING : LIC**

Il clonaggio indipendente dalla ligazione è una tecnica utilizzata per creare il costrutto da cui si farà riferimento per ottenere l'espressione della CDS d'interesse, in questo caso le chemochine CXCL12.

È una tecnica che veloce, poco costosa ma di grande efficienza. Si basa sull'utilizzo della polimerasi T4 la quale ha attività

5 → 3' polimerasica

3' → 5' esonucleasica

Quest'ultima rimuove in condizione di assenza o carenza di specifici dNTP i nucleotidi all'estremità 3'—5', Infatti, nel caso in cui sia presente un unico dNTP, la polimerasi taglia tutti i dNTP della sequenza nucleotidica, arrestandosi in prossimità del dNTP specificato, portando alla formazione di estremità sfalsate (sticky ends).

Il clonaggio prevede l'utilizzo delle sequenze lic presenti sul vettore ma prima di procedere con la tecnica della LIC bisogna amplificare le sequenze che diventeranno poi inserti LIC.

La tecnica prevede la preparazione del vettore per ure dell'inserto prima della loro incubazione.

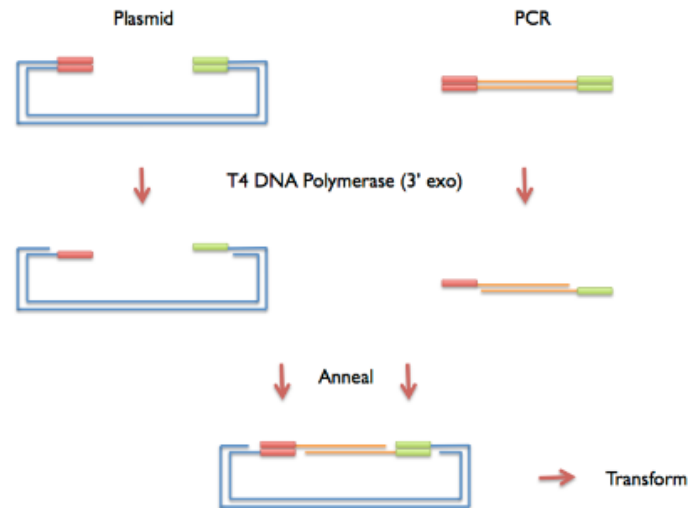


Figura.6 Schema generale del Clonaggio Indipendente dalla Ligazione , LIC.

### **2.6.1 Trattamento del vettore di clonaggio**

Il vettore viene preparato usando un'enzima di restrizione che mi permette di effettuare un taglio per ottenere le estremità accessibili per l'attività da parte della t4 polimerasi. L'enzima di restrizione usato è BseRI sia pe p7-EK che p9-EK dato che presentano la stessa sequenza.

Dopo l'attività dell'ER, il vettore viene incubato con la T4 polimerasi e un eccesso di dTTP in modo da ottenere le estremità sporgenti per la successiva reazione di annealing con l'inserto appositamente trattato.

<b>Restriction Site Sequence:</b>	<b>Restriction Site Sequence After Cut:</b>	<b>reaction conditions</b>	<b>Heat Denaturation:</b>	<b>Genomic source:</b>
<b>GAGGAGNNNNNNNNNNN CTCCTCNNNNNNNNNNN</b>	GAGGAGNNNNNNNNNN N CTCCTCNNNNNNNNN NNN	<b>37°C</b>	BseRI can be denatured by heating at 65°C for 20 minutes	<i>Bacillus</i> species R is the genomic source for BseRI

TABELLA.1 Caratteristiche dell'enzima di restrizione BseRI

### **2.6.2 INSERTO**

Tramite l'uso di primer e della PCR vengono prodotti gli inserti che devono essere complementari alle sequenze del vettore, le quali sporgono e sono disponibili per complementarsi con le sequenze prodotte.

La prima operazione è la progettazione dei primer per l'amplificazione del gene target. In base al vettore prescelto che contiene specifiche sequenze LIC si disegnano dei primer forward e reverse che contengono circa 18 nucleotidi

specifici per complementare le sequenze LIC presenti nel vettore e altri 16-18 nucleotidi specifici per la regione codificante del gene da clonare (dall'ATG d'inizio al segnale di terminazione): al termine della PCR il gene possiede alle estremità delle estensioni di circa 18 nucleotidi necessarie per il clonaggio. Al termine dell'amplificazione è necessario valutare se il prodotto dell'amplificazione è ottimale per il successivo clonaggio (quantità adeguate e controllo del peso molecolare). L'inserto si ottiene andando ad utilizzare dei primer che presentano la propria testa, estremità 5' complementare alla sequenza nucleotidica da amplificare mentre le code, estremità 3' presentano una sequenza da aggiungere e che risulta questa volta complementare all'estremità sporgente del vettore.

### **2.6.2.1 AMPLIFICAZIONE INSERTO.**

Allestita reazioni di PCR: **ACCURA** (0,5U) con utilizzo di dNTPs kit ACCURA.

**ACCURA (dNTPs kit ACCURA):**

<b>2x HF Reaction Buffer</b>	<b>25 µL</b>
<b>dNTPs (2,5mM each)</b>	5 µL
<b>pF/R (5µM each)</b>	10 µL
<b>DNA (δ 1/1000)</b>	2 µL
<b>ACCURA (2U/µL)</b>	0,5 µL
<b>H2O</b>	8,5 µL
<b>Volume tot.</b>	50 µL

- **PRIMER MIX PER OGNI ISOFORMA**

F delta Lic (100 µM): 5 µl \* 7 campioni (primer uguale per tutti)

R specifico (100 µM): 5 µl each + H2O 90 µl MIX PRIMER

**PROTOCOLLO ACCURA per PCR:**

- 94°C per 1 min
- 94°C per 15 sec
- 60°C per 15 sec (annealing)
- 72°C per 1 min
- 72°C per 10 min (estensione)

Conduco la PCR per 30 cicli

Analisi delle isoforme tramite gel di agarosio ed estrazione del DNA dal gel e dai prodotti di PCR utilizzando il kit NucleoSpin Gel & PCR clean-up.

### **2.6.2.2 INSERTI LIC**

Partendo dalle sequenze amplificate si incubano i prodotti di PCR in presenza di eccesso di dATP questo perché verranno eliminate e quindi stimolata l'attività 3' → 5' esonucleasica fin quando la polimerasi non incontra la base purina A.

La reazione viene allestita in PCR come segue:

<b>DNA (≈200ng)</b>	<b>μL2.0</b>
<b>Di ogni iso</b>	
<b>NEB buffer 5x</b>	<b>μL2.0</b>
<b>dATP (25mM)</b>	<b>μL1.0</b>
<b>T4 pol NEB (1/8)</b>	<b>μL1.0</b>
<b>H2O</b>	<b>μL4.0</b>
<b>VOLUME TOT</b>	<b>μL10.0</b>

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

Incubazione in PCR: 22°C per 1h + 75°C per 20 min (inattivazione)



Alla fine verranno incubati vettore ed inserto ;

<b>VL</b>	<b>μL2.0</b>
<b>Inserto</b>	<b>μL2.0</b>

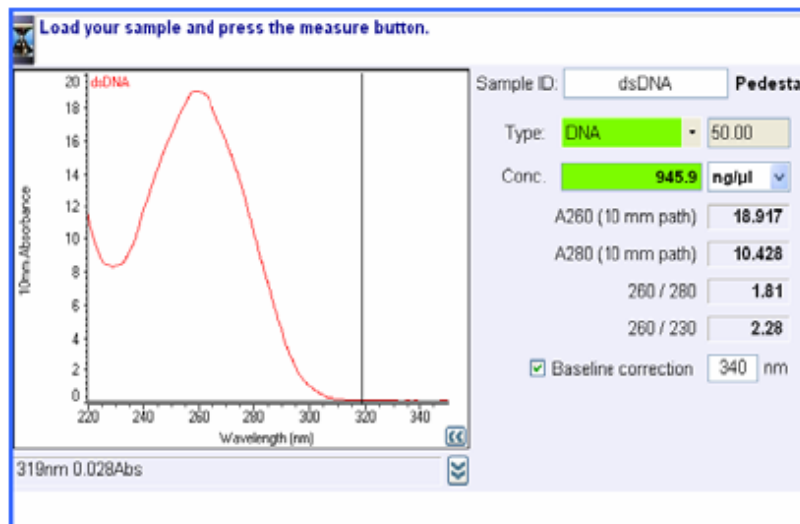
Fase di annealing, lasciare a T ambiente per 30 min.

Aggiungere 2μL di EDTA 25 Mm e lasciare a T ambiente per 5 minuti.

Aggiungere 4μL H2O ambion; volume finale 10μL

## 2.7 Spettrofotometro, il NanoDrop

Il **NanoDrop** è uno spettrofotometro che ci permette di quantificare dei campioni di diversa natura, utilizzando dei micro volumi e svincolandosi dall'utilizzo delle classiche cuvette. E' composto da una parte strumentale e da un software da installare in un computer. Utilizzare 1 μl di tampone sulla



superficie inferiore ottica per tarare la macchina e dando in questo modo un controllo “a vuoto”, dispensare 1  $\mu$ l di campione di acido nucleico sulla superficie ottica dando il comando al computer, il software misura l’assorbanza alle diverse lunghezze d’onda e calcola automaticamente il rapporto di concentrazione e purezza del campione. In base alle diverse lunghezze d’onda dei diversi composti (260 nm per gli acidi nucleici, 230 nm per i polisaccaridi, 280 nm per le proteine) è possibile avere delle indicazioni sulla qualità dei campioni estratti e purificati. Per esempio, il rapporto tra le due assorbanze 260/280 deve essere  $\sim 1,8$  per il DNA e  $\sim 2,0$  per l’ RNA.

Rapporti di purezza significativamente differenti possono indicare la presenza di proteine, fenolo o altri contaminanti che assorbono fortemente nei pressi di 280 nm. Il rapporto di purezza tra le assorbanze a 260/230 è una seconda misura di controllo del DNA, che deve essere compreso tra 1,8 e 2,2. Rapporti di purezza che sono significativamente inferiori ai valori attesi possono indicare che la tecnica di estrazione e purificazione dell’acido nucleico utilizzato può richiedere un’ulteriore ottimizzazione.

## ***2.8 PURIFICAZIONE DI PRODOTTI DI PCR ED ESTRAZIONE DNA DA GEL DI AGAROSIO***

Per vettore linearizzato e per inserti amplificati Il kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**: permette due applicazioni con un unico kit dotato di un buffer adatto; il volume di eluizione è minimizzato (circa 15µL) determinando l'ottenimento di DNA altamente concentrato.

Per l'estrazione viene utilizzata una membrana a scambio anionico, di gel di silice, che espone cariche positive che interagiscono con le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA, legandolo; in sostanza la tecnica usata è quella della cromatografia a scambio ionico attraverso membrane.

## ***2.9 Trasformazione mediante heat-shock termico delle cellule competenti GC-5.***

Esistono vari metodi per poter trasformare le cellule competenti ovvero cellule **idonee per accettare materiale genetico.**

Per quanto riguarda i metodi di trasformazione possiamo dividerli in metodi fisici come l'elettroporazione, la microiniezione e lo shock termico; per i metodi chimici per esempio la trasformazione con CaCl<sub>2</sub> o metodi biologici come la lipofezione. Bisogna tener conto di quella che è chiamata efficienza di trasformazione, ovvero il numero di cellule che vengono trasformate ad ogni processo. In realtà questo dipende non solo dalla tecnica utilizzata ma anche

dalla specie batterica utilizzata. Cellule di E.coli trattate con  $\text{Ca}^{++}$  si ottiene un'efficienza di trasformazione pari a  $1 \times 10^7$  cellule trasformate per  $\mu\text{g}$  di dna plasmidico. In tal caso si utilizzando cellule competenti ottenute con trattamento con  $\text{CaCl}_2$ . Dopo la procedura che ci permette di ottenere le cellule competenti esse sono state stoccate a  $-80^\circ\text{C}$ , prima del loro utilizzo devono essere scongelate per circa 30' in ghiaccio, in cui successivamente sono state utilizzate una aliquota di 50ul per la trasformazione.

Per la trasformazione si sono usate queste cellule e 2 ul del plasmide ricombinante ottenuto tramite la lic. La trasformazione prevede l'uso di una tecnica fisica detta heat shock che prevede il trattamento delle cellule per 45 secondi a  $42^\circ\text{C}$  tramite l'ausilio di un bagnetto termostato e subito rimesse in ghiaccio per due minuti. successivamente bisogna aggiungere il SOC che è un terreno necessario per la ripresa delle cellule dopo la precedente fase di stress a cui sono state sottoposte. Sono stati aggiunti 250 ul di terreno S.O.C. (Super Optimal broth with Catabolyte repression)

Le cellule sono state poi incubate per 60 min a 37 gradi in incubatore in agitazione 250 rpm

Il passaggio che segue prevede di piastrare le cellule su terreno solido, lb+amp per piastrare le cellule trasformate on 37

Questo permette di far crescere solo le cellule che hanno acquisito il plasmide.

### ***2.9.1 COLONY-PCR***

La colonia PCR è un metodo conveniente ad alto rendimento per determinare la presenza o l'assenza di DNA inserito nei costrutti plasmidici. I singoli trasformanti possono essere lisati in acqua con una breve fase di riscaldamento o aggiunti direttamente alla reazione PCR e lisati durante la fase di riscaldamento iniziale. Questa fase iniziale di riscaldamento provoca il rilascio del DNA plasmidico dalla cellula, quindi può fungere da modello per la reazione di amplificazione. I primer progettati per colpire specificamente il DNA dell'inserito possono essere utilizzati per determinare se il costrutto contiene il frammento di DNA di interesse. In alternativa, i primer che prendono di mira il DNA vettoriale che fiancheggia l'inserito possono essere utilizzati per determinare se l'inserito ha o meno la dimensione molecolare corretta. Gli inneschi specifici per inserti possono fornire informazioni sia sulla specificità che sulle dimensioni del DNA dell'inserito, mentre l'uso di inneschi specifici per vettori consente lo screening di più costrutti contemporaneamente. In tutti i progetti sperimentali, la presenza o l'assenza di un amplicone PCR e le dimensioni del prodotto sono determinate mediante elettroforesi accanto a un marcatore di dimensioni del DNA su un gel di agarosio dunque dalle piastre positive si scelgono due o più colonie per ogni inserto da analizzare. Nel nostro caso sono state utilizzate quattro colonie per isoforma. Una volta che sono state piccate le colonie su piastra vengono stemperate in 50ul di h2o sterile con la

stessa ansa si sono poi piastrate su nuove petri lb+amp per ottenere la piastra di mantenimento, ovviamnete per poter mantenere il clone positivo fino alla risposta della pcr. La provetta contenente le colonie viene fatta bollire per 10' in modo da avere poi la lisi cellulare il rilasci del dna per la successiva fase di amplificazione.

<b>Colony PCR</b>	
<b>Lisato Cellulare</b> <i>Per ogni isoforma</i>	<b>5 ul</b>
<b>Mix RedTaq</b>	<b>12.5 ul</b>
<b>Mix Primers (F/R)</b> <i>Specifico per ogni isoforma</i>	<b>2 ul</b>
<b>H2O</b>	<b>5.5 ul</b>
<b>Volume toto</b>	<b>25 ul</b>

Per la PCR è stato utilizzato il protocollo REDtaq.

#### PROTOCOLLO REDTAQ

- 95°C per 2 min
- 95°C per 30 sec
- 68°C per 30 sec (annealing)
- 72°C per 30 sec
- 72°C per 4 min (estensione)

Conduco la PCR per 35 cicli

Dalla piastra di mantenimento dove sono stati piastrati gli stessi cloni utilizzati per la pcr colony sono stati utilizzati per l'estrazione del plasmide ricombinante(QIA-Prep) perchè i risultati positivi. Sono state eseguite le precolture dei cloni prescelti stemperando in 1 ml di terreno liquido lb amp 100 ug/ul in una 96 deep square well incubate 0n 37 in agitazione .

