

1	INTRODUZIONE	5
1.1	Sistema immunitario e autoimmunità	5
1.2	Malattie autoimmuni e modificazioni post-traduzionali	9
1.3	Sclerosi Multipla	12
1.4	Proteine mieliniche come autoantigeni nella SM	15
1.5	<i>Biomarker</i>	18
1.6	Sonde antigeniche nella SM: CSF114(Glc)	21
2	SCOPO DELLA RICERCA	26
3	PARTE A	27
3.1	MOG come autoantigene della SM	27
3.2	Conformazione MOG: cristallografia a raggi X	31
3.3	Scopo della ricerca	34
3.4	Cellule competenti ed elettroporazione	35
3.5	Plasmidi	37
3.6	Espressione e purificazione di rMOG _{ED} (His) ₆	43
3.7	Dicroismo Circolare	48
3.8	Saggi immunoenzimatici	50
3.9	Espressione e purificazione di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆ in terreni minimi	64
3.10	Studi conformazionali in soluzione di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆	68
3.11	Espressione e purificazione di rMOG _{ED} (1-117)(His) ₆ in terreni minimi	82
3.12	Prove di stabilità e spettri di dicroismo circolare di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆	86

3.13	Spettri di massa di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆	89
3.14	Discussione e sviluppi futuri	89
4	PARTE B	93
4.1	Modificazioni post-traduzionali	93
4.2	Glicosilazione	94
4.3	Scopo della ricerca	98
4.4	<i>Cys-Ligation</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
4.5	Mutagenesi sito specifica per la sostituzione di singoli residui amminoacidici	102
4.6	Espressione e purificazione di rMOG _{ED} N(31)C(His) ₆	106
4.7	Valutazione dei gruppi solfidrici liberi tramite il reagente di Ellman	109
4.8	Reazione di glicosilazione tra rMOG _{ED} N(31)C(His) ₆ e 1- <i>N</i> -[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio	110
4.9	<i>Native Chemical Ligation</i>	113
4.10	<i>Expressed Protein Ligation</i>	116
4.11	Ottenimento del plasmide pTXB1rMOG _{ED} (1-97)	122
4.12	Espressione e purificazione di rMOG _{ED} (1-97)-MESNA	128
4.13	Sintesi del frammento peptidico C-terminale	130
4.14	Tentativi di NCL	135
4.15	Discussione e sviluppi futuri	137
5	PARTE SPERIMENTALE	139
5.1	Materiali e metodi	139
5.2	Terreni di coltura	140

5.3	Tamponi	143
5.4	Elettroforesi su gel di poliacrilammide	146
5.5	Parte Sperimentale: Parte A	150
5.5.1	Preparazione di cellule elettrocompetenti	150
5.5.2	Trasformazione di DH5 α con pQE12rMOG _{ED} (His) ₆ ed isolamento del plasmide	150
5.5.3	Trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG _{ED} (His) ₆ e pREP4	151
5.5.4	Test di espressione di rMOG _{ED} (His) ₆ in terreno LB	152
5.5.5	Espressione in larga scala di rMOG _{ED} (His) ₆ in terreno LB	152
5.5.6	Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi	153
5.5.7	Purificazione e <i>refolding</i> di rMOG _{ED} (His) ₆	154
5.5.8	<i>Gel filtration</i>	155
5.5.9	Dialisi di rMOG _{ED} (His) ₆ in PBS pH 8	156
5.5.10	Test ELISA	156
5.5.11	Modifiche test ELISA	157
5.5.12	Spettri di dicroismo circolare di rMOG _{ED} (His) ₆	160
5.5.13	Test di espressione di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆ in terreno NMM	160
5.5.14	Test di espressione di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆ in terreno M9	161
5.5.15	Espressione in larga scala di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆ in terreno M9	161
5.5.16	Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi	162
5.5.17	Purificazione e <i>refolding</i> di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆	162
5.5.18	Dialisi di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆ in CH ₃ COONa pH 4.5	163
5.5.19	Dialisi di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆ in NaH ₂ PO ₄ pH 4.6	164
5.5.20	Spettri di dicroismo circolare di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆	164
5.5.21	Spettri NMR di rMOG _{ED} ¹⁵ N(His) ₆	165
5.5.22	Trasformazione di ER2566 con pET22MOG _{ED} (1-117)(His) ₆	165
5.5.23	Test di espressione di rMOG _{ED} (1-117)(His) ₆ in terreno LB	165
5.5.24	Espressione in larga scala di rMOG _{ED} (1-117)(His) ₆ in terreno M9	166
5.5.25	Lisi cellulare e solubilizzazione dei corpi inclusi	167
5.5.26	Purificazione e <i>refolding</i> di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆	168
5.5.27	Dialisi di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆ in tampone fosfato 20 mM pH 4.7	169
5.5.28	Dialisi di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆ in tampone fosfato 20 mM pH 6	169
5.5.29	Dialisi di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆ in tampone fosfato 20 mM a pH 8	169
5.5.30	Spettri di dicroismo circolare di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆	170
5.5.31	Spettrometria di massa di rMOG _{ED} (1-117) ¹⁵ N(His) ₆	170

5.6	Parte Sperimentale: Parte B	171
5.6.1	Mutagenesi sito-specifica sul plasmide pQE12rMOG _{ED} (His) ₆	171
5.6.2	Sequenziamento del DNA plasmidico	173
5.6.3	Trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG _{ED} N31C(His) ₆ e pREP4	174
5.6.4	Test di espressione di rMOG _{ED} N31C(His) ₆ in terreno LB	175
5.6.5	Espressione in larga scala di rMOG _{ED} N31C(His) ₆ in LB	175
5.6.6	Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi	176
5.6.7	Purificazione e <i>refolding</i> di rMOG _{ED} N31C(His) ₆	177
5.6.8	Dialisi di rMOG _{ED} N(31)C(His) ₆ in tampone fosfato 20 mM pH 8	178
5.6.9	Spettri di massa di rMOG _{ED} N(31)C(His) ₆	178
5.6.10	Curva di taratura per il saggio delle cisteine libere	178
5.6.11	Glicosilazione di rMOG _{ED} N(31)C(His) ₆ in <i>EluBuffer</i> pH 8	180
5.6.12	Glicosilazione di rMOG _{ED} N(31)C(His) ₆ in tampone fosfato 20 mM pH 8	180
5.6.13	Trasformazione di DH5 α con pQE12rMOG _{ED} (His) ₆ ed isolamento del plasmide	180
5.6.14	Amplificazione tramite PCR del frammento rMOG _{ED} (1-97)	182
5.6.15	<i>Double digestion</i> del plasmide pTXB1	185
5.6.16	<i>Double digestion</i> del frammento amplificato	187
5.6.17	<i>Ligation</i> tra il frammento amplificato e il vettore pTXB1	188
5.6.18	Trasformazione di ER2566 con pTXB1rMOG _{ED} (1-97)	190
5.6.19	Espressione in larga scala di rMOG _{ED} (1-97)-inteina-CBD in terreno LB	190
5.6.20	Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi	191
5.6.21	Purificazione di rMOG _{ED} (1-97)-MESNA	191
5.6.22	Saggio di Bradford	192
5.6.23	Sintesi peptidica in fase solida	193
5.6.24	<i>Cleavage</i> del peptide dalla resina	194
5.6.25	Reazione di deacetilazione del glicopeptide [Gly ¹⁰³ ,Asn ¹⁰⁴ (Glc)]MOG _{ED} (98-117)	195
5.6.26	Tentativi di NCL	195

1 INTRODUZIONE

1.1 Sistema immunitario e autoimmunità

I meccanismi del sistema immunitario si basano sulla capacità di riconoscere ciò che è proprio da ciò che è estraneo. Infatti, in seguito all'introduzione di un agente esterno e perciò potenzialmente patogeno (antigene), si scatenano nell'organismo due diverse reazioni tra loro correlate: la risposta umorale e la risposta cellulo-mediata.

Nella risposta umorale gli anticorpi, proteine solubili prodotte dai linfociti B, vengono utilizzati per formare un complesso antigene/anticorpo capace di neutralizzare l'agente estraneo. Le cellule B sono programmate per esprimere sulla membrana cellulare un solo tipo di anticorpo che agisce semplicemente come recettore per proteine o frammenti peptidici di particolare affinità, detti epitopi.

La risposta cellulo-mediata è effettuata dai linfociti T: essi stimolano i linfociti B e combattono con un meccanismo più complesso le sostanze estranee, fino ad arrivare all'uccisione delle cellule che ne sono state invase. Nel meccanismo immunitario mediato dalla risposta cellulare T, la proteina di membrana complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) è in grado di riconoscere i frammenti peptidici derivanti dall'idrolisi di tutti i tipi di proteine presenti all'interno della cellula (peptidi *self*), senza scatenare la risposta immunitaria (Fig. 1.A).

I peptidi *self*, che costituiscono la "carta d'identità" della cellula, possono essere sostituiti da peptidi *non self* provenienti da agenti estranei che hanno infettato la cellula stessa (Fig. 1.B). Le cellule T sono in grado di distinguere attraverso un recettore specifico, il TCR (*T Cell Receptor*), il complesso MHC/antigene peptidico. La formazione del complesso trimolecolare porta quindi allo scatenarsi della risposta immunitaria.

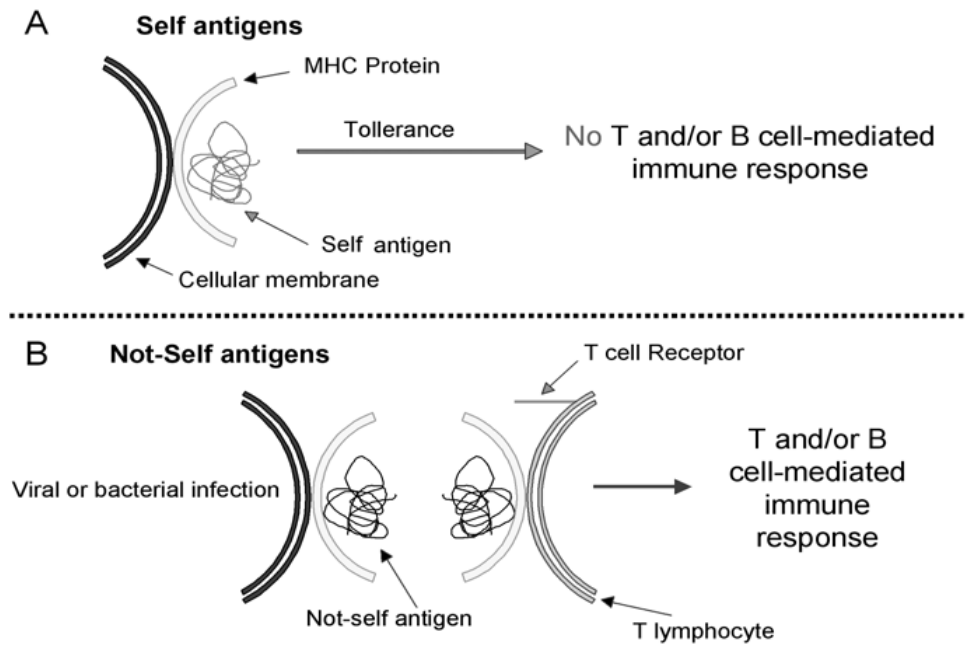


Figura 1. Risposta immunitaria.

Il riconoscimento degli antigeni da parte delle cellule T è l'evento chiave di iniziazione per la maggior parte delle risposte immunitarie ed è il prerequisito per scatenare gli effettori delle cellule T, per attivare le cellule B, per differenziare le cellule che formano gli anticorpi e per attivare i macrofagi.