### ***2.10 Ceppi di E.coli utilizzati per la trasformazione.***

Ottenuti i plasmidi ricombinanti dopo la purificazione sono pronti per la trasformazione, ovvero sono pronti per poter essere utilizzati per la trasformazione di cellule deputate successivamente all'espressione del costruito. Nel nostro caso sono stati utilizzati tre diversi ceppi di E.Coli, Rosetta ,BL21, C41. Questo per poter comprendere quale ceppo fosse il piu' adatto per l'espressione delle proteine ricombinanti, per migliorare la resa

***Il ceppo BL21(DE3)pLys*** di E.Coli presenta il gene T7 polimerasi il quale è controllato dall'induzione da parte dell' IPTG che lega il promotore lacUV5. A causa dell'attività estremamente elevata di T7 RNA polimerasi probabilmente si avrà qualche espressione basale del gene di interesse in cellule non indotte. Questo crea problemi nei casi in cui il gene di interesse è tossico per le cellule batteriche. Queste cellule spesso non sono in grado di esprimere alti livelli del gene di interesse sotto induzione di IPTG . La varietà BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3) pLysS produce lisozima T7 che aiuta a ridurre i livelli basali di T7 RNA

polimerasi. Sebbene i livelli siano ridotti, le celle possono ancora contenere a piccola quantità di T7 RNA polimerasi

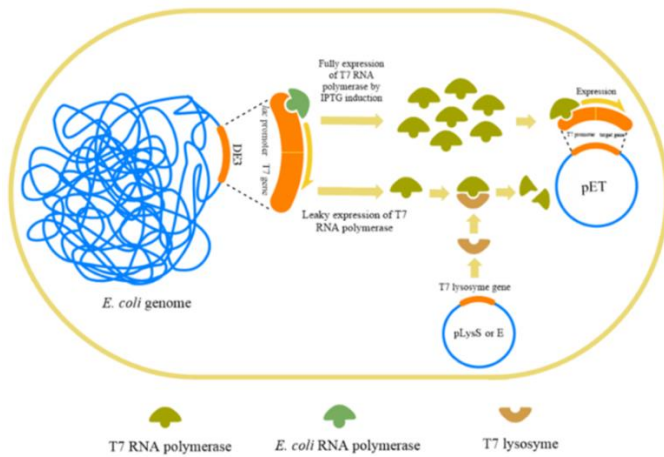


Figura.7 Cellule BL21(DE3)pLys di E.coli.



**Il ceppo C41 (DE3)** è derivato da BL21 (DE3) [E.coli F ompT hsdS B (r B -m B -) gal dcm (DE3)]. Questo ceppo ha almeno una mutazione non caratteristica che impedisce la morte cellulare associata a espressione di molte proteine ricombinanti tossiche.

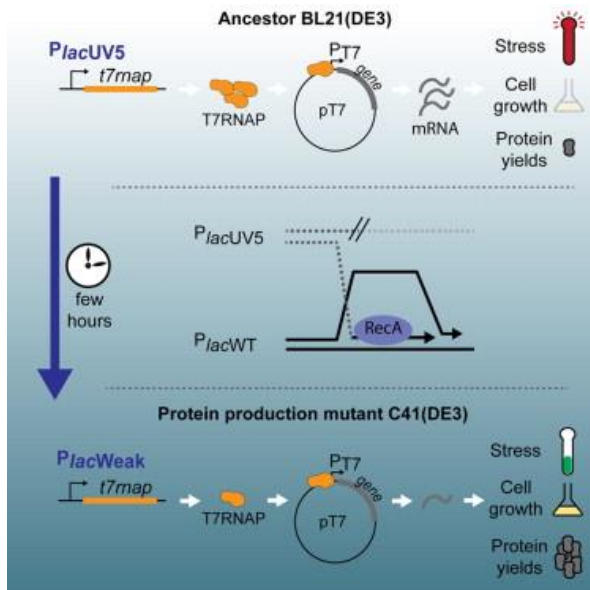


Figura.8 Cellule C41(DE3) di E.coli.

Il ceppo *Rosetta (DE3) pLysS* questo ceppo è stato creato per l'espressione di proteine eucariotiche perché alcune proteine eucariotiche contengono codoni usati raramente in sistemi procariotici, Questo ceppo cerca di compensare la carenza di tRNA che riconoscono codoni rari in sistemi procariotici per migliorare la lettura di proteine ricombinanti espresse in E.coli.

Il ceppo *Rosetta (DE3) pLysS* a geni rari del tRNA sono presenti sugli stessi plasmidi che trasportano il gene per il lisozima T7.

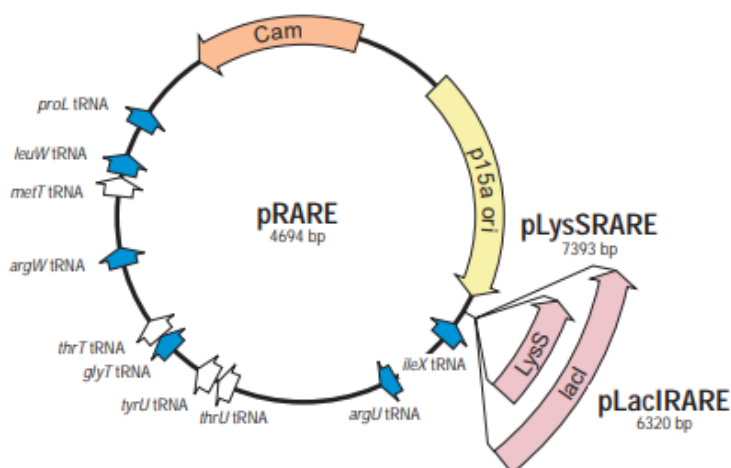


Figura.8 Cellule BL21(DE3)pLys di E.coli.

### ***2.10.1 Processo di trasformazione in ceppi di E.coli ed induzione dell'espressione tramite IPTG***

La trasformazione prevede l'utilizzo del ceppo batterico prescelto, si utilizzano 50ul di cellule e 2ul di DNA ricombinante con concentrazione 20 ng/ul , la trasformazione prevede l'utilizzo dello heat shock termico descritto in precedenza. Dopo la trasformazione si lasciano crescere le cellule per 1h a 37°C

in agitazione, si passa poi al pre-inoculo in 5ml LB+Amp , lasciati over night a 37°C .

Il giorno successivo la pre-coltura viene trasferita in un terreno liquido di 500 ml per la crescita su media scala. Dopo un ora e mezza si tiene conto della crescita cellulare per comprendere se vi è crescita e se la densità cellulare risulta essere idonea per il successivo step di induzione.

Normalmente i valori che prevedono l'induzione sono intorno ad un OD di 0.5-0.6 . Bisogna tenere sotto controllo la crescita perché se si ha una over-crescita, si potrebbe andare incontro ad una saturazione della densità cellulare e si avranno problemi per l'induzione , dovuto al deterioramento,morte delle cellule.l' induzione viene affettuata con l'IPTG.

Clonare un gene in un generico vettore di espressione spesso non è sufficiente per garantire degli alti livelli di espressione della proteina codificata. Tra i vettori attualmente in commercio uno dei più efficienti è quello che contiene il promotore del batteriofago T7, riconosciuto dalla RNA polimerasi del fago T7 che è specifica per tale promotore. Per servirsi di questo promotore si devono utilizzare delle cellule di E.coli BL21 (DE3) , Rosetta e C41 che possiedono integrato nel loro cromosoma il gene codificante per la RNA pol T7. Per rendere il sistema inducibile, questo gene è posto sotto il controllo del promotore lac, fisiologicamente indotto dal lattosio, sostituito in vitro dall'IPTG.

L'IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalattopiranoside) è un analogo non idrolizzabile del lattosio, in grado di penetrare liberamente nelle cellule.

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

Per eliminare l'attivazione non specifica (basale) del promotore lac nel sistema è stato inserito un plasmide, pLysS(non presente in C41), contenente il gene codificante per il Lisozima del fago T7 che lega la RNA pol virale inattivandola.

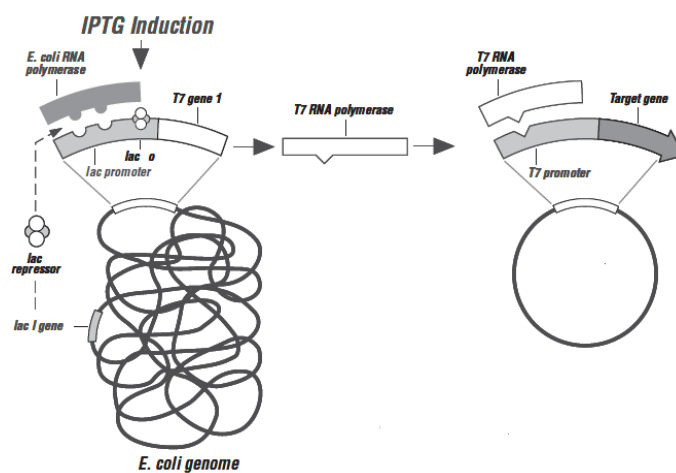


Figura.9 Cellule BL21(DE3)pLys di E.coli.

Questo plasmide produce piccole quantità di lisozima sufficienti a bloccare RNA polimerasi di T7 prodotta prima dell'induzione(0,2mM).

Per l'induzione si lasciano le colture ad incubare per ulteriori 3-4 ore, trascorse le quali, si effettua una nuova misurazione della O.D. a 600 nm, si fa un piccolo prelievo e il resto delle cellule vengono raccolte per centrifugazione. Il valore

di O.D. tra i campioni non indotti ed indotti è rilevante per preparare dei lisati cellulari normalizzati per concentrazione cellulare che verranno analizzati in SDS-PAGE. Mediante test elettroforetico in gel di poliacrilammide è possibile verificare l'avvenuta induzione, confrontando la produzione della proteina in campioni indotti con IPTG con i campioni di controllo non indotti. Le cellule vengono raccolte per centrifugazione della coltura in modo tale da ottenere un pellet contenete le cellule.

### **Terreni Utilizzati :**

<b>LB (Luria-Bertani), tra i più comuni utilizzati per la crescita di E. coli</b>	Tryptone (1%), estratto di lievito (0.5%) e NaCl (1%); il pH del terreno è 7,5.
<b>SOC,super optimal broth whit catabolyte repression</b>	2%triptone,0.5%estratto di lievito , 10mM NaCl 2.5mM KCl, 10mM MgCl2 10mM MgSO4, 20mM glucosio

## ***2.11 Purificazione mediante Cromatografia di affinità***

la purificazione delle isoforme viene effettuata tramite l'utilizzo di una cromatografia di affinità. Questa tecnica prevede la formazione di un legame reversibile tra un TAG presente sul prodotto di fusione e la fase stazionaria che in questo caso funge da ligando. La fase stazionaria è rappresentata da una resina la resina Ni-NTA (resina di agarosio caricata con nichel). La resina è composta di agarosio al 6%, cross-linked e derivatizzato con acido Nitriлотriacetico (NTA). L'NTA è caricato con ioni Nickel divalenti (Ni<sup>2+</sup>): il Nickel immobilizzato lega selettivamente i residui di Istidina (His) esposti e

permette alle proteine ricombinanti His-tagged di essere purificate. La fase mobile è invece il lisato cellulare che contiene le proteine ricombinanti, le CXCL12 le quali possiedono la seguente organizzazione dopo esser state prodotte;



Sfruttando quindi la presenza all’N-term delle 10 code His-Tag si procede con la purificazione.

Si tratta di una cromatografia su colonna dove la fase stazionaria la resina, è impaccata all’interno di una colonnina di plastica. La fase mobile invece passa attraverso quella stazionaria a causa della pressione generata per gravità.

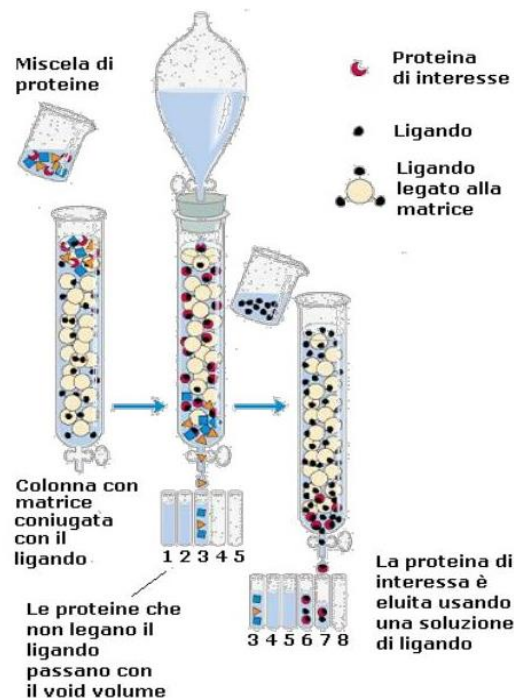


Figura 10. rappresentazione schematica di una cromatografia per affinità.

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

Si procede inizialmente con la risospensione del pellet ottenuto dalla trasformazione ed espressione utilizzando un Buffer di lisi.

Si passa poi ad una lisi enzimatica utilizzando il lisozima necessario perché si abbia la lisi delle cellule e dunque il rilascio del prodotto proteico. L'enzima andrà a ledere l'integrità della parete batterica, catalizzando l'idrolisi del legame beta 1,4 tra l'acido N-acetilmuramico (NAM) e la N-acetilglucosamina (NAG) che sono la componente principale del peptidoglicano. la lisi viene completata con l'ausilio del sonicatore.

La sonicazione prevede l'utilizzato di onde acustiche( ultrasoniche), è normalmente condotta con l'ausilio di un sonificatore, un apparecchio che genera vibrazioni meccaniche amplificate sfruttando corrente elettrica ad elevata frequenza prodotta da un generatore. Gli ultrasuoni vengono trasmessi in una vasca contenente acqua, che può essere anche termostatata a varie temperature. La cavitazione sonora è l'effetto energetico che viene fondamentalmente sfruttato. In ambito biologico la sonicazione permette di estrarre efficacemente enzimi e proteine per lisi di membrane cellulari di batteri o colture cellulari.

Il lisato viene poi centrifugato perché nel caso di proteine solubili, si recupera il sovranatante (lisato chiarificato) che viene mescolato con la resina di affinità, precedentemente equilibrata con un tampone molto simile a quello di lisi. La sospensione viene lasciata in rotazione a 4°C per almeno 2 ore per far avvenire il legame.

Dopo il binding alla resina si versa la sospensione su una colonna, si fa fluire tutto il volume del materiale non legato e si procede con le fasi di lavaggio con concentrazioni crescenti di Imidazolo (W1-W2). Le frazioni raccolte si utilizzano per le letture spettrofotometriche dell'assorbanza a 280 nm. Diversi picchi di assorbanza in queste fasi corrispondono ai contaminanti lavati via.

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

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



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

### **PURIFICAZIONE in piccola scala SU FILTER PLAT**

Dopo la trasformazione in piccola scala per test di espressione la piastra DW viene scongelata in ghiaccio ed i pellet risospesi in 500 ul di tampone di risospensione (Buffer di lisi A) e successivamente sonicati. Ai lisati vengono aggiunti 100 ul di resina Ni-IDA equilibrata nel tampone EB-A ed incubati per tutta la notte a 4°C in agitazione. Per la cromatografia in questo caso si usa una piastra filtrante munita di un tappetino (rimovibile) che blocca la fuoriuscita del liquido dal pozzetto quando è necessario.

Le miscele di lisato più la resina vengono versate in sette pozzetti diversi e dopo l'eluizione del materiale non legato si procede con due lavaggi della resina con 1 ml di tampone di lavaggio W3. L'eluizione viene fatta con 35 ul di tampone di eluizione.

#### **2.11.1 La cromatografia liquida a proteine veloci**

La Fast protein liquid chromatography (FPLC) è una tecnica che permette, grazie all'utilizzo di colonne con diversi tipi di resine, di separare le differenti proteine presenti in una soluzione. L'isolamento della molecola può avvenire in base al suo peso molecolare, in base alla sua carica, in base alla sua

idrofobicità o in base alla presenza di particolari “tag” inseriti ad una sua estremità. Lo strumento utilizzato (ÅKTA purifier GÈ Healthcare) per questo tipo di tecnica è costituito essenzialmente da due pompe, da uno spettrofotometro (lo strumento in dotazione ha una lampada che emette a 280nm), da una valvola per regolare il percorso dei flussi all'interno dell'apparecchio, da un loop di tubo capillare per l'inserimento di precise quantità di soluzione e da colonne di diverso tipo a seconda della tecnica cromatografica che si deve utilizzare (Fig.17) La presenza di due pompe è necessaria in alcuni tipi di cromatografie per generare un gradiente fra la soluzione di flusso (o di caricamento) e la soluzione di eluizione per fare in modo che la proteina venga eluita dalla colonna.

### ***2.11.2 Concentrazione delle proteine.***

Gli apparati di ultrafiltrazione possiedono una membrana selettiva per diversi pesi molecolari che separa due compartimenti. Durante la centrifugazione, il solvente e le sostanze a basso peso molecolare passano dal compartimento superiore a quello inferiore attraverso la membrana, al contrario i soluti con peso molecolare superiore al MWCO (Molecular-Weight Cut Off) della membrana restano intrappolati nel compartimento superiore concentrandosi in funzione del tempo di centrifugazione. Una volta ottenuta la concentrazione desiderata lo stesso apparato può essere utilizzato per allontanare l'imidazolo in eccesso, aggiungendo diversi volumi di soluzione tampone senza imidazolo,

centrifugando e ripetendo l'operazione per almeno tre volte si può assumere che la concentrazione di imidazolo nel campione sia minore di 10mM.



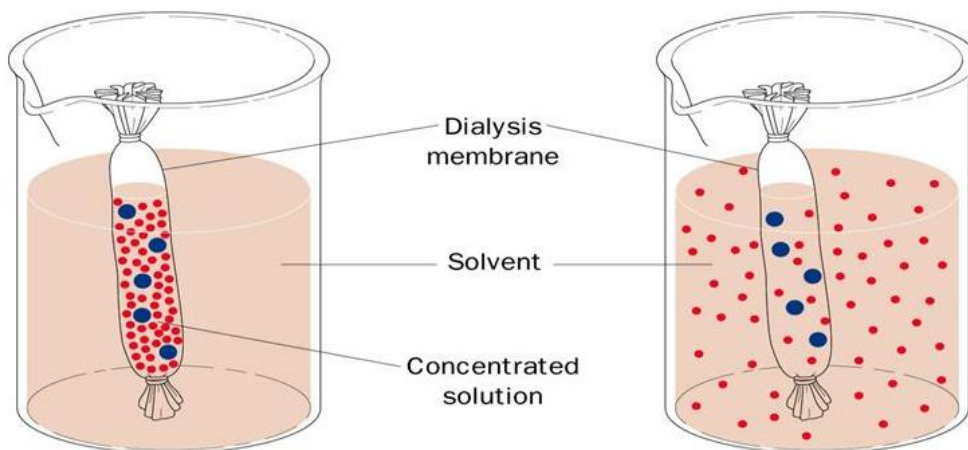
Figura.11 Concentratore

### **2.11.3 Dialisi**

La dialisi è una tecnica che consente di separare una o più molecole in una soluzione sulla base delle loro dimensioni. Si utilizzano delle membrane semipermeabili dotate di pori i quali consentono un determinato cutoff. Queste membrane permettono il passaggio selettivo di molecole. Questo è reso possibile dalla differenza di concentrazione dei soluti presenti all'interno della membrana e il solvente in cui sono immerse. Alla fine si raggiunge un equilibrio dettato dal movimento delle molecole a basso peso molecolare potranno diffondere da un compartimento all'altro. Il tutto viene eseguito in

agitazione e in questo caso a 4°C per accelerare il tempo necessario per la dialisi e l'eventuale precipitazione dei soluti disciolti.

La tecnica è stata utilizzata per migliorare la purezza del prodotto finale, allontanando eventuali contaminanti residui e per cambiare eventualmente la concentrazione del buffer in cui sono immerse.



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

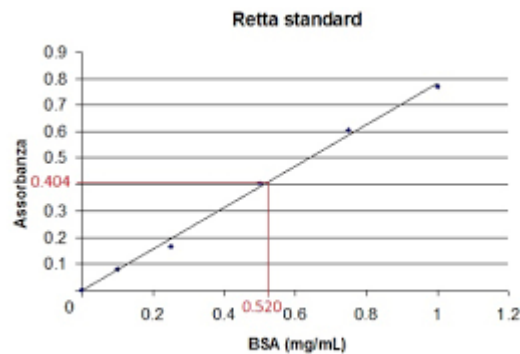
## **2.11.4 DOSAGGIO DI PROTEINE - METODO**

### **BRADFORD**

È un metodo colorimetrico per la determinazione della concentrazione delle proteine: si basa sulle interazioni non-covalenti tra le proteine e il colorante Coomassie Brilliant Blue G250 (base del reagente di Bradford); il colorante forma complessi con le proteine mediante interazioni elettrostatiche con aminoacidi basici ed interazioni idrofobiche con aminoacidi aromatici e ciò determina uno shift di assorbanza massima del colorante stesso (la lunghezza d'onda di massimo assorbimento da 465nm, rosso, passa a 595nm, blu). La concentrazione proteica è direttamente proporzionale all'assorbimento rilevato. Si tratta di un metodo altamente sensibile (fino a 20µg/ml).

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

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



Ad ogni campione viene aggiunto il reagente di Bradford (per permettere la reazione colorimetrica e consentire la misurazione mediante spettrofotometro). Andando poi a misurare l'assorbanza del campione di interesse, la si può correlare alla concentrazione corrispondente mediante l'utilizzo della retta d'interpolazione dei dati di BSA, ottenendo quindi il valore di concentrazione (mg/ml) della proteina incognita.

## ***2.12 PCR (Polymerase Chain Reaction)***

La PCR è una tecnica che permette l'amplificazione di frammenti di DNA o RNA. La PCR ripete una fase particolare della duplicazione del DNA: la sintesi di un filamento di DNA a partire da un filamento di DNA ad elica singola. Questo processo avviene grazie alle DNA polimerasi termoresistenti e ai termociclatori può produrre quantità esponenziali dello stesso frammento.

La reazione richiede:

- un buffer specifico per il tipo di DNA polimerasi usata

- DNA stampo,
- deossinucleotidi che la DNA polimerasi incorpora,
- primer REVERSE e FORWARD (oligonucleotidi di innesco per la sintesi) e
- DNA polimerasi termostabile; la polimerasi deve essere stabile ad alte temperature in quanto il campione da amplificare necessita di essere denaturato (temperatura alla quale il dsDNA diventa ssDNA).

Si prepara un mix di tutti i componenti sopra elencati e lo si inserisce nel termociclatore, dove vengono impostate le temperature e la durata delle tre fasi necessarie per l'amplificazio

- fasi di melting(denaturazione per ottenere i singoli filamenti che fungono da stampo),
  - di annealing (cioè la temperatura alla quale i primer si appaiano al DNA stampo),
  - di estensione (sintesi dei nuovi filamenti)
- il numero di cicli da ripetere dai 30-35.

## ***2.13 ELETTROFORESI***

L'esame elettroforetico permette la separazione di molecole di interesse biologico, come amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi ed acidi nucleici,

che possiedono gruppi ionizzabili e possono esistere in soluzione come specie elettricamente cariche (sia cationi che anioni).

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

- **IN GEL DI AGAROSIO**, per l'analisi del DNA

Per preparare il gel si scioglie una certa quantità di polvere di agarosio (0,8-1,2%) con una soluzione tampone (TBE, Tris borato EDTA) ; in seguito viene aggiunto un agente intercalante come il SYBR Safe DNA gel stain, colorante fluorescente che interagisce con il DNA.

Prima del caricamento ogni campione viene mescolato con un colorante per monitorare visivamente la migrazione, ad esempio il Loading Dye Purple (6x) NEB.

Per rendere l'analisi dei risultati più completa, e quindi avere una migliore caratterizzazione delle molecole di DNA, viene caricato tra i campioni un marker di peso molecolare che migrerà con i campioni stessi formando bande in corrispondenza di pesi molecolari specifici.

- **IN GEL DI POLIACRILAMMIDE**, per l'analisi di proteine



I gel di poliacrilammide vengono usati per la separazione in un campo elettrico delle proteine, la separazione può essere ottenuta in condizioni native o denaturanti, in quest'ultimo caso si parla di SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis), tecnica elettroforetica che prevede l'aggiunta dell' SDS al gel, ai sistemi tampone utilizzati ed al campione. L' SDS (detergente fortemente ionico), rompe le interazioni non-covalenti (interazioni idrofobiche e legami idrogeno) facendo perdere alle proteine la conformazione nativa. Esso carica negativamente la proteina in modo massa-dipendente (uno ione di SDS ogni 2 aa) e in questo modo le proteine assumono carica netta negativa direttamente proporzionale al loro peso molecolare, permettendo la loro separazione sulla base del peso molecolare.

Il gel comprende due parti:

*stacking*, porzione superiore del gel con la funzione di “impaccamento”, va cioè a concentrare i campioni proteici caricati nei pozzetti appositi permettendo loro di iniziare la migrazione dallo stesso punto di partenza;

*running*, porzione inferiore, con la funzione di separazione vera e propria, sulla base dei pesi molecolari; presenta le stesse componenti dello *stacking* ma le concentrazioni dei reagenti sono diverse.

La concentrazione di acrilammide può essere modificata in base alla porosità desiderata.

I campioni vengono mescolati in parti uguali con una miscela denaturante colorata (SDS Sample Buffer 2x), fatti bollire per accelerare la completa denaturazione; è sempre fondamentale l'utilizzo un marker di peso molecolare specifico.

## ***2.14 Scheda delle soluzioni tampone usate***

### **Lysis Buffer A**

- 50 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl
- 0.5 mM Tcep
- 1X Inibitore proteasi

### **Buffer di lisi B**

- 50 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl
- 0.5 mM Tcep
- 1X Inibitore proteasi
- 1 Mn MgCl<sub>2</sub>
- Benzoni (1:10) → 16 uL in 100ml

### **Diluizione 1:2**

- 50 mM Hepes PH 7.8
- 300 mM NaCl
- 0.5 mM Tcep
- 0.1 mM PMSF

### **Equilibration Buffer EB-A**

- 50 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl

### **Equilibration Buffer EB-B**

- 25 mM Hepes PH 7.8
- 300 mM NaCl
- 10 mM Imidazolo
- 0.5 mM Tcep
- 0.1 mM PMSF

### **Wash buffer 1**

- 25 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl
- 30 mM Imidazolo
- 0.1 mM Tcep
- 0.1 mM PMSF

### **Wash buffer 2**

- 25 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl
- 50 mM Imidazolo
- 0.1 mM Tcep
- 0.1 mM PMSF

### **Wash buffer 3**

- 25 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl
- 75 mM Imidazolo
- 0.1 mM Tcep
- 0.1 mM PMSF

### **Elution buffer**

- 25 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl
- 300 mM Imidazolo
- 0.5 mM Tcep
- 0.1 mM PMSF

### **Buffer di scambio**

- 25 mM Hepes pH 7.8
- 300 mM NaCl
- 0.5 mM Tcep
- Glicerolo

### **DIALISI**

- 150Mm NaCl
- 5% Glicerolo
- 25Mm Hepes

### **Buffer per FPLC**

#### **BUFFER A**

- 20 mM Hepes PH 7.8
- 300 mM NaCl
- 1 mM EDTA

#### **BUFFER B**

- 20 mM Hepes PH 7.8
- 300 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 10 mM Maltosio

## **RISULTATI E DISCUSSIONI**



## **Risultati e Discussione**

### **3. Amplificazione delle isoforme CXCL12.**

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

L'amplificazione dei geni selezionati per le sette isoforme di CXCL12 è stata condotta su 7 costrutti sintetici prodotti dalla GeneScript. Le sequenze devono essere rese adatte per la fase di clonaggio. Questo è possibile utilizzando dei primer specifici, che andranno ad amplificare la sequenza dell'inserito aggiungendo le sequenze necessarie per l'appaiamento con il vettore di clonaggio. Per l'amplificazione vengono utilizzati primer specifici che permettono di inserire la sequenza LIC necessaria per l'appaiamento. I primer dovranno inoltre essere specifici per le relative sequenze perché dall'analisi delle sequenze nucleotidiche si nota che al 5' ovvero all'N-term le sequenze sono identiche per ogni isoforma mentre al 3' ovvero al C-term riscontriamo differenze di sequenza dovute al risultato dello splicing alternativo che comporta la formazione di prodotti diversi. Per poter

amplificare in modo corretto le isoforme bisogna dunque disegnare primer appropriati, i quali presentano le seguenti caratteristiche:

Forward: sarà uguale per tutte le isoforme e sarà complementare alla sequenza del gene a valle dell'ATG d'inizio

Reverse: sarà specifico per la relativa isoforma

### **Estensioni LIC per l'inserito:**

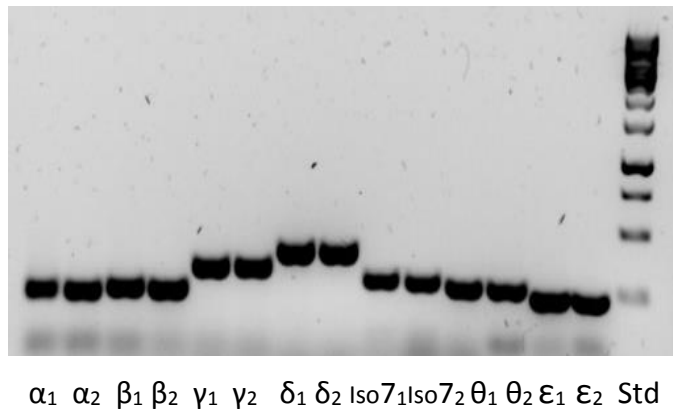
Fw LIC	GACGACGACAAGAAGCCTGTCAGCCTGAGCTACAGATGC
Rev delta LIC	GAGGAGAAGCCCGGTTACACATCCCCAGGAGAGGGC
Rev gamma LIC	GAGGAGAAGCCCGGTTAGTTTTTCTTTTCTGGGCAGCC
Rev epsilon LIC	GAGGAGAAGCCCGGTTAGCAATTGTTTAAAGCTTTCTCCAGG
Rev theta LIC	GAGGAGAAGCCCGGTTAGCGTGATGTCTCAGCATTGC
Rev iso7 LIC	GAGGAGAAGCCCGGTTAGGCTTTGCCAGGTTGACTG
Rev alfa LIC	GAGGAGAAGCCCGGTTACTTGTTTAAAGCTTTCTCCAGGTAC
Rev beta LIC	GAGGAGAAGCCCGGTTACATCTTGAACCTTGTTTAAAGC

L'amplificazione prevede l'utilizzo della PCR e per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la polimerasi termostabile *Accura™ High-Fidelity Polymerase*, con il protocollo descritto in precedenza in MM.

Per produrre abbastanza materiale per il clonaggio l'amplificazione è stata condotta in doppio per ogni campione.



Gli amplificati sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio, di seguito vengono riportati i risultati:



**Fig. 1 Inserti amplificati delle isoforme CXCL12**

Gel di agarosio al 1.5% ( 50ml TBE + 0.75g agarosio + 3uL Syber Safe ), Standard BlueJuice , campioni preparati con Loading Buffer.

Nella figura.1 vengono riportate le sequenze amplificate che risultano essere gli inserti utilizzati per la successiva fase di clonaggio.

### ***3.1 Estrazione con kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up e quantizzazione al nanoDrop degli amplificati.***

Il resto del materiale amplificato è stato caricato su un gel di agarosio con i pozzetti più grandi per poter tagliare le bande corrispondenti agli inserti, mediante il kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. I prodotti purificati sono stati quantizzati al nanoDrop e i loro valori sono riportati nella tab.1

	C ng/uL	A 260/A280	A 260/A230
CXCL12- $\alpha$	<b>207.6 ng/uL</b>	1.80	1.84
CXCL12- $\beta$	<b>273 ng/uL</b>	1.80	1.49
CXCL12- $\gamma$	<b>180.9 ng/uL</b>	1.85	0.81
CXCL12-Iso7	<b>126.5 ng/uL</b>	1.81	1.66
CXCL12- $\delta$	<b>177 ng/uL</b>	1.87	0.89
CXCL12- $\epsilon$	<b>238.6 ng/uL</b>	1.82	1.68
CXCL12- $\theta$	<b>208 ng/uL</b>	1.81	1.50

**Tabella.1 Quantizzazione al NanoDrop degli inserti CXCL12.**

Vengono riportate in tabella le concentrazioni in ng/uL e i rapporti delle assorbanze 260/280 – 260/230 che indicano la purezza del prodotto ottenuto.

In questo caso le relative assorbanze risultano essere buon indice di purezza

Una volta ottenute le sequenze amplificate esse sono pronte per il successivo passaggio, ovvero il clonaggio LIC all'interno di un vettore che permetterà poi la successiva espressione dell'inserto all'interno di un organismo ospite.

## 3.2 Strategie di clonaggio; scelta del vettore.

### 3.2.1 Vettore di clonaggio pMCSG7; caratteristiche generali e modifiche.

Il vettore utilizzato per la prova di clonaggio è stato il pMCSG7 modificato, al posto del sito per il taglio TEV è stata inserita la sequenza per il taglio con l'enzima Enterochinasi (EK). Questa modifica è stata appositamente fatta perché il taglio ottenuto con la TEV, proteasi del **Virus del mosaico del tabacco** lascia dei residui amminoacidici all'estremità N-terminale i quali possono interferire su eventuali studi che prevedono di analizzare l'attività di queste chemochine. Il legame con il recettore avviene tramite l'estremità n-terminale e il taglio con l'EK risulta essere un taglio netto che non prevede la presenza di nessun residuo amminoacidico.

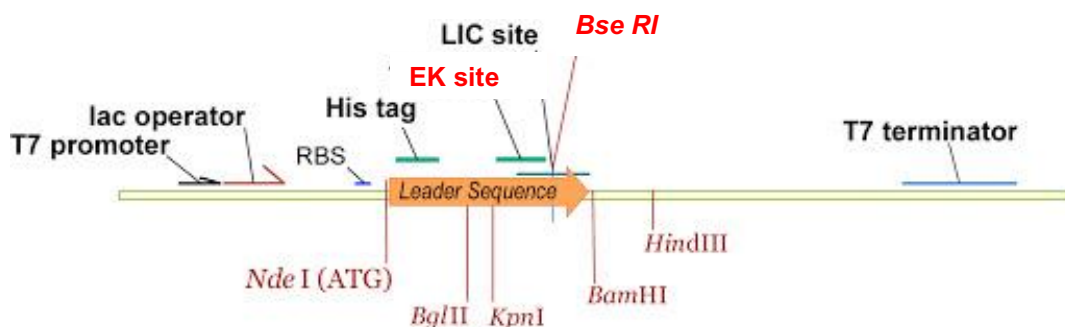


Figura.2 vettore p7-EK

Tutte le informazioni relative al vettore sono riportate nel capitolo materiali e metodi (MM).

### ***3.2.2 Propagazione e purificazione del vettore p7-EK in cellule competenti di E.coli; GC-5.***

Il plasmide p7-EK è stato propagato nel ceppo batterico di E.coli GC-5 , in 100 ml di terreno liquido LB con Ampicillina (100 $\mu$ g/ml).