Il sistema immunitario possiede inoltre metodi raffinati di regolazione che permettono al meccanismo di difesa di porsi in uno stato silente (anergia), una volta combattuto l'agente patogeno, per far fronte successivamente a nuove infezioni.

Nel sistema immunitario cellulo-mediato specifiche glicofornie sono coinvolte nel *foldin*, nel controllo della qualità e nell'assemblaggio del complesso MHC/antigene peptidico. Sono stati compiuti interessanti studi sul destino della controparte glicosidica durante la processazione di antigeni glicopeptidici e la capacità di cellule T di riconoscere questi particolari antigeni. In molti casi risulta evidente che, controllando il legame dell'epitopo glicopeptidico con l'MHC, la controparte glicosidica può influenzarne

l'immunogenicità.¹ La presenza o meno di una modificazione co- o post-traduzionale nella proteina può infatti influire sulla modalità di taglio enzimatico e di conseguenza sul tipo di epitopo che viene esposto sulla superficie cellulare, scatenando così una risposta effettrice anomala, dovuta ad un riconoscimento *non-self*.

Nel sistema immunitario umorale la maggior parte delle immunoglobuline (IgM e/o IgG) e delle componenti del complemento sono glicosilate. È noto ormai che gli oligosaccaridi, oltre a contribuire alla stabilità delle proteine a cui sono legati, esercitano un controllo di qualità durante la sintesi delle proteine e regolano la trasmissione del segnale intracellulare;² inoltre molti glicani sono coinvolti in eventi riconoscitivi.

Molte glicoproteine espongono agli anticorpi epitopi discontinui che coinvolgono siti di glicosilazione. Da studi effettuati si è osservato che alcuni anticorpi riescono a riconoscere solamente una specifica conformazione del peptide, indotta dalla glicosilazione.³ Molti determinanti conformazionali, infatti, non sono più riconosciuti quando viene eliminato il sito di *N*-glicosilazione ed in molti casi l'antigenicità di epitopi glicopeptidici è dovuta alla conformazione indotta dal residuo glicosidico, piuttosto che alla partecipazione di quest'ultimo nel riconoscimento antigenico.⁴

Il sistema immunitario può occasionalmente attaccare gli antigeni *self*, dando luogo a meccanismi autoimmunitari. Gli eventi che possono scatenare una specifica risposta autoimmunitaria non sono sempre conosciuti: possono essere di natura genetica o di natura virale in cui proteine *non-self* di virus e batteri possono mimare antigeni *self* dell'organismo scatenando, oltre ad una risposta immunitaria, una successiva risposta autoimmunitaria.

¹ S. Mourtsen, M. Meldal, I. Christiansen-Brams, H. Elsner, O. Werdelin, Attachment of oligosaccharides to peptide antigen profoundly affects binding to major histocompatibility complex class II molecules and peptide immunogenicity, *Eur. J. Immunol.*, **1994**, 24, 1066-1072.

² L. G. Baum, Developing a taste for sweets, *Immunity*, **2002**, 16, 5-8.

³ R. A. Rudick, "Multiple sclerosis and related conditions", *Cecil Textbook of Medicine 20th edition*, **1996**, 2106.

⁴ D. Davis, D. M. Stephens, C. Willers, P. J. Lachmann, Glycosylation governs the binding of antipeptide antibodies to regions of hypervariable amino acid sequence within recombinant gp120 of human immunodeficiency virus type 1, *J. Gen. Viral.*, **1990**, 71, 2889-2898.

L'autoimmunità è pertanto causata da una risposta del sistema immunitario acquisito contro antigeni *self* non più riconosciuti come tali e quindi riconosciuti come *non-self* (Fig. 2).

Le malattie autoimmuni sono in genere scatenate dall'attivazione di cellule T antigene-specifiche che sono in grado di indurre una risposta autoanticorpale. Queste risposte sono causa di prolungata infiammazione e/o successivo danno ai tessuti. In alcune risposte autoimmuni il danno può essere localizzato ad un singolo organo, mentre in altre provoca un danno sistemico.

Antigeni Self riconosciuti come Non -Self

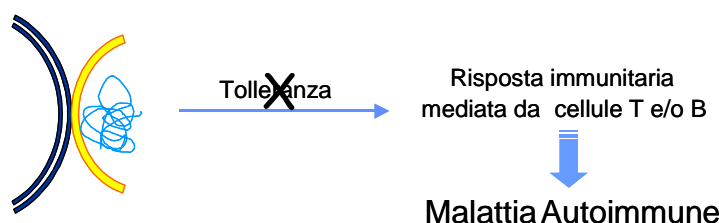


Figura 2. Risposta autoimmunitaria.

Le ricerche rivolte all'identificazione e alla caratterizzazione di antigeni proteici coinvolti nella risposta autoimmunitaria acquisita hanno troppo spesso tralasciato di considerare, nel riconoscimento di tali antigeni, un possibile ruolo degli zuccheri eventualmente presenti nella struttura proteica (modificazioni co- e post-traduzionali). Sebbene la glicosilazione sia sempre più considerata un evento chiave nella regolazione del sistema immunitario,⁵ le ricerche in questo settore incontrano grandi difficoltà a causa della considerevole eterogeneità dei siti di glicosilazione specifici per ogni proteina ed al fatto che l'espressione di molti enzimi coinvolti nel processo stesso (glicosiltransferasi e glicosidasi) cambia durante la differenziazione cellulare.

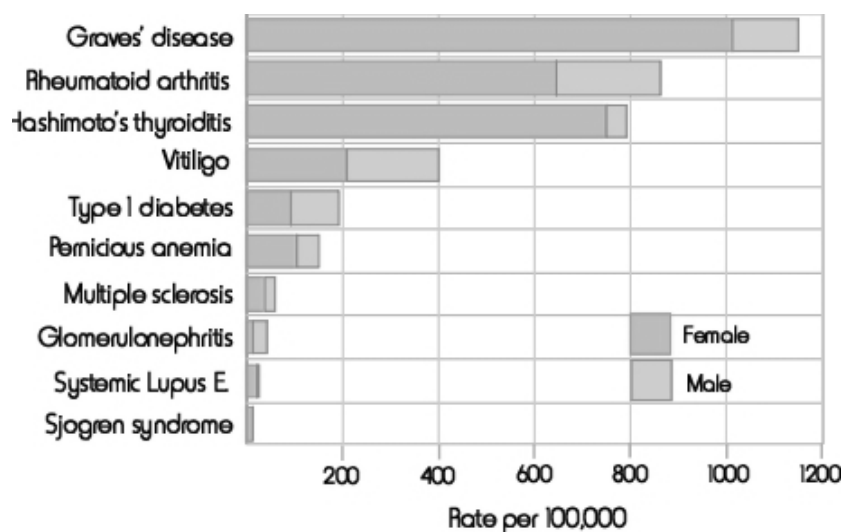
⁵ M. A. Daniels, K. A. Hoquist, S. C. Jameson, Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses, *Nature Immunology*, **2002**, 10, 903-910.

In questo contesto è evidente che le glicoproteine ed eventuali difetti di glicosilazione in esse, geneticamente predisposte e/o indotte da effetti di mimica molecolare di agenti patogeni, risultano estremamente importanti per il riconoscimento dei neoantigeni, riconosciuti come *non-self*, e perciò scatenanti una risposta autoimmunitaria.

A causa di questi effetti concomitanti, è evidente come la glicosilazione possa influenzare diversi aspetti del sistema immunitario. L'impatto della glicosilazione sulla struttura ed il riarrangiamento intracellulare delle glicoproteine è ben noto, e le interazioni dei carboidrati possono influire sullo sviluppo, la migrazione e la risposta autoimmunitaria.

1.2 Malattie autoimmuni e modificazioni post-traduzionali

Le malattie autoimmuni affliggono più del 5% della popolazione mondiale, la maggior parte della quale è costituita da pazienti di sesso femminile (Fig. 3).⁶



⁶ D. L. Jacobson, S. J. Gange, N. L. Rose, M. Neil, H. Graham, Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **1997**, 84, 223–43.

Figura 3. Incidenza delle principali malattie autoimmuni.

La maggior parte delle malattie autoimmuni sono altamente invalidanti, prevedono una prospettiva di vita piuttosto lunga e presentano, quindi, un elevato impatto sociale, sia in termini di costi che di qualità della vita. Risulta quindi importante poter effettuare una diagnosi precoce e seguire l'evoluzione della patologia con test clinici semplici e a basso costo: spesso, infatti, le tecniche diagnostiche utilizzate, sebbene siano molto attendibili, non sono adatte ad analisi di *routine*, sia per quanto riguarda il costo che l'invasività.

Fino ad oggi è stato proposto un ingente numero di terapie per il trattamento delle malattie autoimmuni, anche se, purtroppo, le conoscenze circa i fattori che possono fornire una previsione della risposta individuale al trattamento di pazienti con farmaci specifici sono alquanto deficitarie.

Un certo numero di malattie autoimmuni sono state associate a modificazioni post-traduzionali, le quali hanno dimostrato di alterare la funzionalità e l'immunogenicità di antigeni quali proteine e peptidi; infatti, tali modificazioni possono mascherare gli antigeni *self*, creandone di nuovi non più riconosciuti dal sistema immunitario. E' stato così riconosciuto che una parte di queste modificazioni chimiche introdotte nelle proteine, durante o dopo la loro sintesi, abbia potuto influenzare il meccanismo di tolleranza e, successivamente, abbia portato all'induzione della risposta autoimmune verso proteine *self* altrimenti ignorate.⁷

Sono state ritrovate grandi varietà di risposte autoimmuni dipendenti da modificazioni post-traduzionali presenti su antigeni *target*, sia per quanto riguarda malattie umane che modelli animali (Fig. 4).

⁷ H. A. Doyle, M. J. Mamula, Posttranslational protein modifications: new flavors in the menu of autoantigens, *Curr. Opin. Rheumatol.*, **2002**, 14, 244-249.

Disease	Modification	Antigen	Immune response		Model	Required for response	Refs
			T cell	B cell			
EAE and multiple sclerosis	Phosphorylation	α B-crystallin	Specific	ND	Mouse	No	13
	Deimination	MBP	Specific	Diverse	Rat	No	7
	Acetylation	MBP-Ac1-11	Specific	ND	Mouse	Yes	6
Collagen-induced arthritis	Glycosylation and hydroxylation	Type II collagen	Specific	ND	Mouse and rat	No	14 57
Rheumatoid arthritis	Deimination	Fibrin	ND	Specific	Human	ND	58
SLE	Phosphorylation	Multiple	ND	Diverse	Human	ND	40,12
	Isoaspartylation	snRNP D	Specific	Diverse	Mouse	Yes	8
	Mannose modification	Multiple	ND	Diverse	Mouse	Yes	59
	sDMA modification	Sm D1 and D3	ND	Specific	Human	ND	11
Celiac disease	Deamidation	Wheat gliadin	Specific	Specific to tTG	Human	Yes	60,61
Atherosclerosis	Lipid peroxidation	LDL and others	Specific	Diverse ^b	Mouse	Yes	62

^aAbbreviations: Ac, acetylated; EAE, experimental allergic encephalomyelitis; LDL, low density lipoprotein; MBP, myelin basic protein; ND, not determined; sDMA, symmetrical dimethyl arginine; SLE, systemic lupus erythematosus; snRNP, small nuclear ribonucleoprotein; tTG, tissue transglutaminase.

^bDepends on particular modification.

Figura 4. Correlazione tra malattie autoimmuni e modificazioni post-traduzionali.

Per esempio, l'artite reumatoide è una malattia autoimmune in cui proteine citrullinate sono state identificate negli ultimi anni come target specifici degli auto-anticorpi reumatoidi.⁸

Altri esempi significativi di modificazioni post-traduzionali sono stati osservati nella sclerosi multipla e nel suo modello animale, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE). Il peptide acetilato N-terminale della proteina basica della mielina [AcMBP(1-11)] è necessario per la generazione dell'EAE, come mostrato dall'analisi dei cloni delle cellule T encefalotigeniche. Il peptide non acetilato non è capace di stimolare le cellule T e di dare l'EAE.⁹

⁸ L. Cao, D. Sun, J. N. Whitaker, Citrullinated myelin basic protein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats through a diverse T cell repertoire, *J. Neuroimmunol.*, **1998**, 88, 21–29.

⁹ S. S. Zamvil, D. J. Mitchell, A. C. Moore, K. Kitamura, L. Steinman, J. B. Rothbard, T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis, *Nature*, **1986**, 324, 258–260.

1.3 Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica, demielinizzante e neurodegenerativa del sistema nervoso centrale (SNC) molto frequente nelle popolazioni del nord Europa e del nord America, che colpisce soggetti, prevalentemente di sesso femminile, tra i 20 e i 45 anni, con un picco di incidenza intorno ai 30 anni (Fig. 5).

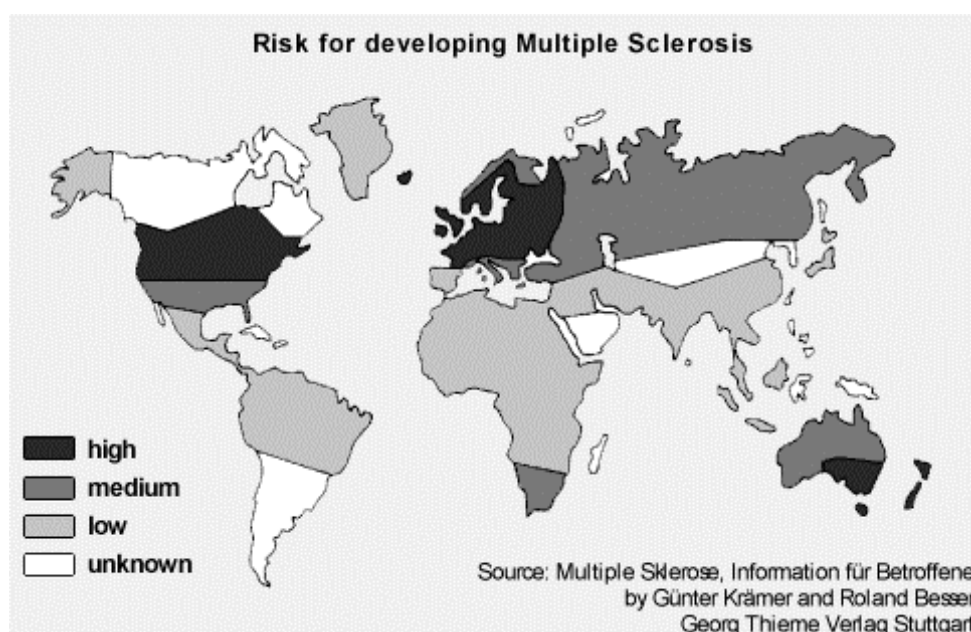


Figura 5. Distribuzione mondiale della popolazione affetta da Sclerosi Multipla.

L'eziologia di questa patologia non è stata ancora chiarita, ma sembra che l'insorgenza delle manifestazioni cliniche sia dovuta a molteplici variabili, quali fattori ambientali, genetici e immunologici, che, con molta probabilità, svolgono un ruolo sinergico.¹⁰ Le ricadute cliniche della SM possono essere associate a concomitanti o precedenti infezioni virali; a tal proposito non è stato ancora accertato se la malattia possa essere scatenata da agenti infettivi

¹⁰ C. Lucchinetti, W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, H. Lassmann, Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination, *Ann. Neurol.*, 2000, 47, 707-717.

o meno, o possa, invece, innescare una risposta crociata, portando a una reazione autoimmunitaria nei confronti di specifici antigeni della mielina.

La SM è caratterizzata da infiltrati di cellule del sistema immunitario: il profilo infiammatorio delle lesioni attive, infatti, è rappresentato da infiltrazioni perivascolari di linfociti T CD4⁺/CD8, monociti e linfociti B.¹¹ I linfociti si trovano normalmente nella materia bianca oltre il margine di demielinizzazione attiva (Fig. 6).¹²

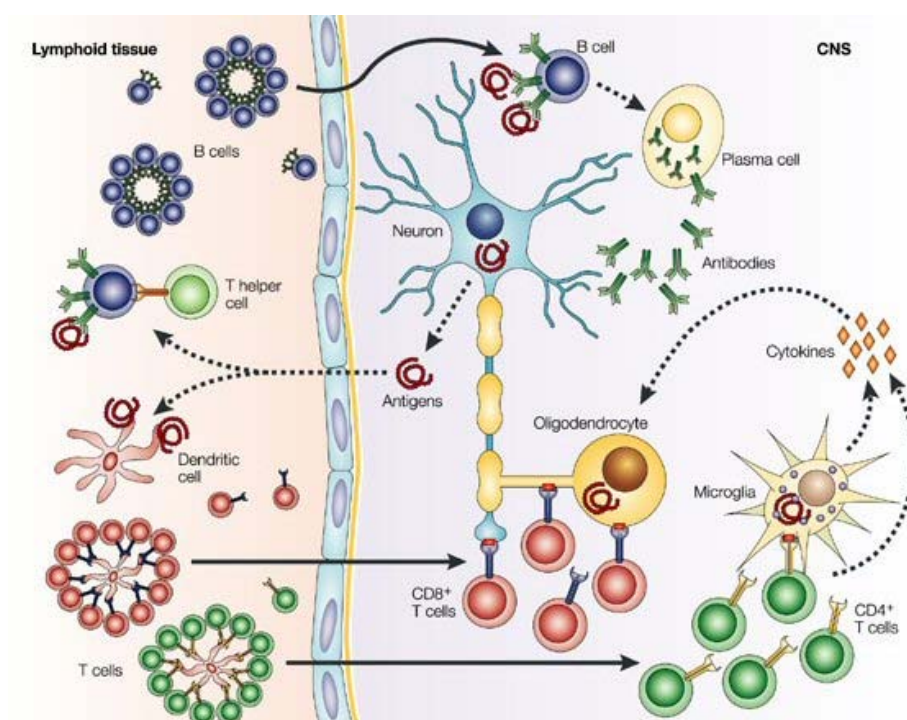


Figura 6. Ipotetica visione della risposta immunitaria nelle lesioni acute della SM.¹³

Altri aspetti della patologia prevedono la distruzione della guaina mielinica, con comparsa di lesioni della sostanza bianca, perdita di

¹¹ U. Traugott, E. L. Reinherz, C. S. Raine, Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions, *Science*, **1983**, 219, 308-310.

¹² J. Prineas, Pathology of the early lesion in multiple sclerosis, *Hum. Pathol.*, **1975**, 6, 531-554.

¹³ B. Hemmer, J. J. Archelos, H. Hartung, New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, *Nature Reviews Neuroscience*, **2002**, 3, 291-301.

oligodendrociti e, conseguentemente, degenerazione degli assoni neuronali. La presenza di lesioni demielinizzanti comporta il danneggiamento della conduzione saltatoria dell'impulso nervoso: infatti, i sintomi della malattia sono per lo più legati al rallentamento della trasmissione nervosa.

Le lesioni possono insorgere in diverse zone del SNC; il quadro clinico, quindi, risulta molto eterogeneo e comprende disturbi sensoriali, paralisi, deficit della visione e della coordinazione motoria.

Le lesioni sono localizzate in aree di sostanza bianca in cui si ritrovano abbondanti infiltrati di macrofagi, di linfociti T e B e cellule microgliali attivate; quest'ultime sono solitamente accompagnate da un contemporaneo danneggiamento della barriera ematoencefalica, dalla presenza di edema e demielinizzazione, manifestazioni caratteristiche di un evento sostanzialmente di tipo infiammatorio.

La SM è una malattia eterogenea le cui manifestazioni cliniche variano da forme a decorso benigno a quelle a decorso rapidamente evolutivo e invalidante. Ormai è sempre più accertato che la SM sia costituita da un raggruppamento di malattie che si distinguerebbero in base a cause scatenanti l'insorgenza delle lesioni della guaina mielinica;¹¹ in particolare, è stata proposta una classificazione in quattro sottogruppi con distinti meccanismi patogenetici:

- demielinizzazione mediata da cellule T;
- demielinizzazione mediata da anticorpi, correlata con la forma remittente-ricidivante (RR-SM);
- distruzione della mielina attiva;
- oligodendrogliopatia o distrofia oligodendrocitica.

In base al decorso clinico, inoltre, la patologia può essere classificata nel modo seguente:

- Recidivante-Remittente (RR), caratterizzata da periodi ricorrenti di deterioramento neurologico seguiti da remissione sintomatologica con recupero più o meno completo;

- Cronico-Progressiva Secondaria (CPS), nella quale si presenta un deterioramento neurologico continuo progressivo e reversibile con esacerbazioni seguite da parziale remissione;
- Cronico-Progressiva Primaria (CPP), deterioramento neurologico continuo e irreversibile sin dall'esordio in assenza di esacerbazione.

1.4 Proteine mieliniche come autoantigeni nella SM

La guaina mielinica è costituita da estese propaggini della membrana plasmatica degli oligodendrociti, che si avvolgono a spirale attorno agli assoni dei neuroni del SNC. Ogni oligodendrocita fornisce la mielina per un solo segmento di più assoni e ogni assone è avvolto da segmenti mielinici forniti da oligodendrociti diversi.

La guaina mielinica non è continua, infatti, lungo l'assone ci sono delle interruzioni della guaina, tra un segmento e l'altro, definite nodi di Ranvier, in cui la membrana assonale eccitabile, ricca di canali per il sodio, è esposta al liquido extracellulare.

La mielina, in vivo, ha un contenuto di acqua di circa il 40%. La massa secca è costituita per il 70-85% da lipidi e per il restante 15-30% da proteine. Non ci sono lipidi specifici della mielina, ma il cerebroside è il lipide più tipico. Le proteine maggiormente rappresentate nella mielina sono la Proteina Basica della Mielina (MBP, 30%) e la Proteina Proteolipidica (PLP, 50%); costituenti minori ma di importante significato funzionale sono la Glicoproteina Associata alla Mielina (MAG) e la Glicoproteina Oligodendrocitica della Mielina (MOG) (Fig. 7).

PLP è una proteina integrale di membrana, con numerosi domini idrofobici che attraversano il doppio strato lipidico ed ha i propri domini proteici esposti al riconoscimento da parte del sistema immunitario.¹⁴

MBP è una proteina estrinseca, localizzata esclusivamente nella superficie citoplasmatica della membrana, nella linea densa maggiore. Entrambe queste proteine sembrano stabilizzare la struttura multilamellare della mielina.

MAG è una glicoproteina che viene espressa precocemente nei processi periferici delle cellule mielinizzanti; è una componente minore della guaina mielinica compatta matura. Si localizza principalmente sulla faccia della guaina mielinica ad immediato contatto con l'assone. La sua espressione precoce, la localizzazione subcellulare e la somiglianza strutturale con i componenti della superfamiglia delle Immunoglobuline (Ig), suggeriscono che abbia un ruolo nelle fasi precoci della mielinizzazione, promuovendo l'adesione tra la cellula mielinizzante e l'assone.