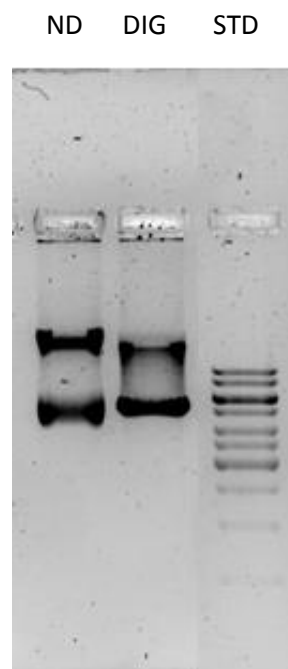
e purificato tramite il Kit Plasmid Purification Midi Kit (QIAGEN).

### ***3.2.3 Digestione enzimatica del plasmide e purificazione.***

Per il clonaggio deve essere effettuato un taglio per la linearizzazione del plasmide per la successiva tecnica LIC (ligation-independent cloning ) .

L'enzima di restrizione utilizzato è BseRI.

Dopo la digestione viene visualizzato il prodotto tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio. La reazione ha previsto un periodo di incubazione di 2 ore a 37°C.



**Figura.3 Analisi del prodotto di digestione**

Gel 0,8% Agarosio;

**ND:** non digerito **D:** digerito

**STD:** BlueJuice

Dopo la digestione il vettore linearizzato viene estratto e purificato dal gel tramite il kit NucleoSpin e quantizzato al nanoDrop.

### ***3.3 Ligation Independent Cloning del vettore p7-EK***

Dopo aver linearizzato e purificato il plasmide pMCSG7 e aver amplificato i vari inserti si procede con il trattamento LIC che prevede l'utilizzo dell'attività esonucleasica e polimerasica della polimerasi T4 . Si ottengono alla fine inserti e vettore che presentano delle estremità over-hangs a singolo filamento e complementari tra loro che si appaieranno durante la fase di annealing. Il plasmide ricombinante che puo' essere utilizzato nelle fase di trasformazione, in questo caso è stata effettuata una prova con le isoforme CXCL12- $\delta$  CXCL12- $\gamma$

#### ***3.3.1 Trasformazione E. coli GC-5 competenti per l'acquisizione del plasmide ricombinante***

Vengono utilizzate cellule competenti, le GC-5, per l'acquisizione del plasmide ricombinante. La trasformazione prevede di utilizzare 50ul di cellule GC-5 con 2ul di plasmide ricombinante.

Dopo la trasformazione vengono piastrati su terreno solido LB 200ul della miscela di trasformazione e lasciate ad incubare o/n a 37°C. le piastre LB contengono l'antibiotico ampicillina, importante per avere la selezione dei vettori che presentano l'inserto da quelli che non hanno acquisito l'inserto.

Sono stati effettuati anche controlli positivi e negativi. Il controllo positivo prevede di piastrare il vettore vuoto mentre quello negativo il vettore LIC, questo per ottenere una prova positiva sulla modalità di esecuzione dell'esperimento.

### **3.4 PCR COLONY**

Per poter verificare l'effettiva acquisizione del plasmide e dunque escludere eventuale falso positivo, è stata allestita la PCR colony. La tecnica prevede di selezionare un o più cloni dalla piastra LB+Amp che verranno poi sottoposti ad amplificazione in PCR, utilizzando primer specifici per l'amplificazione dell'inserto relativo all'isoforma specifica. Utilizzando il protocollo RedTaq utilizzando nuovamente i primers LIC.

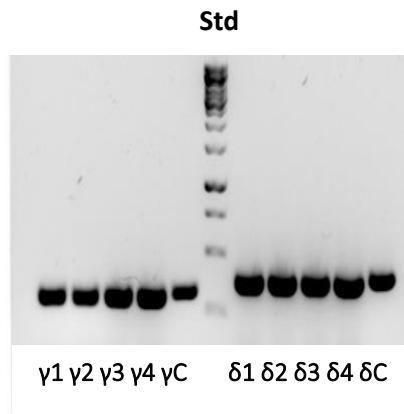


Figura4. **PCR-COLONY** di quattro colonie positive per ogni isoforma ( quattro colonie per CXCL12- $\gamma$  e quattro colonie per CXCL12- $\delta$  ) con il controllo finale della relativa isoforma. I primi due gamma sono con lb 10x loading buffer che li ha un po' diluiti mentre per gli altri redtaq! Sono stati selezionati 4 cloni per isoforma più il controllo derivato dall'amplificazione.

Si procede poi con la purificazione del plasmide ricombinante dalle colonie risultate positive mediante QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) dalle piastre di mantenimento. Questi plasmidi verranno poi utilizzati per la trasformazione di cellule competenti e per la successiva espressione.

Alla fine della purificazione si effettua la quantizzazione al NanoDrop, vengono riportate di seguito le relative misure

	<i>C ng/uL</i>	<i>A 260/A280</i>	<i>A 260/A280</i>
CXCL12- $\delta$ 1	150.1 ng/uL	1.89	1.8
CXCL12- $\delta$ 2	132.8 ng/uL	1.87	1.57
CXCL12- $\gamma$ 1	124.2 ng/uL	1.89	1.73
CXCL12- $\gamma$ 2	160.3 ng/uL	1.87	1.75

Tabella.2 Quantizzazione dei plasmidi ricombinanti.

### 3.5 Sequenziamento, BMR-Genomics

Dalla piastra di mantenimento sono state allestite delle colture da 5ml dei cloni positivi per CXCL12- $\delta$  e per CXL12- $\gamma$ , fatte crescere per l'ottenimento di DNA molto concentrato. Dopo la purificazioni 600ng di ogni plasmide inviati alla BMR per il sequenziamento.

Il sequenziamento ha dimostrato, mediante allineamento con la sequenza codificante per CXCL12 escludendo il leader peptide, una identità del 100% per tutti e quattro i cloni prescelti, come mostrato nella Fig.5 (a,b).

(a)

Homo sapiens C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12), transcript variant 3, mRNA

Sequence ID: NM\_001033886.2 Length: 524 Number of Matches: 1

Range 1: 149 to 451

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
534 bits(591)	1e-148	300/303(99%)	0/303(0%)	Plus/Plus
Query 121	CGACAAGAAGCCT	<b>GTCAGCCTGAGCTACAGATGC</b>	CCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT	180
Sbjct 149	CGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT			208
Query 181	TGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAATTTCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGAT			240
Sbjct 209	TGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAATTTCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGAT			268
Query 241	TGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGAT			300
Sbjct 269	TGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGAT			328
Query 301	TCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGGGGCGCagagaagaaaaagtgggaaaaaa			360
Sbjct 329	TCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGGGGCGCAGAGAAGAAAAAGTGGGGAAAAA			388
Query 361	agaaaagataggaaaaaagaagcgacagaagaagagaaaggctgcccagaaaaggaaaaaa			420
Sbjct 389	AGAAAAGATAGGAAAAAAGAAGCGACAGAAGAAGAGAAAGGCTGCCAGAAAAGGAAAAA			448
Query 421	CTA 423			
Sbjct 449	CTA 451			



(b) Homo sapiens C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12), transcript variant 4, Mrna  
 Sequence ID: NM\_001178134.1 Length: 1209 Number of Matches: 1

Range 1: 149 to 515

Alignment statistics for match #1

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

```

Query 95  CGACAAGAAGCCTGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT 154
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 149  CGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGT 208

Query 155  TGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAACACTGTGCCCTTCAGAT 214
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 209  TGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAACACTGTGCCCTTCAGAT 268

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

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

Query 335  GGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCTGCATCCCTCTCCTCCCAGGGCCTGCCCCACAGCTCG 394
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 389  GGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCTGCATCCCTCTCCTCCCAGGGCCTGCCCCACAGCTCG 448

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

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

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

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

### ***3.6 Trasformazione per test di espressione, in cellule di E.coli BL-21(DE3)pLysS competenti per acquisizione del plasmide ricombinante p7-EK e Test di Induzione con IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalattopiranoside)***

La trasformazione viene eseguita come da protocollo, utilizzando cellule competenti le BL21 ( 50ul di cellule + 2ul costrutto). Si effettua prima la preparazione della pre-coltura che verrà fatta crescere O/N a 37° C in agitazione. Trasferimento del pre-inoculo in terreno fresco LB + Amp (100mg/ml) + Clo (34mg/ml) per la crescita su media scala.

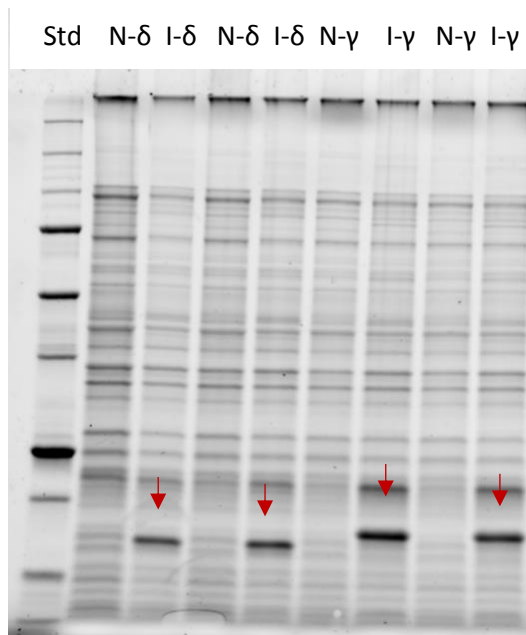
Incubazione 1.30 h 37°C, in agitazione (250 rpm). Vengono poi effettuate le letture dei pre-indotti per monitorare la crescita delle cellule. La lettura viene effettuata a 600nm con l'ausilio di uno spettrofotometro, le letture sono riportate in tabella3A. Quando la crescita raggiunge valori fra 0,4 e 0,6 si effettua l'induzione con IPTG ad una concentrazione pari a 0.2mM. Incubazione per 3h e monitoraggio della crescita. Le letture sono riportate di seguito in tabella3B.

<b>A</b>	<b>OD 600nM</b>	<b>B</b>	<b>OD 600nM</b>
<b>Delta1</b>	0.559	Delta1	1.65
<b>Delta2</b>	0.551	Delta2	1.60
<b>Gamma1</b>	0.542	Gamma1	1.84
<b>Gamma2</b>	0.517	Gamma2	1.68

Tabella 3. **Analisi della crescita cellulare.**

Vengono riportate le letture dei pre e post-indotti.

Per verificare l'effettiva produzione delle proteine si confrontano i lisati delle cellule non indotte con quelle indotte in SDS-PAGE.



**Figura 5. Test di espressione per i cloni  $\gamma$  e  $\delta$**

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

GEL SDS-PAGE 12%, STAIN-FREE; N: NON INDOTTO I: INDOTTO

Dalla fig.5 si osserva che le condizioni di induzione standard sono buone per l'isoforma gamma, mentre per quella delta sarà necessario ottimizzare l'espressione. Inoltre, nella figura appare evidente che i pesi molecolari non corrispondono a quelli attesi: circa 15kDa per gamma e 16,5 KDa per delta, ottenuti dall'analisi dei prodotti di traduzione dei cloni sequenziati (expasy-translate) mostrati nella Fig6

Comunque il fenomeno è stato ampiamente descritto per le citochine in questione ed è probabilmente legato alla loro carica intrinseca.

**Clone  $\gamma 3$** > VIRT-158569:5'3' Frame 2, start\_pos=15

MHHHHHHHHHHSSGVDLGTDLYDDDDKPKVSLSYRCPCRFFESHVARANV  
KHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKGREE  
KVGKKEKIGKKKRQKKRCAAQKRKN

**Molecular weight (Da):** 14765.08 (average mass), **Theoretical pI:** 10.09

**Clone  $\delta 2$** > VIRT-183329:5'3' Frame 3, start\_pos=6

MHHHHHHHHHHSSGVDLGTDLYDDDDKPKVSLSYRCPCRFFESHVARANV  
KHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNNLISAA  
PAGKRVIAGARALHPSPPRACPTARALCEIRLWPPPEWSWSPGDV

**Molecular weight (Da):** 16554.98 (average mass), **Theoretical pI:** 9.15

Figura.6 Prodotti di traduzione virtuale dei cloni  $\gamma 3$  e  $\delta 2$

Le sequenze dei cloni ottenute dalla BMR sono state inserite nel programma per l'in vitro translation del sito Expasy, i prodotti ottenuti sono stati poi analizzati per dimensioni e punto isoelettrico (teorico).

### ***3.6.1 Test di purificazione dell'isoforma- $\gamma$ , cromatografia di affinità.***

Con l'isoforma CXCL12-gamma è stato effettuato un test per la purificazione che prevede l'utilizzo di una cromatografia di affinità. Essa richiede l'utilizzo di una resina, la Ni-IDA la quale ha una notevole affinità di binding con il tag presente sul prodotto di fusione, le code His.

Lo step iniziale di purificazione prevede la ri-sospensione del pellet ottenuto dal processo di trasformazione ed espressione. Il pellet viene risospeso con un Buffer di Lisi ( i Buffer sono ripostati nell'appendice Scheda Buffer) con un

rapporto di 5ml ogni grammo. Dopo la ri-sospensione si passa alla lisi delle cellule per via meccanica, con l'uso del sonicatore. Si esegue un test di controllo in piccola scala per comprendere se la proteina rimane in soluzione oppure meno. Questo lo si analizza dopo aver centrifugato a 15000g un aliquota del lisato e analizzando attraverso una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide se la proteina rimane solubile oppure finisce nei corpi d'inclusione.

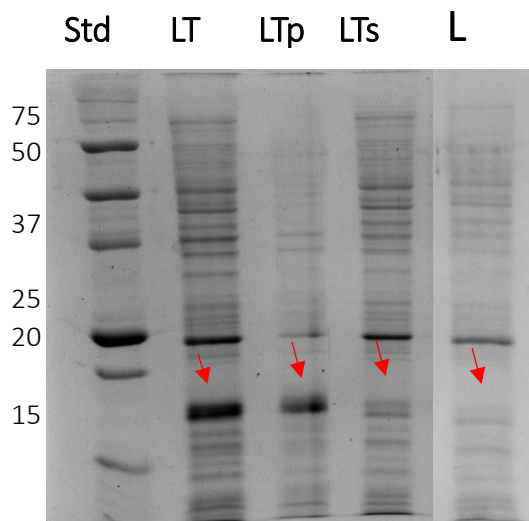


Figura 6. ***Analisi dei campioni per determinare la solubilità della proteina ricombinante.***

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

Dall'analisi del gel sopra riportato(Fig6), nell'LT si puo' notare la banda (evidenziata con la freccia ) che indica la quantità di proteina di partenza. Analizzando poi le bande successive LTp e LTs si evince che dopo la centrifugazione la proteina per piu' del 90% è presente nel pellet LTp e la

restante parte in soluzione LTs. Questo vuol dire che la proteina presa in esame non risulta essere solubile ma avrà bisogno di un tag per poter essere resa solubile. La non solubilità comporta la sua presenza in corpi d'inclusione e dunque la via di purificazione prevede dei passaggi alternativi da quelle che erano le intenzioni iniziali. La purificazione dai corpi d'inclusione prevede l'utilizzo di un protocollo particolare e l'uso di alcuni agenti denaturanti come urea e guanidina che potrebbero comportare dei problemi nel momento in cui si voglia utilizzare la proteina sia per esami di tipo strutturale che test in vitro. L'uso di agenti caotropici portano alla denaturazione della proteina ovvero la perdita della propria struttura nativa. Esistono passaggi che permettono una lenta rinaturazione dopo la purificazione ma per ovviare ad eventuali problemi causati da questi agenti e per aver un corretto folding della proteina si è pensato di utilizzare un elemento che permettesse di migliorare la solubilità della proteina. Questo è reso possibile utilizzando un vettore che nel prodotto di fusione potesse esprimere con la proteina un tag per migliorare la solubilità.

### 3.7 Vettore pMCSG9

Dopo aver effettuato la prova di espressione con il vettore pMCSG7 ed aver evidenziato la formazione dei corpi d'inclusione si è proceduto con il clonaggio degli inserti nel vettore pMCSG9.

Questo vettore possiede oltre le modifiche presenti anche nel vettore pMCSG7 come il sito di taglio per EK e sito per il taglio dell'enzima di restrizione BseRI (tutte le informazioni sono riportate in materiali e metodi), possiede anche la MBP, la maltos binding protein.

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

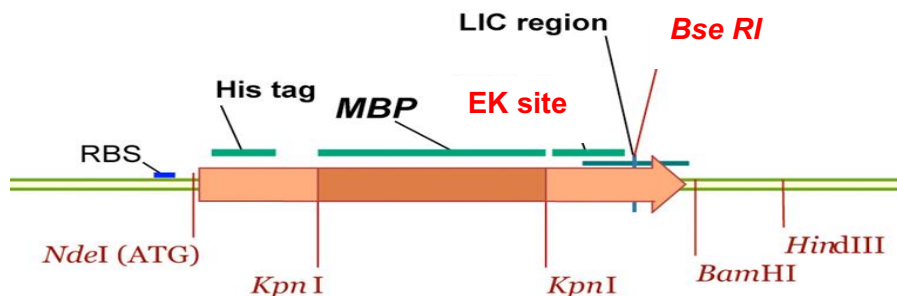


Figura.7 vettore p9-EK

### ***3.7.1 Clonaggio LIC in p9-EK di tutte le isoforme CXCL12.***

Come per il clonaggio in p7-EK anche quello p9-EK prevede l'utilizzo della tecnica LIC per la produzione del vettore ricombinate. Essendo il p9-EK un vettore derivato dal p7-EK presenta la stessa sequenza per il clonaggio indipendente dalla ligazione dunque gli inserti utilizzati per il clonaggio in p7-EK possono essere utilizzati in p9-EK.

### ***3.7.2 Propagazione del vettore in cellule competenti GC-5 di E.Coli; purificazione del plasmide p9-EK ricombinante.***

Il plasmide p9-EK è stato propagato nel ceppo batterico di E.coli GC-5 e purificato tramite il Kit Plasmid Purification Midi Kit (QIAGEN).

#### ***3.7.2.1 Digestione enzimatica del vettore p9-EK.***

Si procede con la digestione del vettore per ottenere la forma linearizzata per la successiva fase di acquisizione dell'inserto. L'enzima di restrizione utilizzato è sempre **BseRI**

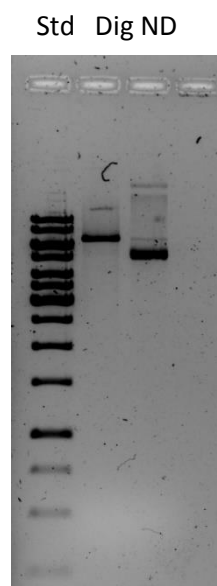


Figura.7 Digestione p9-EK

**ND:** non digetito

**D:** digerito

**STD:** BlueJuice

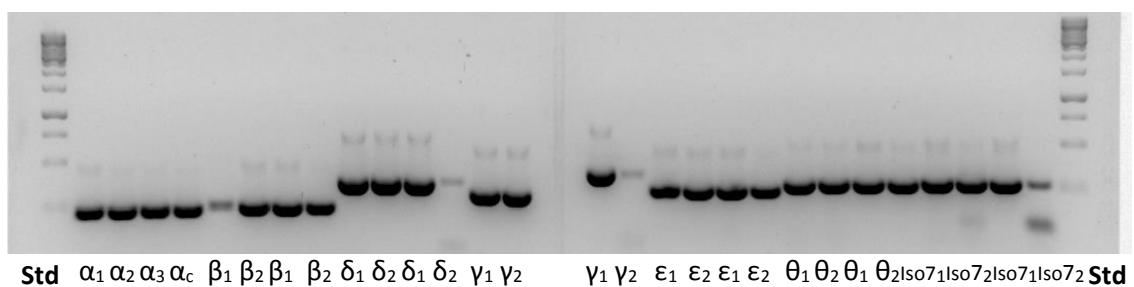


### 3.7.3 Estrazione con nucleospin per l'estrazione del vettore.

Dopo aver digerito ed estratto il plasmide si puo' effettuare la LIC e la successiva fase di trasformazione, come descritto anche per il vettore p7-EK. La trasformazione prevede sempre l'utilizzo di cellule competenti le GC-5. Una volta effettuata la trasformazione si piastra su terreno solido LB+Amp e si lasciano crescere i cloni o/n a 37°C. cresceranno solo le colonie che hanno acquisito il vettore con l'inserto, effettuando sempre le prove con i controlli positivi e negativi. Si selezionano le colonie isolate e si procede con la per colony.

### 3.7.4 PCR COLONY

Sono state scelte e isolate tre colonie per ogni isoforma per effettuare la per coloni. Come descritto anche in precedenza, la PCR colony è utile per escludere eventuali falsi positivi. Si effettua una pcr con l'utilizzo di primer specifici per amplificare le relative isoforme. Utilizzando il protocollo GreenTaq.



**Figura.8 Analisi dei cloni  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  e Iso7.**

Nel gel d'agarosio al 1.5% sono stati caricati i prodotti dell'amplificazione diretta da colonia: da sinistra i prodotti dell'amplificazione di 3 colonie ottenute dal clonaggio delle 7 isoforme, C indica l'amplificazione di controllo con il template originale (lo stesso utilizzato per la produzione dell'inserto).

Purificazione del plasmide ricombinante dalle colonie risultate positive mediante QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) che verranno poi utilizzati per la trasformazione di cellule competenti e per la successiva espressione.

Alla fine della purificazione si effettua la quantizzazione al NanoDrop, vengono riportate di seguito le relative misure

	<i>C ng/uL</i>	<i>A 260/A280</i>	<i>A 260/A230</i>
CXCL12- $\alpha$ 1	39.7 ng/uL	1.95	1.93
CXCL12- $\alpha$ 2	35 ng/uL	2	1.91
CXCL12- $\alpha$ 3	37.4 ng/uL	2.11	1.93
CXCL12- $\beta$ 1	37.4 ng/uL	2.15	1.95
CXCL12- $\beta$ 2	42.1 ng/uL	1.99	1.96
CXCL12- $\beta$ 3	30.9 ng/uL	2.19	1.95
CXCL12- $\delta$ 1	35.9 ng/uL	2.06	1.99
CXCL12- $\delta$ 2	42.4 ng/uL	1.98	2.02
CXCL12- $\delta$ 3	30.4 ng/uL	2.05	1.87
CXCL12- $\gamma$ 1	31 ng/uL	2.05	1.85
CXCL12- $\gamma$ 2	32 ng/uL	2.14	1.89
CXCL12- $\gamma$ 3	29.5 ng/uL	1.91	1.83
CXCL12- $\epsilon$ 1	41.4 ng/uL	1.9	1.98
CXCL12- $\epsilon$ 2	35.8 ng/uL	2.01	1.98
CXCL12- $\epsilon$ 3	38.6 ng/uL	2.02	1.98
CXCL12- $\theta$ 1	38.5 ng/uL	1.98	1.88
CXCL12- $\theta$ 2	35.6 ng/uL	1.94	1.83

CXCL12- 03	42.4 ng/uL	2.08	2.00
CXCL12- Iso7-1	39.3 ng/uL	2.00	1.86
CXCL12- Iso7-2	40.5 ng/uL	1.96	1.71
CXCL12-Iso7-3	42.4 ng/uL	2.05	1.93

Tabella.5 **Quantizzazione dei plasmidi ricombinanti.**

Sono riportate le concentrazioni del plasmide ricombinante relativi alle varie isoforme. Sono state sempre misurati i rapporti delle relative Assorbanze a 260/280 – 260/230 per comprendere la relativa purezza. Le quantizzazioni sono state ottenute con le misure al NanoDrop. Dai rapporti si evince una buona purezza dei campioni analizzati.

### ***3.7.5 Sequenziamento, BMR-Genomics***

Dalla piastra di mantenimento sono state allestite delle colture da 5ml dei cloni positivi per tutte le isoforme CXCL12, fatte crescere per l'ottenimento di dna molto concentrato. Dopo la purificazione si sono ottenuti 600ng di ogni plasmide inviati alla BMR per il sequenziamento. I risultati ottenuti vengono utilizzati per l'allineamento con la sequenza codificante senza il leader peptide. Dall'analisi risulta il 100% di identità. **BMR Genomics.**