MOG costituisce lo 0,05% in peso ed è caratterizzata da un singolo dominio extracellulare tipo-Ig, di funzione sconosciuta, presente sulla superficie della guaina mielinica e quindi in una zona facilmente accessibile all'attacco anticorpale.^{15,16}

¹⁴ V. K. Tuohy, R. A. Sobel, M. B. Lees, Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice, *J. Immunol.*, **1988**, 140, 1868-1873.

¹⁵ T. G. Johns, C. C. A. Bernard, The Structure and function of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, *J. Neurochem.*, **1999**, 72, 1-9.

¹⁶ A. Iglesias, J. Bauer, T. Litznerberger, A. Schubart, C. Linington, T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Glia*, **2001**, 36, 220-234.

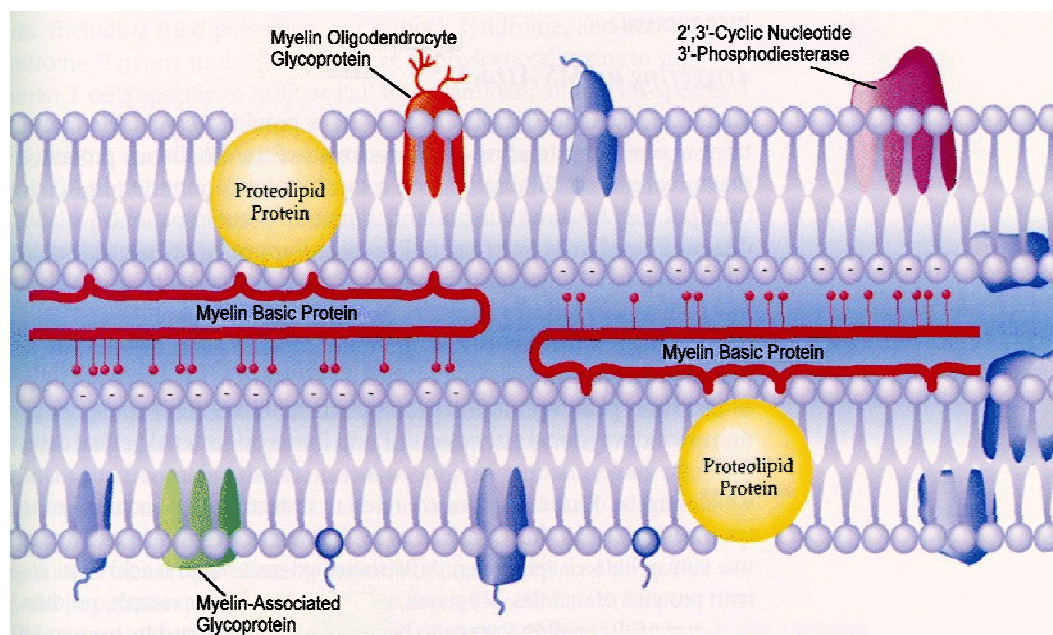


Figura 7. Struttura di una lamella mielinica.

Le proteine mieliniche sono state individuate come possibili *target* degli autoanticorpi nella SM anche se non è ancora stato chiarito come la reazione autoimmune, responsabile della demielinizzazione nella malattia, sia da relazionarsi alla presenza di alcune di queste.^{17,18}

MOG è stata proposta come putativo autoantigene della risposta immunitaria nella SM, in quanto, presentando una porzione glicosidica, viene espressa sulle lamelle più esterne della guaina mielinica;¹⁹ infatti, anticorpi anti-MOG hanno mostrato di mediare la demielinizzazione, sia in esperimenti *in vitro* che in modelli animali, dirigendo la loro azione sul dominio

¹⁷ J. H. Noseworthy, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, B. G. Weinshenker, Multiple Sclerosis, *N. Engl. J. Med.*, **2000**, 343, 938-952.

¹⁸ M. Reindl, C. Linington, U. Brehm, R. Egg, E. Dilitz, F. Deisenhammer, W. Poewe, T. Berger, Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study, *Brain*, **1999**, 122, 2047-2056.

¹⁹ C. Linington, M. Bradl, H. Lassmann, C. Brunner, K. Vass, Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein, *Am. J. Pathol.*, **1988**, 130, 443-454.

extracellulare della proteina.²⁰ Gli anticorpi anti-MOG, inoltre, sono stati localizzati all'interno dei resti di mielina presenti nelle lesioni caratteristiche della malattia: questo dato suggerisce un importante ruolo della proteina nel danno mielinico.²¹ Nel siero di pazienti affetti da SM sono stati trovati, infatti, anticorpi anti-MOG, probabilmente implicati nei cambiamenti degenerativi, quali perdita assonale e gliale; è stata inoltre individuata una correlazione diretta tra il titolo anticorpale e il grado di infermità dei pazienti stessi.²²

1.5 *Biomarker*

Un numero in costante aumento di individui nel mondo è affetto da malattie autoimmuni, spesso caratterizzate da lunghi prodromi in cui non sono evidenti sintomi clinici. In alcuni casi, sono stati sviluppati trattamenti terapeutici rivolti al miglioramento della qualità di vita del paziente.

Test affidabili sono particolarmente importanti per le malattie autoimmuni, non solo per la necessità di effettuare una diagnosi precoce e di monitorare lo stato di avanzamento della malattia, ma anche per mettere a punto trattamenti terapeutici personalizzati. Queste malattie sono generalmente associate a reazioni immunologiche umorali o cellulo-mediate dirette verso uno o più componenti dell'organismo stesso. Pertanto, gli autoanticorpi, se rivelabili nel siero di pazienti, possono essere utilizzati per guidare i trattamenti clinici di alcune malattie autoimmuni.

Lo sviluppo di terapie processo-specifiche potrebbe risultare impossibile senza l'impiego di *biomarker*, fattori importanti che permettono di segnalare il

²⁰ N. Kerlero de Rosbo, P. Honegger, H. Lassmann, J. M. Matthieu, Demyelination induced in aggregating brain cell cultures by a monoclonal antibody against myelin/oligodendrocyte glycoprotein, *J. Neurochem.*, **1990**, 55, 583-587.

²¹ C. P. Genain, B. Cannella, S. L. Hauser, C. S. Raine, Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis, *Nat. Med.*, **1999**, 5, 170-175.

²² R. Mantegazza, P. Cristaldini, P. Bernasconi, F. Baggi, R. Pedotti, I. Piccini, N. Mascoli, L. La Mantia, C. Antozzi, O. Simoncini, F. Cornelio, C. Milanese, Anti-MOG autoantibodies in Italian multiple sclerosis patients: specificity, sensitivity and clinical association, *Inter. Immunol.*, **2004**, 16, 559-565.

processo in questione, di poter selezionare una popolazione di pazienti e di poter operare da sussidio durante le prime fasi di ricerca di nuovi agenti terapeutici.

I *biomarker* sono elementi decisionali importanti per lo sviluppo di farmaci e per la diagnosi di malattie. Nonostante il termine si riferisca agli analiti presenti nei fluidi biologici, qualsiasi misura che predice lo stato della malattia di una persona o la risposta alla terapia e, quindi, che ha un valore diagnostico/prognostico può essere definita *biomarker*. Per questo un *biomarker* rappresenta un elemento caratteristico, che può essere valutato e misurato oggettivamente come indicatore di normali processi biologici, patogenetici o di risposte farmacologiche susseguenti a intervento terapeutico.²³

I sieri di pazienti affetti da malattie autoimmuni spesso contengono molteplici tipi di autoanticorpi, alcuni dei quali possono essere esclusivi di una malattia e perciò usati come *biomarker* per la diagnosi, mentre altri possono oscillare con l'andamento della malattia e quindi sono indispensabili nel *follow up* dei pazienti.

Gli autoanticorpi utilizzati come *biomarker* nelle malattie autoimmuni possono essere strumenti risolutivi per le terapie. In particolare, per queste patologie, un affidabile strumento diagnostico/prognostico è necessario non solo per una facile diagnosi e per un monitoraggio dell'attività della malattia, ma anche per stabilire un trattamento personale. Dal momento che le malattie autoimmuni sono generalmente associate ad una reazione immunologica contro i propri costituenti, l'analisi qualitativa e quantitativa degli anticorpi presenti nel siero dei malati può essere uno strumento per la valutazione di questi disordini. Inoltre, gli anticorpi possono essere presenti prima dei sintomi clinici, quindi possono essere considerati un segnale del progresso della malattia. Un esempio è l'anticorpo fattore reumatoide, distintivo per l'Artrite Reumatoide (RA), che può essere presente in sieri di soggetti sani anni

²³ B. Bielekova, R. Martin, Development of biomarkers in multiple sclerosis, *Brain*, **2004**, 127, 1463-1478.

prima di raggiungere la fase conclamata e può suggerire una predisposizione alla malattia.

I *biomarker*, oltre che come strumenti diagnostici, possono essere impiegati come *surrogate endpoint*, utili per seguire lo sviluppo di un farmaco. Nei *trial* clinici questo viene utilizzato come misura di un effetto di un trattamento che si può correlare con il *real endpoint*, ma non è necessariamente garantita una relazione. Il National Institutes of Health definisce il *surrogate endpoint* come un *biomarker* destinato a sostituire gli *endpoint* clinici.

Nel caso delle malattie autoimmuni il titolo anticorpale può essere considerato un ottimo *surrogate endpoint*, quando si correla con l'andamento della malattia, e può essere facilmente determinato in saggi immunoenzimatici che utilizzano specifiche sonde antigeniche.

Un semplice test, come l'ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), richiede la presenza dell'antigene corrispondente, spesso costituito da proteine *target* degli autoanticorpi *in vivo*.

La disponibilità di antigeni proteici è, tuttavia, piuttosto limitata in quanto essi possono essere ottenuti tramite estrazione da tessuto o tramite procedure che non necessariamente mantengono inalterate tutte le caratteristiche delle proteine native. Infatti la proteina, definita come sonda antigenica per la determinazione anticorpale in test immunoenzimatici, deve possedere il corretto *folding* per poter così interagire ed essere opportunamente riconosciuta da anticorpi specifici.

Antigeni proteici possono essere ottenuti anche tramite la tecnologia del DNA ricombinante; questa procedura, tuttavia, non risulta adatta a produrre l'antigene proteico completo se l'espressione viene effettuata da parte di organismi procariotici, quali *E. coli*, in quanto questi non possiedono gli enzimi necessari per mettere in atto modificazioni post-traduzionali.

La determinazione delle effettive modificazioni post-traduzionali presenti nei putativi autoantigeni nativi è quindi di assoluta rilevanza per la rivelazione di autoanticorpi come *biomaker*, così come variazioni della

conformazione proteica e lo studio del corretto *fold*ing possono dare informazioni sull'interazione antigene-anticorpo, portando alla selezione di marcatori biologici di processi patogenetici

1.6 Sonde antigeniche nella SM: CSF114(Glc)

In studi precedenti, condotti presso il Laboratorio Interdipartimentale di Chimica e Biologia di Peptidi e Proteine (PeptLab) dell'Università di Firenze, è stato dimostrato che il glicopeptide [Asn³¹(Glc)]hMOG(30-50), contenente un residuo β -D-glucopiranosilico, legato al residuo Asn³¹ tramite un legame *N*-glicosidico, è in grado di rilevare, mediante test ELISA, la presenza di autoanticorpi nel siero di pazienti affetti da SM.²⁴

Studi conformazionali condotti su hMOG(30-50) e sull'analogo glicosilato hanno evidenziato il ruolo fondamentale della porzione glucosidica nel riconoscimento anticorpale. È stato osservato che il peptide attivo glicosilato [Asn³¹(Glc)]hMOG(30-50) e quello inattivo non glicosilato hMOG(30-50) assumono conformazioni simili in soluzione, di conseguenza è stato ipotizzato che la capacità di [Asn³¹(Glc)]hMOG(30-50) di rilevare autoanticorpi nella SM sia collegata alle proprie caratteristiche, oltre che alla particolare conformazione, e che il sito di legame dell'anticorpo specifico sul glicopeptide MOG sia da ricondurre alla porzione *N*-glucosilata.²⁵ Questi risultati, insieme con l'osservazione che l'asparagina *N*-glucosilata da sola sia capace di legarsi agli autoanticorpi in soluzione in un esperimento ELISA di tipo competitivo, permettono di identificare la porzione Asn(Glc) come l'epitopo minimo riconosciuto dagli anticorpi stessi.