### ***3.8 TEST DI ESPRESSIONE DI TUTTE LE ISOFORME di CXCL12 clonate in p9EK nel ceppo BL21(DE3)pLysS.***

Per analizzare tutti i cloni in parallelo abbiamo usato il protocollo dell'espressione in piccola scala in uso al NY-MaSBIC.

Utilizzando i plasmidi ricombinanti diluiti 1/10 delle sette isoforme di CXCL12 in p9-EK sono state trasformate 7 aliquote da 20  $\mu$ l di cellule BL21(DE3)-pLysS, utilizzando un piastra da PCR. Dopo la trasformazione ed il recupero in SOC a 37 °C la soluzione è stata usata per inoculare 1ml di LB+ amp + clo nella piastra deep-well (DW) incubata a 37°C per tutta la notte. Il giorno successivo 30  $\mu$ l delle colture sature sono stati usati per inoculare 1ml di LB+amp+clo in una nuova piastra DW incubata per circa 1 ora a 37°C, ovvero fino a che le colture non raggiungono il valore di OD a 600nm =1. A questo punto l'induzione avviene con l'aggiunta di 1 mM imidazolo e la crescita protratta per 4 ore. Le colture dopo l'induzione vengono centrifugate a 4500 x g per 10 minuti nella DW, i supernatanti vengono scartati e i pellet conservati a -80°C fino alla purificazione con Ni-IDA su piastra filtrante, descritta nei MM.

Nella Fig. 9 è mostrato il gel SDS-PAGE al 12% nel quale sono stati caricati 10  $\mu$ l del prodotto di purificazione ottenuto per ciascuna isoforma.

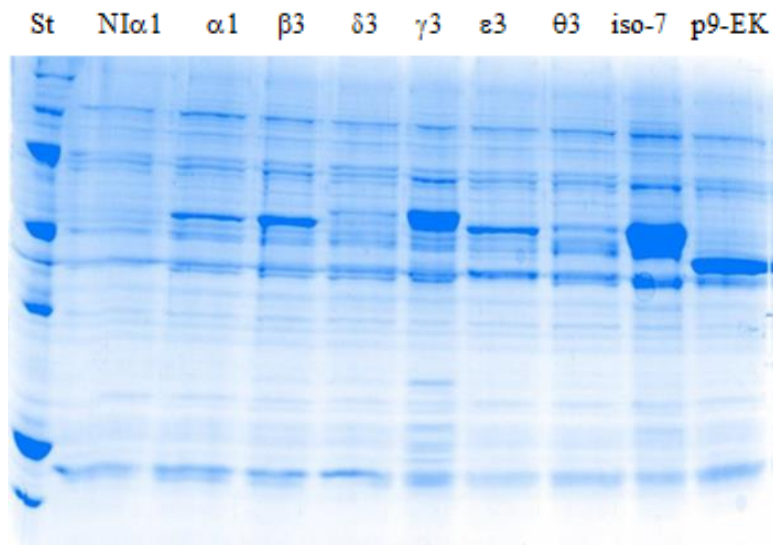


Figura.9 **Espressione in piccola scala delle 7 isoforme di CXCL12 clonate in p9EK**

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

Dall'esperimento in piccola scala per le isoforme iso7, gamma e beta sembra che il protocollo di purificazione in uso nel nostro laboratorio sia un buon punto di partenza. Per le isoforme alfa, epsilon, theta e delta occorre valutare se l'espressione e/o la purificazione siano da ottimizzare.

### ***3.8.1 Induzione in media scala di tutte le isoforme CXCL12.***

Per la trasformazione sono stati usati 20uL di cellule competenti BL21 (DE3) pLysS, con 1uL di DNA (1:10) allestendo il tutto su PCR-plate. Le cellule vengono trasformate come descritto nei MM e risospese in 100 ul di SOC, incubate per 1 ora a 37 °C e utilizzate per inoculare 5 ml di LB + Amp +Clo ,

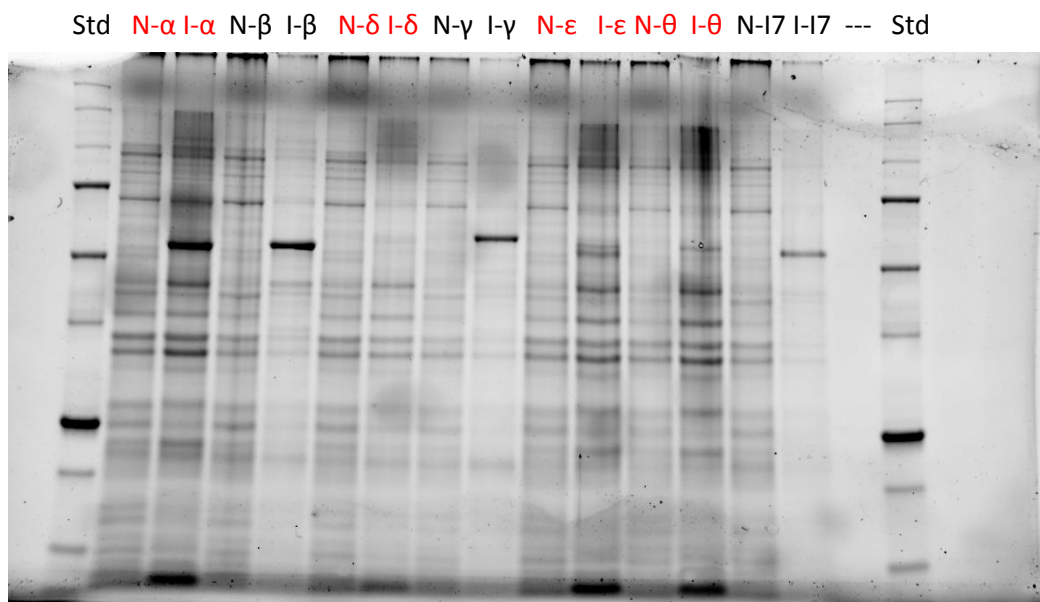
il pre-inoculo da far crescere o/n a 37°C . Il giorno successivo si trasferisce la coltura in 500 ml di LB +Amp e Clo, e si lasciano crescere le cellule per circa 1h e 30 min., ovvero fino a raggiungere l'OD a 600 nm di circa 0.5. Poiché l'espressione in piccola scala indicava che alfa, epsilon, theta e delta non si esprimevano in modo ottimale, è stato fatto un tentativo per vedere di ottimizzare l'espressione abbassando la temperatura di induzione a 22°C. Quindi, raggiunta la fase della crescita ottimale per l'induzione si aggiunge IPTG 0.2mM a tutte le beute. Per iso7, gamma e beta si prosegue l'incubazione per 3h sempre a 37°C in agitazione mentre le beute destinate alla produzione di alfa, epsilon, theta e delta sono state trasferite a 22°C per l'induzione O.N. Al termine dell'induzione le letture degli OD a 600 nm per i cloni indotti a 37°C era di circa 1,5, mentre i cloni indotti a 22°C mostravano un'OD a 600nm di circa 2,2.

Dopo l'induzione le cellule vengono raccolte per centrifugazione e i pellet conservati a -80°C fino al loro utilizzo per la purificazione. Per poter valutare l'induzione e l'effettiva produzione delle proteine ricombinanti dalle colture pre-induzione e post-induzione sono state prelevate delle aliquote da 1 ml. Dopo aver recuperato le cellule per centrifugazione i pellet sono stati risospesi in SDS-sample buffer 2X (normalizzando i campioni in base alle letture OD). Dopo aver denaturato i campioni a 100°C per 10 min. 5 ul dei lisati sono stati caricati in un SDS-PAGE gel al 12%, per l'analisi del profilo di espressione,

mostrato nella Fig.11. Nonostante la normalizzazione non sia risultata corretta per molti campioni, sembra che l'induzione a 22°C non abbia aumentato l'espressione di alfa, delta, epsilon e theta, mentre rimane confermata la buona produzione di beta, gamma e iso7 a 37°C, nonostante i campioni post-induzione (I) siano troppo diluiti rispetto ai pre-indotti (N).

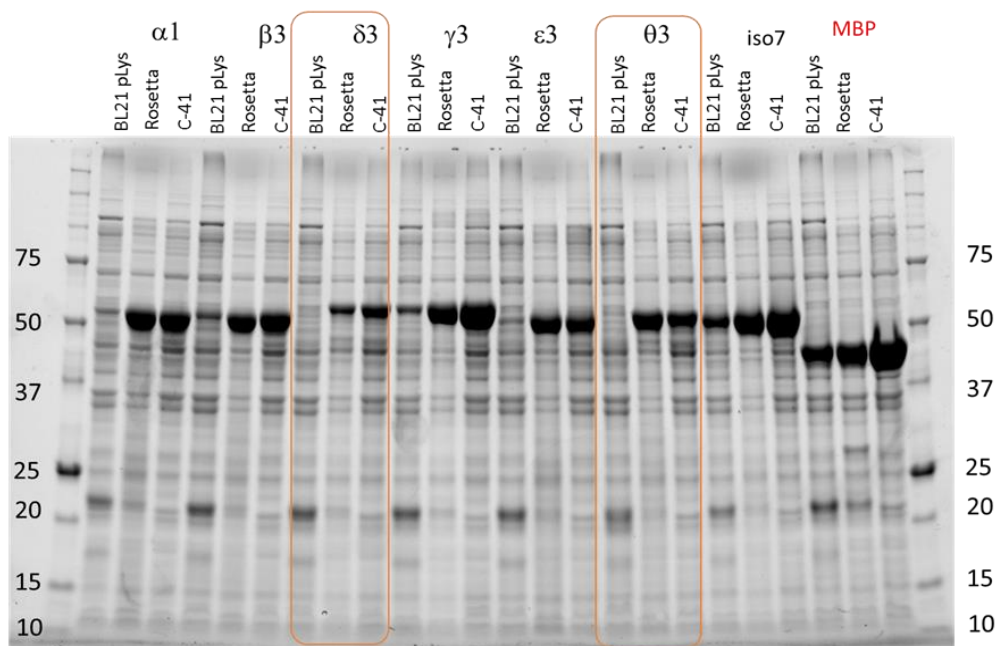
Nel profilo generale dell'induzione in media scala si osserva che l'isoforma delta non viene espressa, e che le isoforme theta ed epsilon sono espresse a livelli molto bassi.

Per ottimizzare l'espressione delle proteine ricombinanti numerosi autori suggeriscono l'uso di cellule ospiti diverse. Quindi abbiamo valutato l'espressione dei nostri cloni con due ceppi di E.Coli: Rosetta e C41 disponibili nel nostro laboratorio in piccola scala. Il risultato è mostrato nella fig.10 dove si osserva che l'espressione dei cloni delta epsilon e theta è notevolmente migliore nelle cellule Rosetta e C41.



**FIG.10** Espressione in Media scala delle 7 isoforme di CXCL12 clonate in p9EK

Gel al 12% SDS-PAGE (Stain-free) nel quale sono stati caricati 5 ul di lisato cellulare derivante dalle colture non indotte (N) ed indotte (I). In rosso le colture indotte a 22°C ed in nero quelle a 37°C. St BIO-RAD.



**Figura 12. Espressione in tre ceppi di *E. coli*: BL21 (DE3), C41 (DE3) e Rosetta.** Vengono evidenziate le bande relative ai campioni indotti per Delta e Theta: l'analisi di queste riconferma il risultato della prova di induzione precedente nella quale non si aveva una espressione inducibile apprezzabile per tali isoforme. Analogamente, anche per l'isoforma Epsilon è stata dimostrata l'inefficienza dell'induzione nel ceppo BL21 (DE3).



### ***3.9 Purificazione***

Il protocollo di purificazione prevede l'utilizzo della cromatografia di affinità sfruttando il legame delle code Histidina con la colonna Ni-IDA della G-bioscience.

#### ***3.9.1 PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE CXCL12- $\beta$***

Nel nostro laboratorio l'isoforma iso7 era stata già purificata con un protocollo simile a quello normalmente in uso. I dati relativi alla purificazione sono riassunti in MM.

Il protocollo non appare ottimale per quanto riguarda il recupero totale a causa dell'elevata concentrazione di materiale che non si lega alla NI-IDA, mentre la cromatografia appare efficiente con un recupero di circa il 40% e un buon grado di purezza. Poiché valori simili sono stati ottenuti anche da purificazioni ottenute da pellet prodotti in C41 per affrontare la purificazione dell'isoforma- $\beta$  siamo partiti con questo nuovo ospite. Con l'isoforma Iso7 erano in corso esperimenti per ottimizzare il binding alla resina di affinità (aumentando il volume del tampone di lisi) e si è voluto verificare il protocollo in uso per iso 7 anche per l'isoforma- $\beta$ . La purificazione è stata seguita valutando l'assorbanza dei campioni a 280 nm nei vari lavaggi e nell'eluizione, sono stati prelevati anche dei campioni per l'analisi in SDS-PAGE per poter valutare l'efficacia dei lavaggi e seguire la distribuzione della proteina da purificare.

Di seguito vengono riportati i risultati del gel SDS-PAGE per le purificazioni di  $\beta$  in confronto alla purificazione dell'isoforma-7:

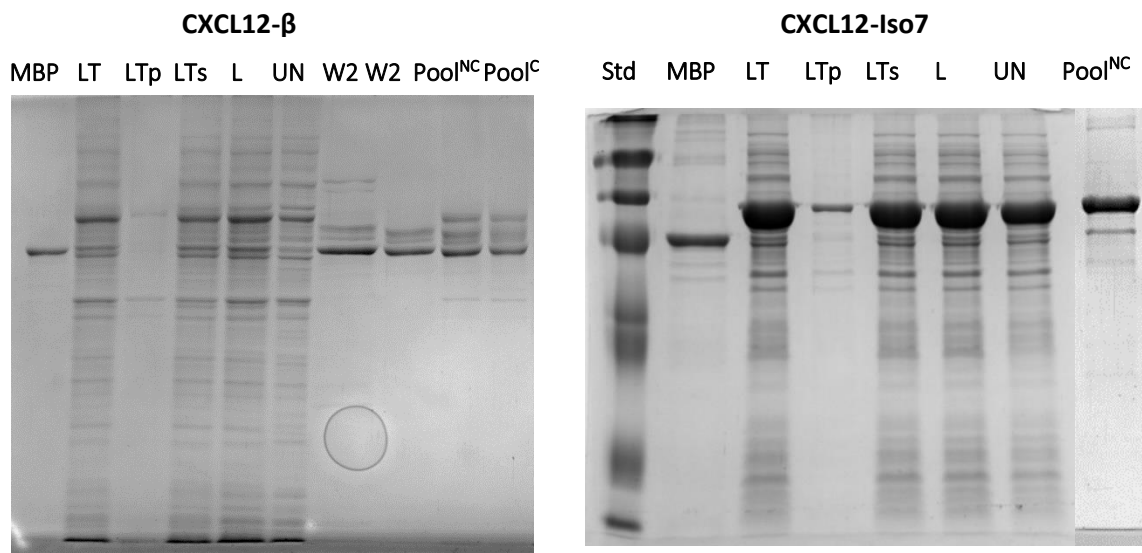


Figura.13 **Profilo di purificazione delle isoforme beta e iso 7**

Nel gel SDS-PAGE al 12% sono stati caricati **LT**: lisato dopo sonicazione **LTp**: pellet risospeso dopo centrifugazione 6800g **LTs**: sovranatante dopo centrifugazione 6800g; **L**: lisato chiarificato, dopo centrifugazione in grande scala; **UN**: non legato (normalizzati per volume) **W2**: 50mM Imidazolo; **Pool-NC**: pool frazione elution **Pool-C**: pool frazioni elution concentrati ; **Std**: BlueEasy\_Nippon **MBP**: standard 0.6 mg/ml

Come si puo' osservare dal gel relativo dall'isoforma- $\beta$ , si parte da una buona concentrazione di proteina, evidenziata dalla banda del lisato totale LT.

Dal gel si puo' inoltre osservare che la proteina e' quasi interamente in soluzione facendo riferimento alla banda LTp, LTs, la presenza della MBP migliora la solubilita' della proteina.

Affidandoci alle valutazioni per via densitometrica nel lisato chiarificato L, sono presenti 45 mg di MBP-CXCL12- $\beta$ , nell'UB troviamo il 50% della proteina non legata (leggero miglioramento dovuto all'aumento del volume del

tampone di lisi). Dei 20 mg effettivamente caricati nella cromatografia di affinità sono stati recuperati circa 4mg con una resa del 20% dalla cromatografia di affinità e 10% sul totale. A parte i recuperi piuttosto bassi, il grado di purezza è decisamente inferiore alle aspettative di una cromatografia di affinità.

Il protocollo di purificazione adottato per beta non risulta essere così efficace come lo è stato per l'isoforma-7 dunque è stato necessario valutare dei protocolli alternativi.

La MBP può essere purificata anche con delle resine di affinità specifiche, nel nostro laboratorio abbiamo a disposizione la MBP-trap (GE) e quindi abbiamo voluto verificare se utilizzando questa cromatografia era possibile separare la MBP contaminante dai nostri prodotti di fusione MBP-CXCL12. Il pool ottenuto dalla precedente cromatografia è stato caricato sulla MBP-Trap ed eluito con un gradiente ampio di maltosio da 0 a 10mM. La cromatografia è stata efficiente ma la MBP contaminante e la MBP-CXCL12 $\beta$  co-eluiscono.

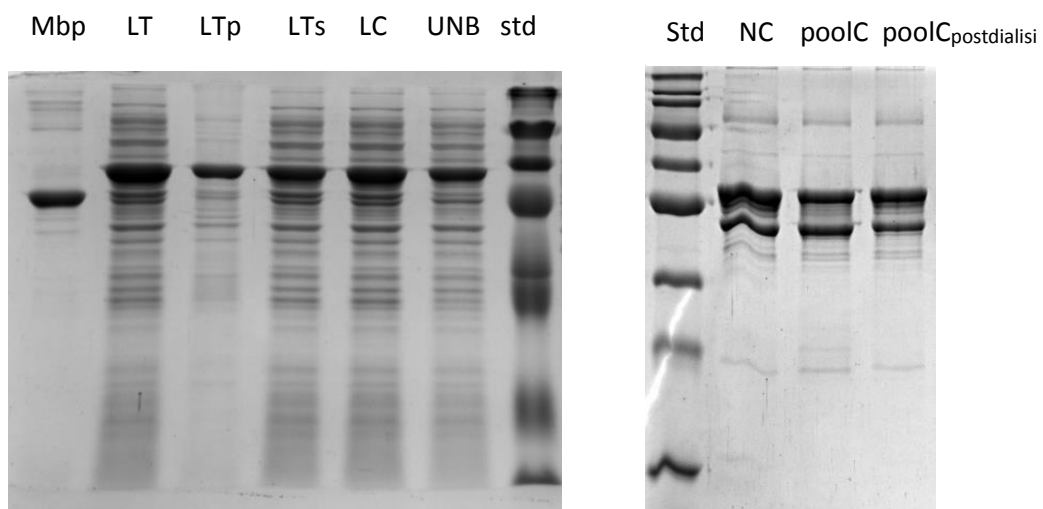
La MBP che osserviamo nei nostri lisati non è quella fisiologica (si lega alla cromatografia di affinità per le istidine), potrebbe derivare da un blocco della traduzione in corrispondenza della sequenza d'inizio delle nostre unità codificanti, quindi per cercare di ridurre la produzione di questo artefatto ci

sono due possibilità: non spingere troppo l'induzione e/o usare il ceppo Rosetta più efficiente nella traduzione.

Infatti se parliamo di una MBP endogena essa dovrebbe aver poca o addirittura nessuna affinità per la resina utilizzata. La cromatografia si basa sull'affinità specifica tra le code His-Tag e la MBP prodotta per via endogena non possedendo la His-Tag dovrebbe anche se per qualche motivo di carica legarsi alla resina essere allontanata con l'uso di Buffer di lavaggio utilizzati normalmente per allontanare i contaminanti. Questo purtroppo non si osserva anzi, l'uso di buffer per il lavaggio, che presenta concentrazioni crescenti di imidazolo si osserva la perdita della maltose ma con essa anche il nostro prodotto di fusione. Per questo quella banda che sembra essere MPB endogena probabilmente è il prodotto di fusione tronco che contiene l'His-Tag.

**Data la resa molto bassa, si è pensato di partire da due pellet ottenuti dalla coltura cellulare del ceppo E.coli Rosetta ; seguendo il protocollo prima descritto.**

Risultati del gel della cromatografia CXCL12- $\beta$



**Figura.14 Profilo di purificazione delle isoforma- $\beta$  in Rosetta.**

Nel gel SDS-PAGE al 12% sono stati caricati **LT**: lisato dopo sonicazione **LTp**: pellet risospeso dopo centrifugazione 6800g **LTs**: sovranatante dopo centrifugazione 6800g; **L**: lisato chiarificato, dopo centrifugazione in grande scala; **UN**: non legato (normalizzati per volume) **W2**: 50mM Imidazolo; **Pool-NC**: pool frazione elution **Pool-C** : pool frazioni elution concentrati ; **Pool-postDialisi**: pool dopo dialisi **Std**: BlueEasy\_Nippon **MBP**: standard 0.6 mg/ml

In questo caso sono stati utilizzati due pellet ottenuti dal processo di espressione partendo da un ceppo diverso rispetto alla purificazione precedenti, ceppo E.coli di Rosetta.

Si parte sempre da una buona concentrazione di proteina (60mg) anche se la solubilità sembra essere minore, analizzando le bande LTp-LTs. Per quando

riguarda il binding risulta essere ancora del 50% ma si nota una sostanziale differenza nei pool ottenuti dopo l'eluizione.

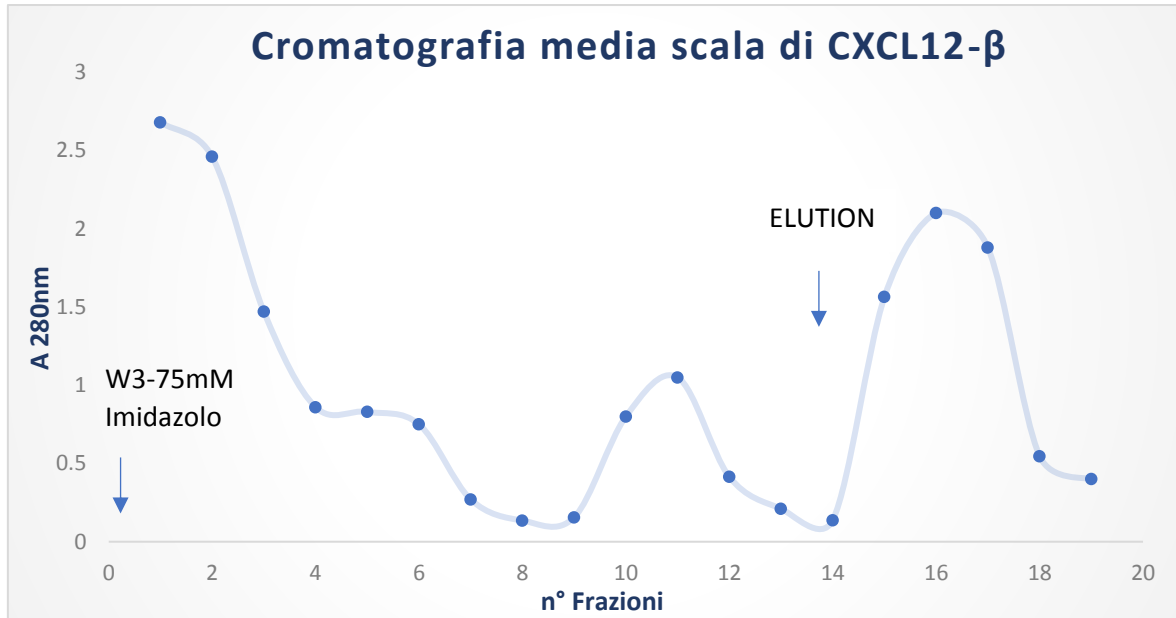