²⁴ S. Mazzucco, S. Matà, M. Vergelli, R. Fiorese, E. Nardi, B. Mazzanti, M. Chelli, F. Lolli, M. Ginanneschi, F. Pinto, L. Massacesi, A. M. Papini, A synthetic glycopeptide of human myelin oligodendrocyte glycoprotein to detect antibody responses in multiple sclerosis and other neurological diseases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 167-172.

²⁵ A. Carotenuto, A. M. D'Ursi, E. Nardi, A. M. Papini, P. Rovero, Conformational analysis of a glycosylated human myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide epitope able to detect antibody response in multiple sclerosis, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2378-2381.

Le proprietà di riconoscimento delle molecole sono state ottimizzate attraverso la progettazione e la selezione di particolari librerie di glicopeptidi. Attraverso studi di relazione struttura-attività è stata così progettata una sonda antigenica, CSF114(Glc), capace di riconoscere autoanticorpi specifici presenti nel siero di pazienti affetti da SM (Fig. 8).^{26,27,28}

²⁶ F. Lolli, B. Mulinacci, A. Carotenuto, B. Bonetti, G. Sabatino, B. Mazzanti, A. M. D'Ursi, E. Novellino, M. Pazzagli, L. Lovato, M. C. Alcaro, E. Peroni, M. C. Pozo-Carrero, F. Nuti, L. Battistini, G. Borsellino, M. Chelli, P. Rovero, A. M. Papini, An N-glycosylated peptide detecting disease-specific autoantibodies, biomarkers of multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, 102, 10273-10278.

²⁷ F. Lolli, B. Mazzanti, M. Pazzagli, E. Peroni, M. C. Alcaro, G. Sabatino, R. Lanzillo, V. Brescia Morra, L. Santoro, C. Gasperini, S. Galgani, M. M. D'Elia, V. Zipoli, S. Sotgiu, M. Pugliatti, P. Rovero, M. Chelli, A. M. Papini, The glycopeptide CSF114(Glc) detects serum antibodies in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.*, **2005**, 167, 131-137.

²⁸ "Glycopeptides, their preparation and use in the diagnosis or therapeutic treatment of Multiple Sclerosis". *Inventors*: A. M. Papini, P. Rovero, M. Chelli, F. Lolli. *Applicant*: University of Florence, Italy. PCT International application (2003) WO 03000733. Italian Patent n. 0001327122 (27/04/2005). Granted USA Patent (02/08/2005).

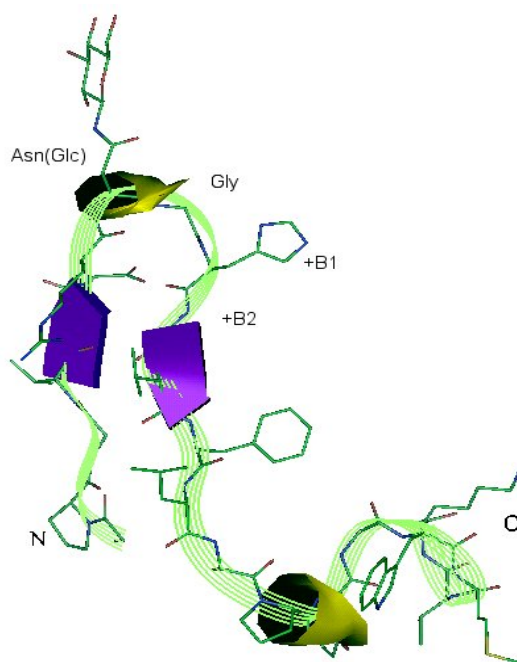


Figura 8. Schema della struttura di CSF114(Glc). Diagramma del conformero a minor energia di CSF114(Glc) ottenuto tramite studi NMR.

Studi conformazionali hanno confermato la fondamentale importanza della conformazione dell'antigene per la corretta esposizione dell'epitopo minimo Asn(Glc) riconosciuto dagli anticorpi specifici (Fig. 9). CSF114(Glc) è caratterizzato da una struttura β -hairpin nella quale l'epitopo Asn(Glc) si trova posizionato sulla punta del β -turn di tipo I'.²⁹

²⁹ A. Carotenuto, A. M. D'Ursi, B. Mulinacci, I. Paolini, F. Lolli, A. M. Papini, E. Novellino, P. Rovero, Conformation-activity relationship of designed glycopeptides as synthetic probes for the detection of autoantibodies, biomarkers of Multiple Sclerosis, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 5072-5079.

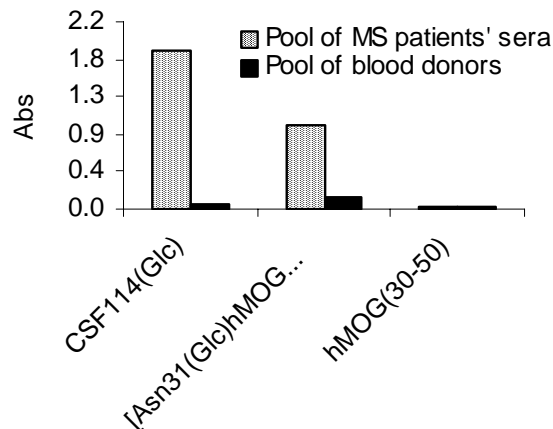


Figura 9. Titolo anticorpale di IgG e IgM presenti nel siero di pazienti affetti da SM per CSF114(Glc), [Asn³¹(Glc)]hMOG(30-50) e hMOG(30-50). L'analogo non glicosilato non risulta attivo, mentre CSF114(Glc) presenta il titolo anticorpale più alto.

CSF114(Glc), inoltre, ha mostrato un'elevata specificità per una sottopopolazione di autoanticorpi presenti nel siero di pazienti affetti da SM, mentre non ha rivelato nessuna attività biologica in sieri di controllo di pazienti affetti da altre malattie neurodegenerative.²⁷ Di conseguenza CSF114(Glc) costituisce il primo esempio di sonda antigenica sintetica per la determinazione di anticorpi specifici nel siero di pazienti affetti da SM, che possono quindi essere utilizzati come *biomarker* per la valutazione dell'attività della patologia in una sottopopolazione di pazienti.

CSF114(Glc) è stato selezionato tramite “un approccio chimico inverso”, che si basa sull'utilizzo di peptidi sintetici, univocamente caratterizzati, per ricercare popolazioni di anticorpi presenti nei sieri di pazienti. La caratterizzazione di CSF114(Glc) come mimetico di antigeni nativi della SM lascia supporre che una *N*-glucosilazione aberrante potrebbe essere coinvolta nel meccanismo molecolare della malattia.²⁶ Fino ad oggi la glucosilazione è stata rilevata solamente nelle glicoproteine batteriche, in quanto rappresenta

una modificazione post-traduzionale non comune negli organismi eucariotici;³⁰ putative glucosilazioni delle proteine mieliniche, per mezzo di meccanismi ancora sconosciuti, potrebbero trasformare antigeni *self* in *not-self*, innescando così la risposta anticorpale; probabilmente più di una proteina potrebbe subire questa glucosilazione aberrante, portando così all'ottenimento di nuovi antigeni. Di conseguenza è di fondamentale importanza poter identificare gli antigeni nativi mimati da CSF114(Glc) e riconosciuti dal sistema immunitario al fine di studiare i meccanismi molecolari implicati nella patogenesi della SM.

³⁰ F.Wieland, R. Heitzer, W. Schaefer, Asparaginyglucose: novel type of carbohydrate linkage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1983**, 80, 5470-5474.

2 SCOPO DELLA RICERCA

Uno dei temi di ricerca di PeptLab riguarda la caratterizzazione del meccanismo molecolare di una forma di SM, in cui la demielinizzazione è mediata da autoanticorpi, e l'identificazione di opportune sonde antigeniche per la rivelazione di autoanticorpi come *biomarker* della patologia.

Nell'ambito di questo progetto la ricerca di questo lavoro di tesi è stata focalizzata sul dominio extracellulare della Glicoproteina Oligodendrocitica della Mielina, proteina di membrana considerata putativo autoantigene nella SM, con lo scopo di:

- ottenere informazioni strutturali in soluzione mediante spettroscopia NMR per lo studio dei meccanismi molecolari patogenetici della malattia e di poterne valutare l'utilizzo come sonda antigenica correttamente ripiegata per la determinazione di autoanticorpi come *biomarker* nella SM;
- sviluppare nuove metodologie biologiche e chimiche che permettano di ottenere proteine semi-sintetiche selettivamente e specificamente modificate, al fine di indagare l'influenza della porzione glicosidica e, quindi, le eventuali modificazioni post-traduzionali nel riconoscimento autoanticorpale.

Dai dati presenti in letteratura fino ad oggi non è ancora chiaro il ruolo di MOG nella patogenesi della SM ed in modo particolare i dati sull'interazione MOG-anticorpo sono discordanti.^{31,32,33,34}

³¹ P. Lalive, Auto antibodies in inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system, *Swiss Medical Weekly*, **2008**, 138(47-48), 692-707.

³² T. Berger, M. Reindl, Multiple sclerosis: Disease biomarkers as indicated by pathophysiology, *J. Neurological Sciences*, **2007**, 259, 21-26.

³³ M. Reindl, M. Khalil, T. Berger, Antibodies as biological markers for pathophysiological processes in MS, *J. Neuroimmunol.*, **2006**, 180, 50-62.

³⁴ S. Amor, G. Giovannoni, Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein as a biomarker in multiple sclerosis – are we there yet?, *Multiple Sclerosis*, **2007**, 13, 1083-1085.

3 PARTE A

3.1 MOG come autoantigene della SM

MOG è una proteina integrale di membrana costituita da 218 amminoacidi che mostra un alto grado di conservazione della sequenza tra le specie animali (>90%), indice dell'importante funzione biologica condotta dalla stessa.

E' stato proposto che MOG sia un membro della superfamiglia delle immunoglobuline;³⁵ è composta da un singolo dominio extracellulare (MOG_{ED}) immunoglobulino-simile, da due domini transmembrana costituiti da amminoacidi idrofobici e da una coda intracitoplasmatica (Fig. 10).^{36,37}

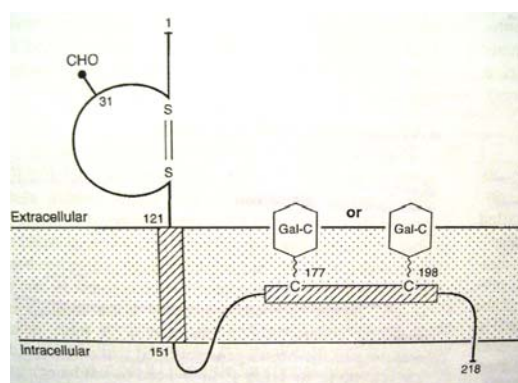


Figura 10. Modello della struttura transmembrana della MOG.

Le proprietà encefalitogeniche di MOG derivano dalla localizzazione extracellulare del suo dominio sulla superficie più esterna delle lamelle

³⁵ M. V. Gardinier, P. Amiguet, C. Linington, J. M. Matthieu, Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily, *J. Neurosci. Res.*, **1992**, 33, 177–187.

³⁶ J. F. Kroepfl, L. R. Viise, A. J. Charron, C. Linington, M. V. Gardinier, Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology, *J. Neurochem.*, **1996**, 67, 2219–2222.

³⁷ B. della Gaspera, D. Pham-Dinh, G. Roussel, J. L. Nussbaum, A. Dautigny, Membrane topology of the myelin/oligodendrocyte glycoprotein, *Eur. J. Biochem.*, 258, **1998**, 478–484.

mieliniche; in questo modo MOG_{ED} è un *target* facilmente accessibile all'attacco autoimmune sugli assoni compatti della mielina.³⁸ Nell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), modello animale della SM, gli anticorpi anti-MOG possono indurre direttamente la demielinizzazione.¹⁹ Inoltre gli anticorpi anti-MOG sono stati collegati al danno mielinico nelle lesioni caratteristiche della SM.²¹ Tuttavia la dimostrazione della patogenicità anticorpale negli umani non è ancora stata documentata, anche se alcuni risultati recenti mostrano che anticorpi diretti contro specifiche conformazioni di MOG presentano lo stesso grado di patogenicità anche quando sono trasferiti nell'animale.³⁹

Sono stati identificati numerosi epitopi encefalitogenici di MOG (MOG₁₋₂₂, MOG₃₅₋₅₅, MOG₉₆₋₁₀₆) e l'importanza del loro riconoscimento sul fenotipo EAE è stata studiata su modelli animali differenti.⁴⁰ In particolare anticorpi anti-MOG sembrano essere più patogenici; si riscontra infatti un aumento del livello di demielinizzazione, quando sono diretti contro epitopi conformazionali di hMOG che conservano la glicosilazione.⁴⁰

Queste scoperte sono in linea con gli studi recenti sulla struttura cristallina di MOG_{ED} e dei complessi MOG/anticorpo anti-MOG che mostrano che l'anticorpo monoclonale demielinizzante 8-18C5 si lega a epitopi conformazionali di MOG.^{41,42}

A causa dell'importante ruolo degli anticorpi anti-MOG nella EAE la loro presenza nel liquido cerebro spinale e nel siero di pazienti affetti da SM è

³⁸ H. C. von Budingen, N. Tanuma, P. Villoslada, J. C. Ouallet, S. L. Hauser, C. P. Genain, Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination, *J. Clin. Immunol.*, **2001**, 21, 155–170.

³⁹ D. Zhou, R. Srivastava, S. Nessler, V. Grummel, N. Sommer, W. Brück, H. P. Hartung, C. Stadelmann, B. Hemmer, Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 19057–19062.

⁴⁰ U. Brehm, S. J. Piddlesden, M. V. Gardinier, C. Linington, Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), *J. Neuroimmunol.*, **1999**, 97, 9–15.

⁴¹ C. Breithaupt, A. Schubart, H. Zander, A. Skerra, R. Huber, C. Linington, U. Jacob, Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 9446–9451.

⁴² C. S. Clements, H. H. Reid, T. Beddoe, F. E. Tynan, M. A. Perugini, T. G. Johns, C. C. Bernard, J. Rossjohn, The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 11059–11064.

stata studiata ampiamente. La maggiore limitazione nel rilevamento di anticorpi anti-MOG negli studi umani è correlata al fatto che i diversi saggi che testano preparazioni diverse di MOG possono dare risultati differenti. Infatti i risultati sono molto controversi con titoli anticorpali che oscillano da 0-80% nei malati di SM e 0-60% nei donatori sani e possono essere riassunti secondo la tecnica usata nel test, il tipo di Ig rilevata e la sequenza o conformazione o l'origine di MOG usata.³¹

Come mostrato in Tabella 1 nella maggior parte degli studi sugli anticorpi anti-MOG è stato usato il dominio extracellulare di hMOG ricombinante espressa in *E. coli*, mentre pochi gruppi hanno usato hMOG purificata dalla mielina o da cellule mammifere o frammenti peptidici per studi di immunoblot o per test ELISA.

Molti degli anticorpi anti-MOG rivelati con tecniche di immunoblot sono diretti contro epitopi lineari di MOG parzialmente esposti sulla superficie della mielina.⁴³ Inoltre anticorpi anti-MOG misurati in test ELISA sono diretti contro MOG solubile e correttamente ripiegata, prodotta in *E. coli*, mancante quindi della corretta topologia di membrana e della glicosilazione. Tuttavia molti studi recenti hanno dimostrato che questi fattori sono cruciali per il ruolo patogenitico degli anticorpi anti-MOG.^{26,44} Oltre a ciò solo una piccola frazione di anticorpi anti-MOG umani sono diretti contro epitopi conformazionali di MOG e i metodi per analizzare l'alta affinità degli anticorpi verso MOG hanno fallito nel rivelamento di una risposta anti-MOG nel siero.^{45,46,47}

⁴³ M. Khalil, M. Reindl, A. Lutterotti, B. Kuenz, R. Ehling, C. Gneiss, P. Lackner, F. Deisenhammer, T. Berger, Epitope specificity of serum antibodies directed against the extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein: influence of relapses and immunomodulatory treatments, *J. Neuroimmunol.*, **2006**, 174, 147–156.

⁴⁴ C. B. Marta, A. R. Oliver, R. A. Sweet, S. E. Pfeiffer, N. H. Ruddle, Pathogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies recognize glycosylated epitopes and perturb oligodendrocyte physiology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, 102, 13992–13997.

⁴⁵ C. G. Haase, J. Guggenmos, U. Brehm, M. Andersson, T. Olsson, M. Reindl, J. M. Schneidewind, U. K. Zettl, F. Heidenreich, T. Berger, H. Wekerle, R. Hohlfeld, C. Linington, The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls, *J. Neuroimmunol.*, **2001**, 114, 220–225.

⁴⁶ V. Lampasona, D. Franciotta, R. Furlan, S. Zanaboni, R. Fazio, E. Bonifacio, G. Comi, G. Martino, Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects, *Neurology*, **2004**, 62, 2092–2094.

In conclusione occorre sviluppare metodi immunoenzimatici con lo scopo di studiare l'immunogenicità di MOG, avendo a disposizione la proteina in condizioni quanto più simili a quella nativa in quanto il corretto *folding*, la struttura della porzione glicosidica e eventuali modificazioni post-traduzionali possono influire in modo critico sulla capacità di MOG di legare gli anticorpi.

Antigene	Anticorpo	Tecnica rivelativa	MS (%)	Donatori sani (%)	Riferimenti
peptidi sintetici di MOG	IgG IgM	ELISA ELISA	Incrementato Incrementato		Vojdani <i>et al.</i> ⁴⁸ Kennel de March <i>et al.</i> ⁴⁹ Khalil <i>et al.</i> ⁴³
rhMOG _{ED} espresso in <i>E. coli</i>	IgG	Immunoblot Immunoblot Immunoblot Immunoblot ELISA ELISA ELISA	38% 54% 35% 39% 6% Incrementato 14%	3% 22% Nd 22% 3% 6%	Reindl <i>et al.</i> ¹⁸ Lindert <i>et al.</i> ⁵⁰ Egg <i>et al.</i> ⁵¹ Lutterotti <i>et al.</i> ⁵² Karni <i>et al.</i> ⁵³ Kennel De March <i>et al.</i> ⁴⁹ Mantegazza <i>et al.</i> ²²
rhMOG in vitro translation	IgG IgM	Fluid phase Fluid phase Fluid phase	6% 3% 8%	4% 0% 6%	Lampasona <i>et al.</i> ⁴⁶ O'Connor <i>et al.</i> ⁴⁷ Lampasona <i>et al.</i> ⁴⁶
rhMOG espressa in cellule mammifere	IgG IgG, IgM IgG, IgM	FACS ELISA FACS	6% Incrementato Incrementato	0%	Haase <i>et al.</i> ⁴⁵ Gaertner <i>et al.</i> ⁵⁴ Lalive <i>et al.</i> ⁵⁵
hMOG purificata dalla mielina	IgG	ELISA Elispot	0% 50%	0% 0%	Xiao <i>et al.</i> ⁵⁶ Sun <i>et al.</i> ⁵⁷
rhMOG _{ED} espresso in <i>E. coli</i>	IgM	Immunoblot Immunoblot Immunoblot ELISA	56% 59% 51% Incrementato	Na 34% 21%	Egg <i>et al.</i> ⁵¹ Lutterotti <i>et al.</i> ⁵² Rauer <i>et al.</i> ⁵⁸ Kennel De March <i>et al.</i> ⁴⁹

⁴⁷ K. C. O'Connor, H. Appel, L. Bregoli, M. E. Call, I. Catz, J. A. Chan, N. H. Moore, K. G. Warren, S. J. Wong, D. A. Hafler, K. W. Wucherpfennig, Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein, *J. Immunol.*, **2005**, 175, 1974–1982.

⁴⁸ A. Vojdani, E. Vojdani, E. Cooper, Antibodies to myelin basic protein, myelin oligodendrocytes peptides, alpha-beta-crystallin, lymphocyte activation and cytokine production in patients with multiple sclerosis, *J. Intern. Med.*, **2003**, 254, 363–374.

⁴⁹ A. Kennel De March, M. De Bouwerie, M. N. Kolopp-Sarda, G. C. Faure, M. C. Bene, C. C. Bernard, Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein B-cell responses in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.*, **2003**, 135, 117–125.

⁵⁰ R. B. Lindert, C. G. Haase, U. Brehm, C. Linington, H. Wekerle, R. Hohlfeld, Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Brain*, **1999**, 122 (Pt 11), 2089–2100.

⁵¹ R. Egg, M. Reindl, F. Deisenhammer, C. Linington, T. Berger, Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis, *Mult. Scler.*, **2001**, 7, 285–289.

⁵² A. Lutterotti, M. Reindl, C. Gassner, K. Poustka, K. Schanda, F. Deisenhammer, T. Berger, Antibody response to myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein depend on familial background and are partially associated with human leukocyte antigen alleles in multiplex families and sporadic multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.*, **2002**, 131, 201–207.

⁵³ A. Karni, R. Bakimer-Kleiner, O. Abramsky, A. Ben-Nun, Elevated levels of antibody to myelin oligodendrocyte glycoprotein is not specific for patients with multiple sclerosis, *Arch. Neurol.*, **1999**, 56, 311–315.

⁵⁴ S. Gaertner, K. L. de Graaf, B. Greve, R. Weissert, Antibodies against glycosylated native MOG are elevated in patients with multiple sclerosis, *Neurology*, **2004**, 63, 2381–2383.

Tabella 1. Panoramica di dati pubblicati su studi di reazione tra anticorpi del siero e MOG in pazienti affetti da SM.