Tramite le informazioni ottenute con l'SDS-PAGE osserviamo che in questo caso il rapporto tra il prodotto di fusione e la MBP è quasi del 50%, dunque si ottiene un miglioramento per quanto riguarda la purezza e la resa cromatografica con l'utilizzo di un ceppo differente. In questo caso il ceppo E.Coli-Rosetta ha diminuito l'espressione del prodotto tronco e dunque migliorato la produzione finale della CXCL12 presa in esame.

Analizzando la banda del gel relativa al prodotto non legato (UN) ci sia la presenza di molta proteina di fusione ma la concentrazione della MBP risulta essere molto bassa rispetto a quella osservata nel lisato totale. Questo vuol dire che molta MBP si è legata alla resina precedente e probabilmente la MBP che si produce non è una maltose endogena come descritto all'inizio.

### **Protocollo di purificazione con secondo passaggio in NI-IDA.**

Date queste caratteristiche si è tentato di effettuare un ulteriore passaggio in Ni-IDA caricando l'unbound ottenuto dal primo passaggio in resina. Prima di legare UNB in resina si effettua una centrifugazione a 15000g , prelevando il sovrnatante da legare poi in resina equilibrata sempre con EB. Si effettua dopo un ora di binding il passaggio su colonna cromatografica. Si procede sempre

con la raccolta del non legato e un singolo lavaggio con W3 (75mM Imidazolo) ed infine l'eluizione con Buffer Elution.



Dall'analisi del cromatogramma sopra riportato, possiamo osservare come il lavaggio a 75mM sia stato efficace per allontanare i contaminanti.

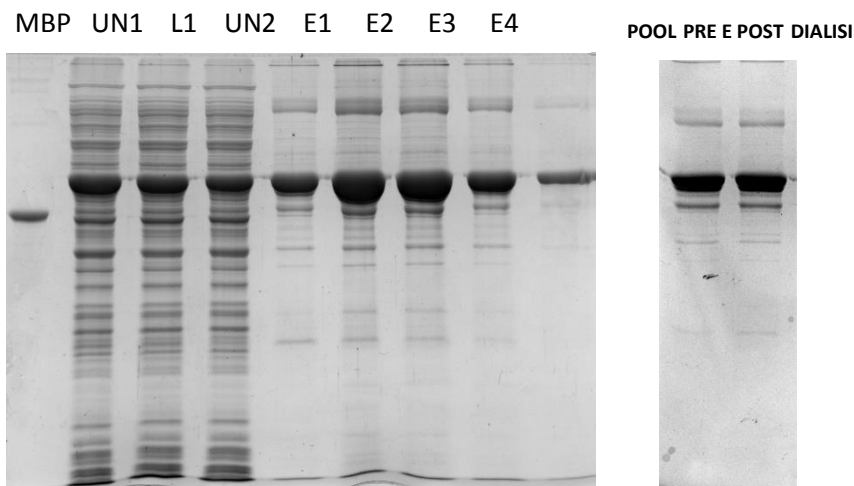


Figura.15 Profilo di purificazione delle isoforme-β seconda Ni-IDA, Rosetta.

Nel gel SDS-PAGE al 12% sono stati caricati **UN1**: Unbound prima Ni-IDA **L1**: loading in colonna del'UN1 centrifugato a 15000g **UN2** non legato della seconda Ni-IDA (normalizzati per volume); **Pool-preDialisi**: pool pre dialisi **Pool-postDialisi**: pool dopo dialisi **MBP**: standard 0.6 mg/ml

Dall'analisi del gel si osserva un pool concentrato molto puro e senza MBP, si noti infatti che come la maltose rimane nell'unbound ma non si è legata alla resina, probabilmente quella è la maltose effettivamente endogena mentre il prodotto tronco contenente His-tag-MBP si è legato totalmente alla prima Ni-IDA.

Dall'analisi densitometrica il recupero totale risulta essere del 20%, l'affinità della seconda Ni-IDA è dell'80%, e la purezza intorno al 75%.

Questo ultimo protocollo risulta essere il migliore in termini di resa e purezza. Da questi dati si evince come i due passaggi in resina rappresentino degli step fondamentali. Il primo binding in resina risulta necessario per allontanare il prodotto tronco mentre il passaggio nella seconda Ni-IDA dell'unbound permette l'ottenimento della proteina pura da contaminanti.



### 3.9.2 PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE CXCL12- $\delta$

Anche per la purificazione dell'isoforma- $\delta$  è stato utilizzato il protocollo standard ma la purificazione risulta essere inefficiente.

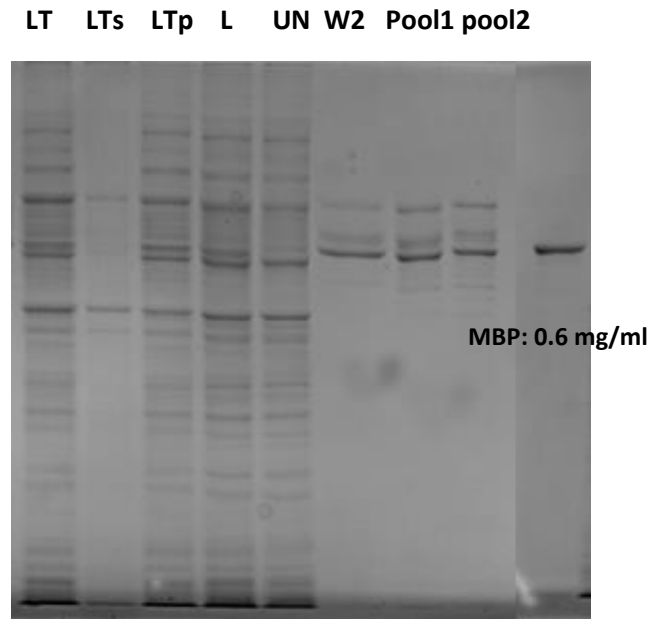


Figura.16 Profilo di purificazione delle isoforma- $\delta$  in C41.

Nel gel SDS-PAGE al 12% sono stati caricati **LT**: lisato dopo sonicazione **LTp**: pellet risospeso dopo centrifugazione 6800g **LTs**: sovrantante dopo centrifugazione 6800g e **UN**: non legato (normalizzati per volume) **W2**: 50mM Imidazolo; **Pool1**: pool post dialisi **Pool2** : pool post dialisi ; **MBP**: standard 0.6 mg/ml

Sempre per valutazione densitometrica, si parte con 25 mg di proteina tenendo in considerazione che il 10% del prodotto non rimane in soluzione LTp e si parte con il 90% di proteina presente nel chiarificato L ( 22.5mg) . La perdita della proteina in colonna risulta essere dell'80%, dunque il 20% ,corrispondente a circa 4.5mg di proteina, rappresenta il prodotto legato in resina. Il recupero finale è del 5 % corrispondente a 1.3mg.

La cromatografia sembra essere efficiente ma il problema rimane in quanto vi è un eccessivo prodotto non legato alla resina. Anche la quantità di proteina presente nel lisato totale LT risulta essere inferiore rispetto all'isoforma beta, questo perché viene prodotta in minor quantità.

### **PRTOCOLLO SECONDA NI-IDA**

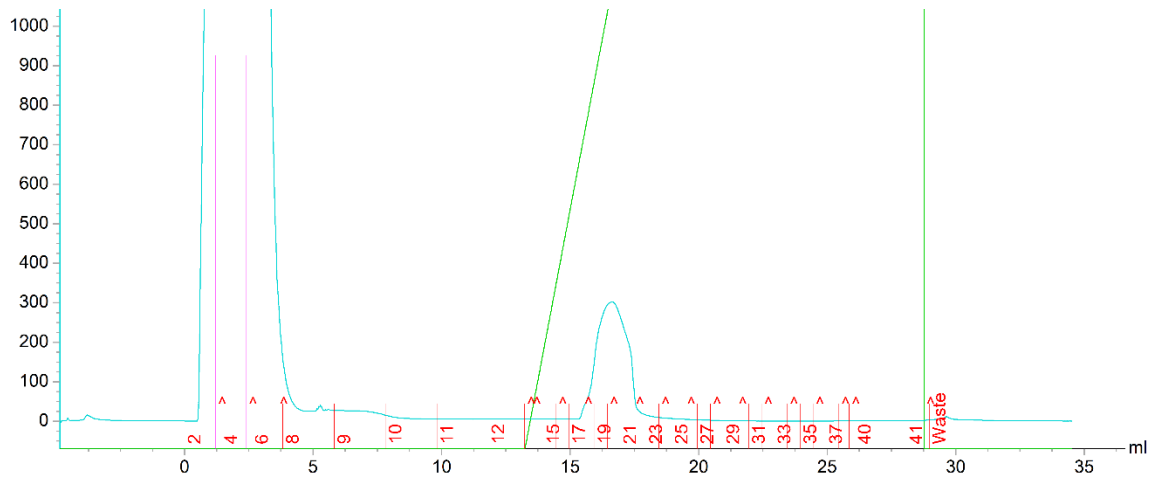
Sono stati effettuati due passaggi in resina Ni-IDA ma la concentrazione della proteina risulta essere ancora molto bassa (dati non riportati). Partendo dall'Unbound si è pensato di effettuare una purificazione tramite FPLC utilizzando la cromatografia per affinità con colonna MBP-trap. Per evitare numerosi passaggi e la perdita della proteina dato che non è presente in grande quantità.

### **CROMATOGRAFIA su MBP-Trap**

In questo caso la purificazione prevede l'utilizzo dell' FPLC, strumento che permette di purificare velocemente le proteine. La colonna utilizzata è la MBP-trap che lega la MBP presente come tag nel prodotto di fusione, ovviamente si tratta di una cromatografia per affinità.

La tecnica prevede l'utilizzo di due buffer, Buffer A per equilibrare la resina in colonna e il buffer B per l'eluizione. Il campione viene immesso in colonna utilizzando una valvola di iniezione e spinto all'interno della stessa grazie alla pressione esercitata dal buffer. L'eluizione viene effettuata con il buffer B, il quale viene immesso nel sistema secondo un gradiente che va dallo 0% al

100%. L'eluato della cromatografia viene analizzato da un rivelatore a raggi UV (280nm/254nm) per determinare la concentrazione proteica e raccolto da un collettore di frazioni. Al termine della cromatografia lo strumento rilascia un cromatogramma.



Analisi delle frazioni ottenute dall'FPLC.

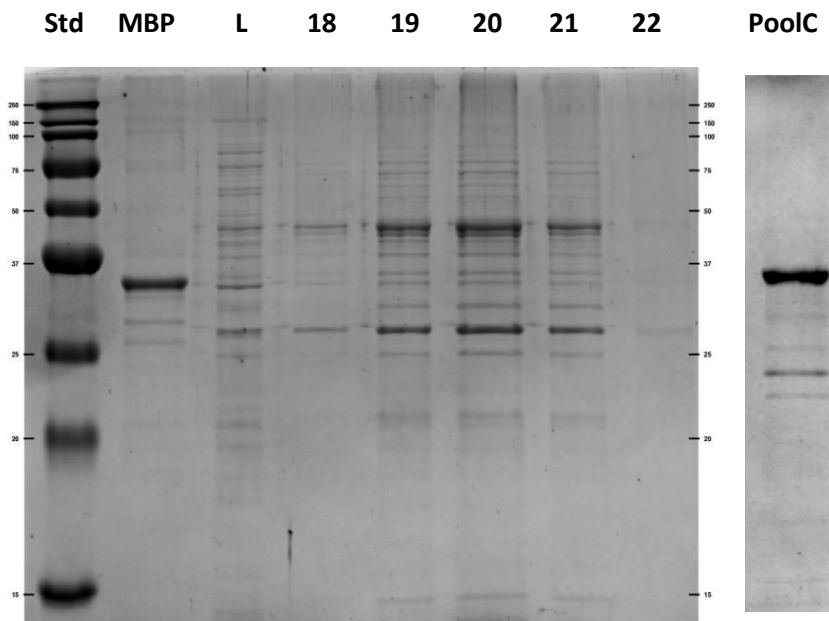


Figura.17 Profilo di purificazione delle isoforma- $\delta$ , FPLC.

Nel gel SDS-PAGE al 12% sono stati caricati **L**: loading, sovrantante del primo unbound centrifugato a 15000g della prima NI-IDA. **18-19-20-21-22** : Frazione del picco FPLC, Frazioni di eluizione ; **MBP**: standard 0.6 mg/ml **PoolC**: Pool concentrato

Dal gel sopra riportato si ottiene l'isoforma-delta pura senza nessun prodotto di fusione tronco; la purezza è intorno al 70%, dunque per l'isoforma-delta tale approccio di purificazione risulta essere ottimale.

### ***3.10 Quantizzazione delle due isoforme- $\beta$ e $\delta$ con il metodo Bradford.***

Il dosaggio delle proteine è stato eseguito utilizzando il saggio Bradford che prevede la quantizzazione delle proteine a 595nm perché l'uso del blu di coomassie porta ad una variazione dell'assorbanza verso tale lunghezza d'onda.

(DETTAGLI IN MM)

$\beta$ : 11.5 mg (2.3 ug/ul)

$\delta$ : 4,5 mg (1.5 ug/ul)

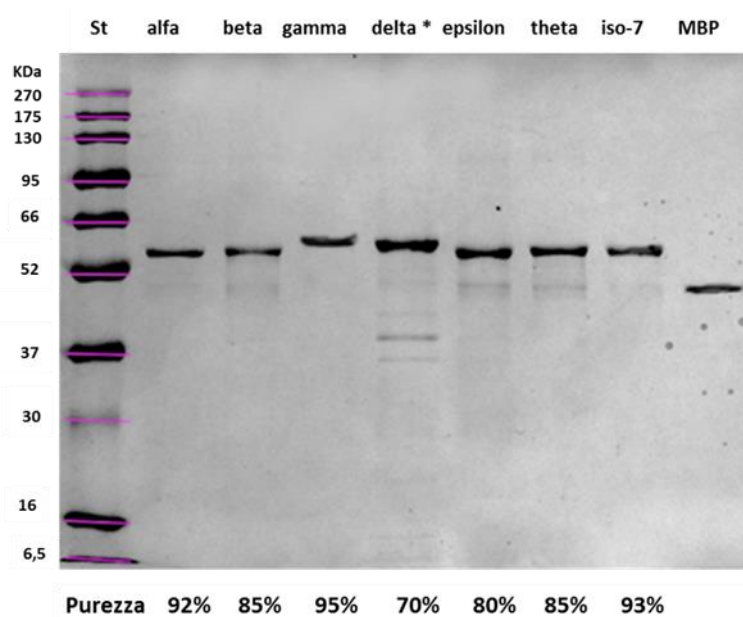


Figura.18 **Analisi riepilogativa delle isoforme CXCL12.**

### ***3.11 Rimozione del TAG con l'utilizzo di una proteasi specifica, l'enterochinasi e recupero di CXCL12.***

Il taglio con l'enterokinasi (EK) originariamente progettato con la forma nativa dell'enzima (EK-Roche) facilmente allontanabile dalla miscela di digestione dei prodotti di fusione insieme alla His-MBP (partner di fusione) attraverso l'ultrafiltrazione con dispositivi selettivi per molecole > 30KDa, non è stato possibile perché l'enzima (di grandi dimensioni) non aveva facile accesso al sito di taglio per molte delle proteine di fusione prodotte.

Quindi abbiamo deciso di utilizzare la forma ricombinate dell'enzima rec-EK (small fragment) commercializzata dalla Novagen.

Con questo enzima, nelle condizioni suggerite dal produttore molte delle proteine di fusione prodotte sono tagliate in modo efficiente, quelle che lo sono di meno potrebbero comunque essere tagliate con quantità maggiori di enzima. Per valutare l'efficienza di taglio si usano dei test in piccola scala, che non permettono però di evidenziare problemi di solubilità del prodotto tagliato.

L'enzima può essere inattivato con un inibitore selettivo AEBSF (dializzabile).

Per affrontare lo scale up delle digestioni secondo le condizioni suggerite dal produttore i nostri prodotti di fusione dovevano essere dializzati con una soluzione contenere 50 mM NaCl, ma alcuni dei prodotti di fusione subivano una parziale precipitazione. Inoltre, la soluzione tampone che accompagna

l'enzima contiene 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , una sostanza che può interferire con la solubilità delle nostre proteine durante la digestione e sicuramente anche in piccole tracce interferire con il saggio biologico.

Quindi è stato necessario verificare se l'enzima manteneva la sua attività anche in presenza di 150 mM NaCl (concentrazione ottimale per i nostri campioni) e valutare se il  $\text{Ca}^{2+}$  era indispensabile per l'enzima.

Per questo motivo abbiamo confrontato l'attività della rec-EK in presenza di 20 mM HEPES pH7,8 +5% glicerolo (condizione già controllata) e l'aggiunta di 150mM NaCl, 50 mM NaCl o 50mM NaCl + 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizzando 10 ug dell'isoforma iso7 in un test in piccola scala (20 ul finali).

Come mostrato nella figx le diverse concentrazioni saline non interferiscono sostanzialmente con il taglio della rec-EK e apparentemente l'iso7 senza tag rimane in soluzione poiché il campione Ds sottoposto a centrifugazione mostra quantità di iso7 proporzionali al controllo di digestione (D).

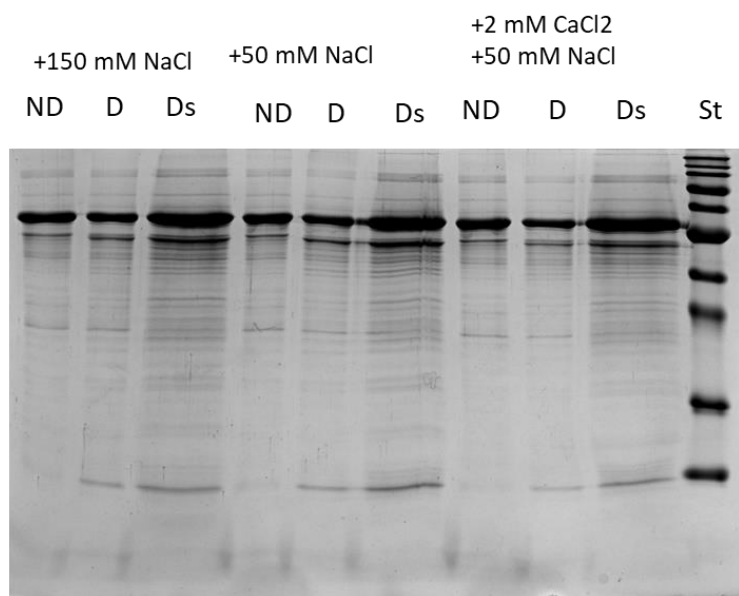


Fig.X Analisi della digestione in piccola scala di Iso7 in diverse condizioni.

Nel gel SDS-PAGE al 15% sono stati caricati 3 ul del campione non digerito (ND) , 3 ul del campione digerito (D), e 12 ul del supernatante (Ds) della miscela di reazione centrifugata a 12,000 xg per 15 min. St: 5ul di standard Biorad.

Per affrontare il recupero della proteina ricombinante dopo il taglio abbiamo fatto una digestione in media scala con la rec-EK di tutte le isoforme (2,5 mg) in presenza di 20 mM HEPES pH 7,8, 150 mM NaCl e 5% glicerolo, utilizzando 10 U di enzima per mg di proteina di fusione con l'incubazione a 22°C per 18-24 ore. Al termine della digestione si aggiunge 1 mM ABSF per inattivare irreversibilmente rec-EK.

In queste condizioni il grado di digestione varia per le diverse isoforme dal 50% al 90%. Aumentando la quantità di enzima le isoforme digerite al 50% possono essere digerite quasi totalmente.

Nel caso specifico, osserviamo che dopo 18 ore MBP-beta è digerita circa al 50% e MBP-delta solo del 30% circa, in riferimento all'aumento di intensità della banda di MBP rilasciata dopo il taglio con rec-EK. (fig Y). abbiamo quindi protratto l'incubazione fino a 24 ore.

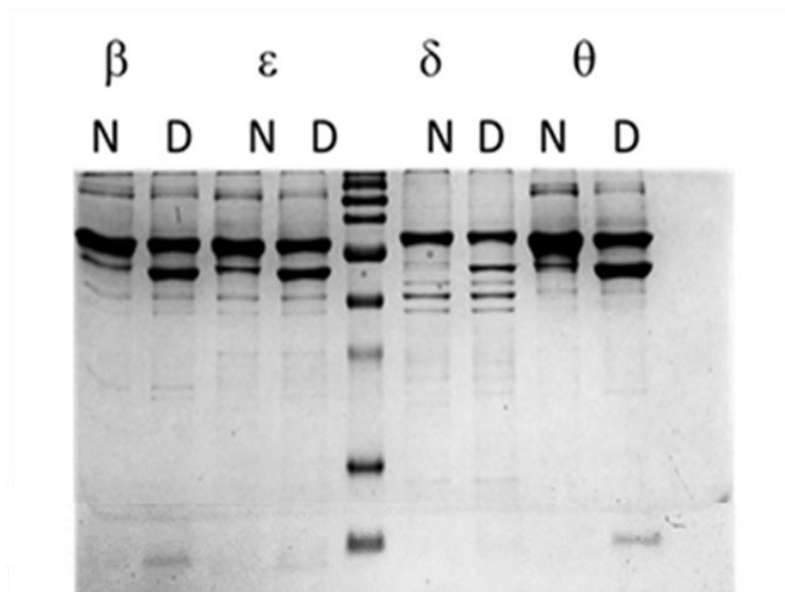


Fig. Controllo della digestione di alcune isoforme di CXCL12 con l'EK a 18 ore.

Nel gel SDS-PAGE mostrato in figura sono stati caricati 2 ul delle miscele prima e dopo la digestione (18 ore) dei campioni evidenziati sopra. St: 5ul Biorad.

Poiché le rec-CXCL12 non sempre vengono evidenziate chiaramente dopo il taglio del Tag, sospettando una precipitazione durante la digestione, è stato



definito un controllo della solubilità dopo la digestione. Al termine dell'incubazione con la rec-EK un'aliquota da 50 ul della miscela di digestione è stata centrifugata e a 12.000 x g per 15 min. il supernatante (S) è stato prelevato come frazione solubile ed il pellet risospeso in 50 ul di soluzione di digestione. (P)

L'analisi di questi campioni ci ha permesso di conoscere quali citochine ricombinanti possono essere recuperate dalla frazione solubile e quali no.

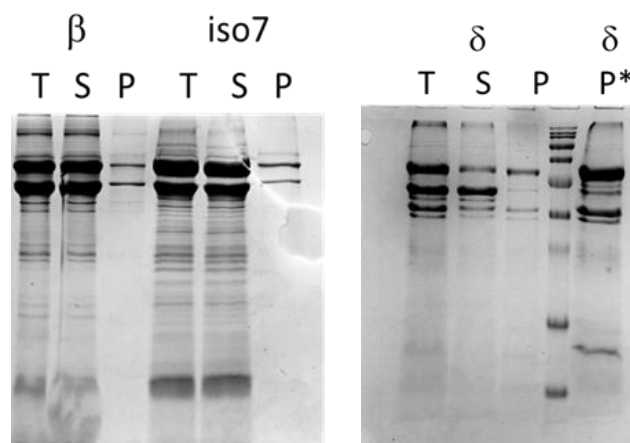


Fig. XX Analisi di solubilità delle isoforme CXCL12 dopo la digestione con l'enterochinasi

Nel gel SDS-PAGE al 15% sono stati caricati 18 ul di miscela di digestione (massimo volume) dopo l'incubazione per 24 ore (T). Un'aliquota da 50 ul di campione digerito è stato centrifugato a 15.000 x g per 15 minuti per ottenere (S) frazione solubile e (P) frazione precipitata. Anche per S e P sono stati caricati 18 ul. Il campione  $\delta$  \* corrisponde al pellet della miscela di digestione risospeso in 1/5 del volume iniziale.

Come si può osservare le isoforme beta ed iso7 sembrano prevalere nella frazione solubile che sarà utilizzata per mettere a punto le modalità di recupero delle CXCL12 ricombinanti con diverse resine di affinità.

Per quanto riguarda l'isoforma delta il test di solubilità (a destra nella fig XX) indica una fievole banda (poco materiale caricato su gel) nel lisato totale e nel pellet (normalizzato con il super) o concentrato 4 volte ( $\delta^*$ ).

Il pellet di delta è stato usato per valutare come solubilizzare questa citochina. Inizialmente sono state usate soluzioni contenenti sali e/o amminoacidi a diversi pH, ovvero condizioni non troppo denaturanti, con scarso successo. L'unica soluzione efficace è stata quella contenete Urea.

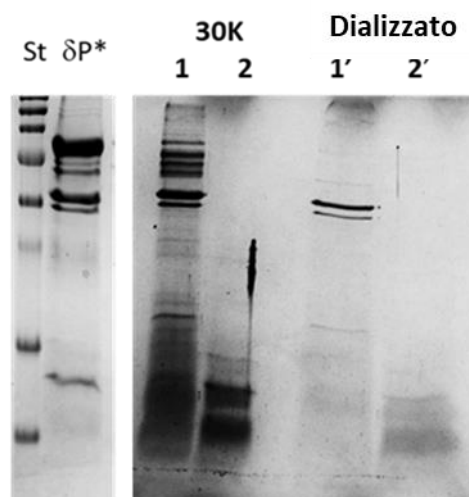


Fig.4 Solubilizzazione di CXCL12 delta

A sinistra Mw Standard , riferimento dalla Fig.3 del pellet risospeso del digerito di delta. Nel gel di destra SDS-PAGE al 15% sono stati caricati 18 ul di: pellet delta digerito denaturato in 8 M urea (1) prima della concentrazione con l'apparato da 30 KDa; 18 ul di materiale eluito dal 30KDa (2); il materiale eluito con il 30K è stato sottoposto a dialisi in PBS . Dopo la dialisi il campione è stato centrifugato 15.000 xg per 15 min, 10 ul del super (materiale solubile) 2' e 10 ul del pellet (1'), normalizzato sul volume del super, sono stati caricati sul gel. Il simbolo (§) indica la forma correttamente ripiegata.

## CONCLUSIONI

Il primo approccio utilizzato per la produzione delle proteine ricombinanti è stato effettuato utilizzando il vettore p7-EK. Dalle analisi dell'espressione dell'isoforma- $\gamma$ , come riportato anche nei risultati, la proteina è presente nei corpi d'inclusione. È necessario l'uso di un sistema di espressione che aiuti la proteina a rimanere in soluzione, in questo caso è stato utilizzato il vettore derivato dal p7-EK, il p9-EK il quale permette di ottenere la proteina in soluzione per la presenza del TAG-MBP.

È stato scelto il sistema procariotico per la produzione delle proteine, la specie utilizzata è E.coli, esistono diversi ceppi batterici da poter utilizzare per l'espressione, in questo caso sono stati testati tre ceppi differenti, BL21(DE3)pLys, C41(DE3), Rosetta (DE3) pLys.

Il ceppo BL21 non sostiene la produzione di tutte le isoforme perché alcune proteine possono risultare tossiche per il ceppo in esame, ciò infatti è riportato anche in letteratura. Le analisi di espressione negli altri due ceppi è risultata essere ottimale e dunque la scelta ricade sull'utilizzo dei ceppi c41-rosetta, dato che le loro caratteristiche sostengono la produzione anche di proteine tossiche.

Vengono riportate in tabella le purificazioni dell' isoforma- $\beta$  per comparare le rese ottenute nei due ceppi per l'espressione.

MBP-beta da C41						
Beta		Recupero sul totale	Solubilità	Recupero Ni-IDA	Unb?	Purezza
LT	45 mg	100%				
LTp	5 mg		10%			
LTs	40 mg	90%				
UB	20 mg				50%	
B Ni-IDA	20 mg	50%		50%		
pA	4 mg	10 %		20%		< 50%

Tabella.1 tabella di purificazione dell'isoforma- $\beta$  da C41

MBP-beta da Rosetta					UN	
Beta		Recupero sul totale	Solubilità	Recupero Ni-IDA		Purezza
LT	60 mg	100%				
LTp	20 mg		30%			
LTs	40 mg	70%				
UB1	20 mg				50%	
B Ni-IDA	20 mg	30%		100%		
pA1	7,5 mg	12 %		38%		50%

Tabella.2 tabella di purificazione dell'isoforma- $\beta$  da Rosetta

MBP-beta da Rosetta 2nd Ni-IDA				
Beta		Recupero sul totale	Recupero Ni-IDA	Purezza
UB1 (loading seconda Ni-IDA)	20 mg			
UB2	5 mg			
BNi-IDA2nd	15 mg	25%	100%	
pA2	12 mg	20%	80%	75%

Tabella.3 tabella di purificazione dell'isoforma- $\beta$  da Rosetta, secondo passaggio in resina Ni-IDA.

Dalle tabelle sopra riportate possiamo dire che la scelta del ceppo Rosetta è stato utile per ottenere una quantità minore di prodotto aspecifico e questo lo si

nota dalla maggior purezza del prodotto di fusione, ma non è stato sufficiente per eliminare il problema relativo al prodotto tronco, His-MBP. L'approccio di purificazione risulta essere non ottimale se teniamo in considerazione il recupero tramite cromatografia Ni-IDA, questo purtroppo è un problema relativo al prodotto che non viene legato e che si perde tramite l'unbound, parliamo del 50% di perdita.

Allo stesso tempo l'unbound è stato utilizzato con una seconda resina Ni-IDA, la proteina ottenuta dall'eluizione è una proteina pura per circa il 75% e non presenta contaminati derivati dal prodotto di fusione tronco.

Quindi i due passaggi in resina risultano essere necessari perché con il primo step viene legata la proteina di fusione e il prodotto tronco, che non risulta essere poi nell'unbound o non risulta essere in una concentrazione tale per cui risulta competere con mbp-CXCL12 per il legame alla resina.

### **Purificazione CXCL12- $\delta$**

Per  $\delta$  i normali approcci di purificazione non risultano essere ottimali, la proteina non viene espressa in elevate concentrazioni come accade per l'isoforma- $\beta$ , partiamo da una concentrazione di proteina pari a 25 mg per  $\delta$  e circa 60mg per  $\beta$ , dunque i numerosi passaggi portano all'ottenimento di un prodotto a bassa resa. Anche qui il primo passaggio in Ni-IDA è necessario per allontanare il prodotto tronco ma anziché utilizzare una seconda cromatografia

con resina Ni-IDA si è pensato di utilizzare la colonna MBP-Trap in FPLC. In questo caso è presente la proteina di fusione la quale contiene il tag MBP che può legare la colonna per affinità. Quest'ultima cromatografia è risultata essere efficiente per il recupero del prodotto puro e senza contaminati.

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

Le ipotesi prese in considerazione per il recupero sono:

**A) Ultrafiltrazione diretta**

- 1) miscela di digestione direttamente sull'apparato di ultrafiltrazione da 30 K (trattiene la His-MBP e molto probabilmente la rec-EK (da verificare) e lascia passare nell'eluato CXCL12)
- 2) l'eluato del 30 K con o senza aggiunta di BSA (conc. finale 0,1 mg/ml) deve poi essere concentrato sull'apparato da 3K
- 3) Preparazione finale in: 20 mM Hepes pH 7,8; 150 mM NaCl; 5% glicerolo
- 4) Dializzare contro PBS sterile

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

- 1) digerito incubato con NI-IDA (la sola His-MBP rimane legata)
- 2) Il materiale non legato (CXCL12) verrà concentrato per ultrafiltrazione (in genere una piccola percentuale di materiale non digerito potrebbe comunque essere presente).
- 3) Dializzare contro PBS sterile

**C) Affinità per l'eparina su filter plate**

- 1) Digerito incubato con resina HB (SIGMA) (solo CXCL12 tagliata dovrebbe legarsi)
- 2) Eluizione in presenza di 1,5M NaCl
- 3) Dializzare contro PBS sterile.

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

Questo approccio usato in precedenza aveva mostrato però una bassa percentuale di recupero, quindi sono stati allestiti diversi controlli per valutare attentamente se il recupero fosse condizionato dalla precipitazione delle

CXCL12 dopo il rilascio del partner di fusione o al binding aspecifico al supporto (dovuto alla bassa concentrazione delle proteine).

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

Con le isoforme alfa e beta abbiamo valutato anche i due approcci con le resine di affinità.

**Per quanto concerne la cromatografia con la Ni-IDA**, abbiamo avuto una sorpresa che in parte spiega le difficoltà nell'utilizzo di questa cromatografia nelle varie purificazioni.

In questo caso abbiamo osservato che le proteine CXCL12 alfa e beta dopo il taglio, nonostante non abbiano il TAG di istidine, sono in grado di legarsi alla matrice Ni-IDA, non è chiaro se direttamente o perché interagiscono con la His-MBP (ipotesi questa che spiegherebbe anche perché il materiale digerito non attraversa il filtro da 30 KDa).



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

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

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

Partendo dalle proteine ricombinanti libere dai vari tag, in futuro si spera di poter effettuare dopo gli appropriati test di attività, ulteriori analisi. Le prospettive future sono quelle di utilizzare l'isoforma delta per lo studio strutturale e per eventuali studi in vitro per comprendere quale sia il reale ruolo di questa citochina alternativa rispetto alla proteina canonica.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] C. T. Veldkamp *et al.*, “Monomeric structure of the cardioprotective chemokine SDF-1/CXCL12,” *Protein Sci.*, vol. 18, no. 7, pp. 1359–1369, 2009.
- [2] A. Righetti, M. Giuliotti, B. Šabanović, G. Occhipinti, G. Principato, and F. Piva, “CXCL12 and Its Isoforms: Different Roles in Pancreatic Cancer?,” *J. Oncol.*, vol. 2019, 2019.
- [3] J. W. Murphy, Y. Cho, A. Sachpatzidis, C. Fan, M. E. Hodsdon, and E. Lolis, “Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ ) binding to heparin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 13, pp. 10018–10027, 2007.
- [4] B. Wu *et al.*, “Structures of the CXCR4 chemokine receptor in complex with small molecule and cyclic peptide antagonists,” *Science (80-. )*, vol. 330, no. 6007, pp. 1066–1071, 2010.
- [5] b Marcin Wysoczynska, Riu Liua, Boguslaw Czernya, Janina Ratajczaka, Magda Kuciaa, and Radoslaw B. Maksyma, Maciej Tarnowska, Katarzyna Grymulaa,b, Joanna Tarnowskaa, Mariusz Z. Ratajczaka, “THE ROLE OF STROMAL DERIVED FACTOR-1 – CXCR7 AXIS IN DEVELOPMENT AND CANCER,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2005.
- [6] C. S.- Cxcl *et al.*, “NIH Public Access,” vol. 1, no. 37, pp. 1–18, 2009.
- [7] S. Nallamsetty, B. P. Austin, K. J. Penrose, and D. S. Waugh, “Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His 6 - MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of Escherichia coli ,” *Protein Sci.*, vol. 14, no. 12, pp. 2964–2971, 2005.
- [8] Y. K. Liang, W. Ping, and L. J. Bian, “Cloning, expression and identification of an isoform of human stromal cell derived factor-1 $\alpha$ ,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 9, no. 5, pp. 1751–1756, 2015.
- [9] F. A. Marston, “The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli,” *Biochem. J.*, vol. 240, no. 1, pp. 1–12, 1986.
- [10] E. Oberlin *et al.*, “The CXC chemokine, stromal cell derived factor 1 (SDF-1), is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by

- lymphocyte-tropic HIV-1 syncytium-inducing strains.,” *Nature*, vol. 382, no. August, pp. 833–835, 1996.
- [11] C. Dealwis, E. J. Fernandez, D. A. Thompson, R. J. Simon, M. A. Siani, and E. Lolis, “Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ , a potent ligand for the HIV-1 ‘fusin’ coreceptor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 12, pp. 6941–6946, 1998.
- [12] B. A. Teicher and S. P. Fricker, “CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 11, pp. 2927–2931, 2010.
- [13] R. Janssens, S. Struyf, and P. Proost, “Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 44, no. October, pp. 51–68, 2018.
- [14] C. Scheich, V. Sievert, and K. Büsow, “An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography,” *BMC Biotechnol.*, vol. 3, pp. 1–8, 2003.
- [15] K. L. M. C. Franken *et al.*, “Purification of His-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: The benefits from the use of organic solvent,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 18, no. 1, pp. 95–99, 2000.
- [16] H. J. Cho *et al.*, “Maltose binding protein facilitates high-level expression and functional purification of the chemokines RANTES and SDF-1 $\alpha$  from *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 60, no. 1, pp. 37–45, 2008.
- [17] X. Sun *et al.*, “CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 4, pp. 709–722, 2010.
- [18] C. Laguri *et al.*, “The novel CXCL12 $\gamma$  isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4,” *PLoS One*, vol. 2, no. 10, pp. 1–10, 2007.
- [19] C. T. Veldkamp, “The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin,” *Protein Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 1071–1081, 2005.

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