3.2 Conformazione MOG: cristallografia a raggi X

La conformazione proteica di MOG_{ED} è stata risolta tramite cristallografia a raggi X, grazie a studi condotti da Clemens e Breithaupt, i quali hanno focalizzato la loro attenzione, rispettivamente, sull'analisi di MOG di topo (*Mus musculus*) (mMOG) e di ratto (*Rattus norvegicus*) (rMOG) dimostrando il mantenimento della conformazione della proteina nelle due specie animali (Fig. 11).^{41,42}

La struttura di MOG_{ED} è costituita da un *sandwich* di due β -sheets antiparalleli, comprendenti rispettivamente i motivi A'GFCC'C" e ABED, con le estremità N- e C-terminali disposte ai poli opposti della molecola. In aggiunta ai foglietti β , sono localizzate, all'esterno della molecola, quattro α -eliche e tre anse che connettono i filamenti B-C, C'-C" e F-G: queste hanno una localizzazione analoga alle regioni determinanti la complementarità del dominio Ig-V, per cui potrebbero rappresentare un potenziale sito di legame di anticorpi.

⁵⁵ P. H. Lalive, T. Menge, C. Delarasse, B. Della Gaspera, D. Pham-Dinh, P. Villoslada, H. C. von Budingen, C. P. Genain, Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 2280–2285.

⁵⁶ B. G. Xiao, C. Linington, H. Link, Antibodies to myelinoligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls, *J. Neuroimmunol.*, **1991**, 31, 91–96.

⁵⁷ J. Sun, H. Link, T. Olsson, B. G. Xiao, G. Andersson, H. P. Ekre, C. Linington, P. Diener, T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J. Immunol.*, **1991**, 146, 1490–1495.

⁵⁸ S. Rauer, B. Euler, M. Reindl, T. Berger, Antimyelin antibodies and the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **2006**, 77, 739–742.

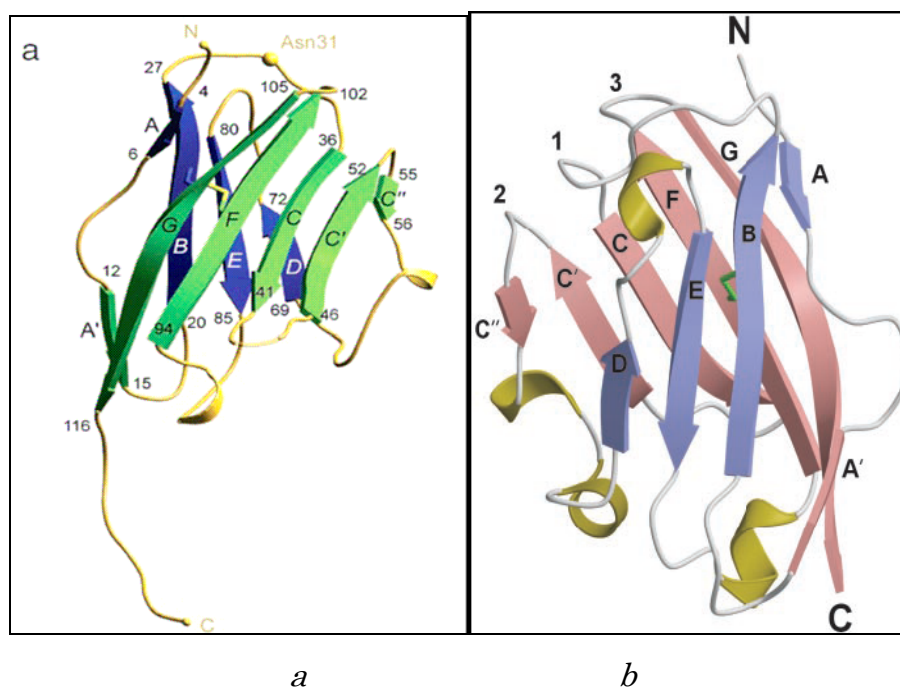


Figura 11. Schema della struttura di rMOG (a) e di mMOG (b).

La proteina è caratterizzata anche dall'importante presenza di un sito di glicosilazione su Asn³¹, esposto in alto sul lato distale della membrana e localizzato nel *loop* che collega i filamenti B e C (*loop* BC).

Il dominio extracellulare della proteina si trova in forma monomerica nel cristallo ed esibisce una superficie con un predominante carattere polare, ma privo di carica, definita dalla presenza delle tre anse, dalla quale sporge una His¹⁰³; in questa area risultano assenti zone ampiamente idrofobiche, che suggeriscono la mancanza di una diretta interazione con la membrana fosfolipidica. Il *core* della proteina è costituito da due cisteine in posizione 24 e 98, le quali danno origine ad un ponte disolfuro, opposto a Trp³⁹, e ad un altro ponte localizzato tra i residui Arg⁶⁸ e Asp⁹². La regione N-terminale del foglietto B è dominata da un'area carica negativamente, terminante con un piccolo segmento carico positivamente (Arg⁴, Arg²⁵, Lys⁸⁰); infine, è stata messa in evidenza la presenza di una tasca idrofobica, capace di mediare l'interazione proteina-proteina o proteina-ligando (Fig. 12).

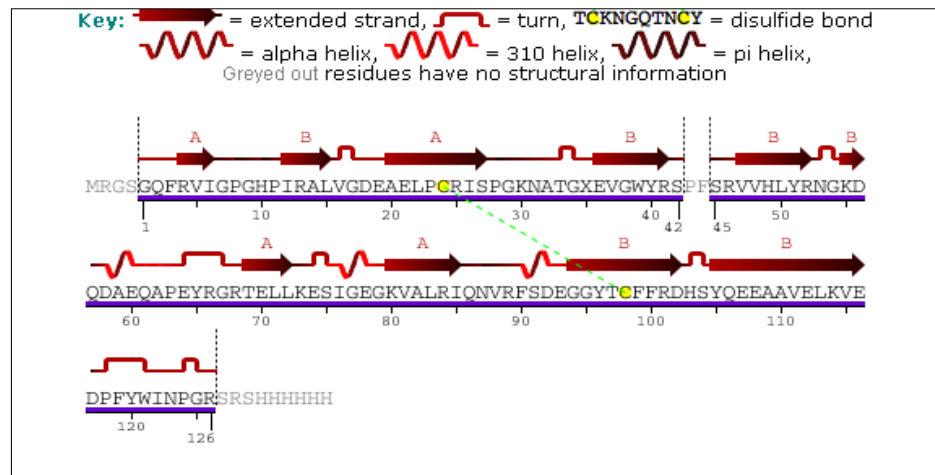


Figura 12. Sequenza di rMOGED.

L'analisi della struttura della proteina ha messo in evidenza la discontinuità della natura degli epitopi di MOG riconosciuti dagli anticorpi patogenici. Per permettere una maggiore comprensione di questa particolare caratteristica sono stati condotti esperimenti sul cristallo di un complesso formato da MOG e il frammento Fab di anticorpo monoclonale di topo 8-18C5: l'analisi ha messo in evidenza l'interazione anticorpale con le tre anse BC, C'C" e FG, che si è dimostrato il maggiore sito di interazione, con una percentuale del 65%, nonché con l'estremità N-terminale della proteina. Da queste constatazioni si evince che le aree sopra menzionate, in particolare l'ansa FG, siano importanti siti di legame per l'anticorpo, avvalorando, quindi l'ipotesi di una probabile perturbazione del legame della proteina con il proprio ligando indotta dall'azione anticorpale.

3.3 Scopo della ricerca

In questa parte del lavoro di tesi è stato studiato il dominio extracellulare di MOG con l'intento di valutarne l'utilizzo come sonda antigenica correttamente ripiegata per la determinazione di autoanticorpi come *biomarker* nella SM che potrebbero costituire un utile strumento per la diagnosi e la prognosi della patologia. Dai dati presenti in letteratura fino ad oggi non è ancora chiaro il ruolo di MOG nella patogenesi della SM ed, in particolare, i dati sull'interazione MOG-anticorpo sono discordanti.

E' stato pertanto utilizzato MOG_{ED} come antigene in test ELISA per il riconoscimento degli autoanticorpi presenti nel siero dei pazienti affetti da SM, in confronto con donatori sani, al fine di evidenziare l'importanza della conformazione della proteina nei test immunoenzimatici per la caratterizzazione di possibili anticorpi specifici quali *biomarker*, per successivi sviluppi, in campo diagnostico e terapeutico.

Inoltre è stato studiato MOG_{ED} per ottenere informazioni strutturali in soluzione, mediante spettroscopia NMR, per lo studio dei meccanismi molecolari patogenetici della malattia. Infatti, nonostante la struttura della proteina sia già stata risolta ai raggi X, quindi allo stato solido, a tutt'oggi non ci sono informazioni sul comportamento di MOG_{ED} in soluzione.

La spettroscopia NMR rappresenta la tecnica di elezione per l'analisi conformazionale in soluzione delle proteine, in quanto permette di studiare le alterazioni indotte dal mezzo chimico sulla conformazione della proteina, sulle relazioni struttura-attività, sulla solubilità e rende quindi possibile la formulazione di ipotesi sulle attività o sulla conformazione dello scheletro della biomolecola nell'ambiente cellulare, facendo uso di solventi che possano essere in grado di riprodurlo in modo piuttosto fedele. La spettroscopia NMR, inoltre, può permettere la realizzazione di uno studio approfondito del complesso antigene/anticorpo, al fine di analizzare la specificità e l'affinità degli autoanticorpi come *biomarker* con la proteina nativa.

Il lavoro è stato quindi focalizzato sull'ottimizzazione:

- delle tecniche di espressione di MOG_{ED} in opportuni ceppi di *E. coli* e in adeguati mezzi di coltura;
- dei protocolli di purificazione e delle procedure per l'ottenimento del corretto ripiegamento della proteina stessa;
- dei protocolli dei test ELISA per la valutazione della capacità di rivelare autoanticorpi nei sieri di pazienti affetti da SM.

3.4 Cellule competenti ed elettroporazione

La membrana cellulare è costituita da un doppio strato fosfolipidico che non permette a molecole polari, come il DNA, il passaggio attraverso di esso. Tuttavia le cellule batteriche possono essere rese competenti, ovvero in grado di accettare DNA extra-cromosomiale: la competenza è infatti definita come la capacità di legarsi e di assimilare DNA esterno (eterologo).

Gli organismi procariotici possono acquisire materiale genetico estraneo mediante i processi di coniugazione, trasduzione e trasformazione. Nella coniugazione e nella trasduzione il materiale genetico passa da una cellula batterica ad un'altra mediante un contatto diretto tra le due cellule nel primo caso e mediante l'intervento di un batteriofago, nel secondo. Nella trasformazione, invece, molecole di DNA derivanti da cellule lisate vengono acquisite dai batteri direttamente dall'ambiente esterno.

Solo alcune specie batteriche, quali ad esempio *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Bacillus subtilis*, possono acquisire DNA estraneo dall'ambiente e vengono dette per questo motivo "naturalmente competenti". In particolari condizioni fisiologiche, che coincidono con la fine della fase esponenziale di crescita, tali specie batteriche diventano competenti. E' stato dimostrato in diversi casi che la competenza dipende dalla secrezione all'esterno della cellula di una molecola di natura polipeptidica. Tale molecola, detta fattore di competenza, si accumula all'esterno della cellula fino al raggiungimento di una concentrazione-soglia che induce nella cellula batterica

la sintesi di specifici recettori di membrana. Questi legano il DNA e lo trasportano nel citoplasma dove, se esistono regioni di omologia tra il DNA estraneo e quello cellulare, avviene un evento di ricombinazione che determina l'integrazione del DNA estraneo (o di parte di esso) sul cromosoma e la sua eventuale espressione nella cellula ospite.

La maggior parte dei batteri non è naturalmente competente alla trasformazione, per cui è necessario indurre uno stato di competenza artificiale. Ciò è reso possibile da una temporanea permeabilità della membrana cellulare al DNA, ottenuta esponendo le cellule o ad elevate concentrazioni di ioni metallici (per es. Ca^{2+} , cellule chemocompetenti) o ad impulsi di corrente ad alto voltaggio per tempi molto brevi (elettroporazione, cellule elettrocompetenti).

Tali metodi di trasformazione artificiale sono particolarmente efficaci con molecole di DNA circolare e sono comunemente utilizzati per introdurre DNA ricombinante in cellule batteriche.

L'efficienza di trasformazione ottenibile in laboratorio varia a seconda del metodo seguito e della specie batterica utilizzata. In generale, con cellule del batterio *E. coli* trattate con ioni Ca^{2+} si ottengono efficienze di 1×10^7 cellule trasformate per μg di DNA plasmidico. Con il metodo dell'elettroporazione, invece, si possono ottenere efficienze fino a mille volte più alte.

Il concetto dell'elettroporazione nasce a seguito della consapevolezza della natura relativamente debole delle interazioni idrofobiche/idrofiliche del doppio strato fosfolipidico e della sua capacità di riorganizzarsi in seguito a perturbazioni esterne:⁵⁹ in questo modo, un rapido shock elettrico può alterare temporaneamente la membrana, aprendo i pori attraverso i quali avviene il passaggio di molecole polari. Al termine di questa perturbazione, la stessa membrana ritorna nella situazione iniziale, lasciando la cellula inalterata; questa tecnica permette quindi di trasformare il batterio con DNA esterno (Fig. 13).

⁵⁹ W. K. Purves, D. Sadava, G. H. Orians, H. L. Helle, *Life: The Science of Biology- 6th ed. Sinauer Associates*, 2001, 316-317.

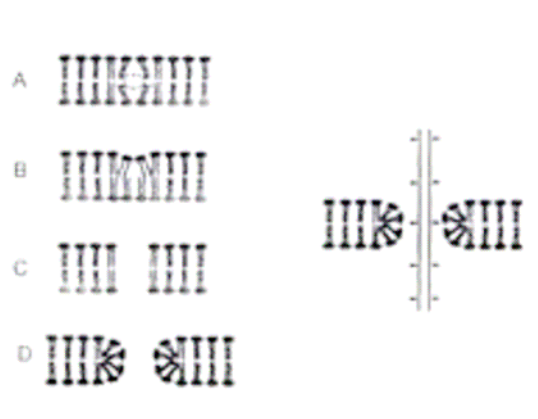


Figura 13. Si assume che le transizioni di membrana A->B->C->D siano più frequenti con il crescere del voltaggio applicato, permettendo l'ingresso delle molecole di DNA (destra). Tuttavia bisogna sottolineare che queste strutture rimangono ipotetiche e non sono mai state osservate direttamente.

Le cellule elettrocompetenti sono preparate attraverso ripetuti lavaggi in una soluzione a bassa conducibilità, come ad esempio una soluzione di glicerolo al 10%, che permette di allontanare completamente i sali presenti nel terreno di coltura ed evitare la formazione di scintille durante l'elettroporazione.

Ceppi di *E. coli* quali XL1-Blue e DH5 α sono utilizzati per il *cloning* di plasmidi in quanto presentano un'elevata conservabilità del materiale genetico e alta capacità di amplificazione, mentre i ceppi BL21(DE3) e ER2566 sono selezionati per l'espressione di proteine ricombinanti.

3.5 Plasmidi

I plasmidi sono molecole di DNA extracromosomiale le cui dimensioni variano da 1 kb a più di 200 kb; sono molecole circolari, chiuse covalentemente, costituite da un doppio filamento e che possono essere isolate da cellule batteriche in forma di superelica. I plasmidi sono stati ritrovati in una grande

varietà di specie batteriche; la maggior parte di questi possono trovarsi in un ristretto *range* di ospiti e possono essere mantenuti solo in alcune specie. Queste molecole sono elementi extracromosomiali che si comportano come unità genetiche accessorie, in grado di replicarsi ed essere ereditati indipendentemente dal cromosoma batterico.

I plasmidi hanno sviluppato una grande varietà di meccanismi per mantenere un numero stabile di copie nell'organismo ospite e per trasferire accuratamente le molecole plamidiche alla cellula figlia. Questo DNA extracromosomiale è dipendente dagli enzimi e dalle proteine sintetizzate dalla cellula ospite, indispensabili per i meccanismi di trascrizione e traduzione; inoltre, può contenere geni che codificano per enzimi vantaggiosi per l'ospite stesso.

Le proprietà dei plasmidi hanno suggerito ai genetisti di sfruttarli come vettori per trasportare all'interno del batterio qualsiasi frammento esogeno di DNA e farlo replicare in grande quantità. I requisiti che un plasmide deve possedere per essere un utile vettore di clonaggio sono: essere relativamente piccolo (è più facile purificarlo come molecola integra circolare), portare uno o più marcatori genetici selezionabili per l'identificazione dei batteri trasformati e contenere siti unici di riconoscimento per uno o più enzimi di restrizione in regioni non essenziali per la replicazione dei plasmide.

I *marker* genetici conferiscono grandi vantaggi di crescita, sotto condizioni selettive, rispetto al solo plasmide prodotto dalla cellula batterica. Nella clonazione molecolare questi *marker* sono utilizzati per:

- selezionare cloni di batteri che portano il plasmide; infatti, alcuni *marker* codificati da questi plasmidi sono in grado di fornire una specifica resistenza ad antibiotici, quali ampicillina e carbenicillina, kanamicina, cloramfenicolo e tetracicline;
- difendere i batteri trasformati contro i rischi imposti dalla presenza del plasmide e delle proteine codificate dal plasmide stesso: un elevato numero di copie di plasmide e una grande quantità di proteine

ricombinanti, infatti, possono influire gravemente sulla crescita e sulla sopravvivenza delle cellule trasformate.⁶⁰

I siti di restrizione rendono il plasmide più duttile nell'utilizzarlo per l'inserimento di frammenti di DNA esogeno.

Il cDNA di rMOG_{ED} (residui 1-125) è stato precedentemente subclonato nel vettore di espressione con coda di esa-istidine terminale pQE12, fornito da Qiagen. Le proteine ricombinanti che presentano sei istidine nella parte terminale vengono espresse sfruttando il vettore pQE, basato sul sistema trascrizione-traduzione del promotore T5 (Figg. 14, 15). Questo plasmide presenta le seguenti caratteristiche:

- l'elemento ottimizzato promotore-operatore è costituito dal promotore fagico T5, riconosciuto dalla RNA polimerasi di *E. coli*, e due sequenze dell'operone lattosio, che incrementano il legame del repressore dello stesso e assicurano un'efficiente repressione del potente promotore T5;
- un sintetico sito di legame ribosomiale, RBSII, per assicurare elevati tassi di traduzione;
- sequenza codificante per *6xHis-tag* che si può trovare al 5' o al 3' della regione di clonazione;
- sito multiplo di clonazione e codoni di stop alla traduzione in tutte le strutture di lettura per una preparazione conveniente dei costrutti di espressione;
- due forti terminatori trascrizionali, quali *t_o*, derivante dal batteriofago λ ,⁶¹ e T1, tratto dall'operone *rrnB* di *E. coli*, per prevenire la lettura della trascrizione ed assicurare la stabilità del costrutto di espressione;
- il gene della β -lattamasi contribuisce a fornire resistenza all'ampicillina;⁶² il gene del cloramfenicolo acetil-transferasi (CAT),

⁶⁰ K. Murray, N. E. Murray, Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriction endonuclease III of Haemophilus influenzae and restriction endonuclease I of Escherichia coli, *J. Mol. Biol.*, **1975**, 98, 551-564.

⁶¹ E. Schwarz, G. Scherer, G. Hobom, H. Kössel, Nucleotide sequence of *cro*, *cII* and part of the *O* gene in phage lambda DNA, *Nature*, **1978**, 272, 410-414.

⁶² J. G. Sutcliffe, Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322, *Quant. Biol.*, **1979**, 43, 77-90.

presente tra t_0 e T1, non presenta il promotore, quindi non è normalmente espresso;

- ColE1 dà avvio alla replicazione.⁶³

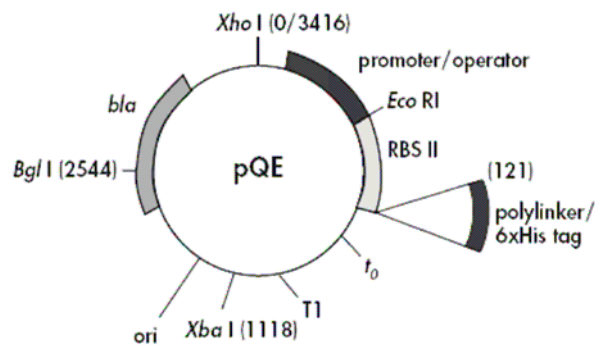


Figura 14. Plasmide pQE.

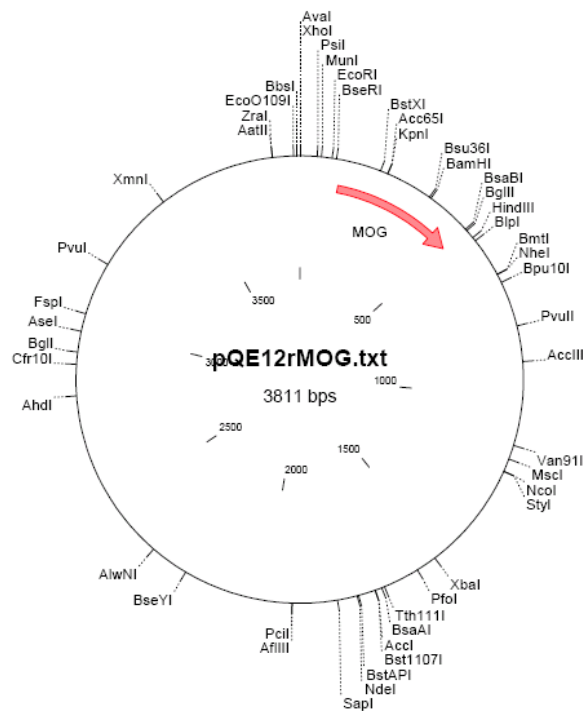


Figura 15. Plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆.

⁶³ P. J. Farabaugh, Sequence of the lacI gene, *Nature*, 1978, 274, 765-769.

Il plasmide pREP4, acquistato da Qiagen, presenta un'elevata importanza per la regolazione dell'espressione (Fig. 16). Il tasso estremamente alto di trascrizione iniziato dal promotore T5 può essere regolato e represso efficacemente solo da elevati livelli di proteina repressore dell'operone lattosio. I ceppi di *E. coli* utilizzati per la trasformazione presentano il gene repressore dell'operone lattosio in *cis* o in *trans* al gene che deve essere espresso. Nel sistema *trans* i ceppi ospite presentano il plasmide pREP4, che conferisce resistenza alla kanamicina ed esprime la proteina repressore dell'operone lattosio, codificata dal gene *lac I*. Copie multiple di questo plasmide sono presenti nelle cellule ospite e assicurano, così, la presenza di grandi quantità della proteina in questione, che si lega alla sequenza dell'operatore e regola l'espressione della proteina ricombinante: quest'ultimo meccanismo è governato da un altro evento importante, quale la presenza di isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG), che si lega alla proteina repressore dell'operone lattosio e la inattiva; tutto ciò permette la trascrizione delle sequenze a valle del promotore, ad opera della RNA polimerasi, e la loro successiva traduzione. La combinazione dei due plasmidi, pREP4 e pQE (quest'ultimo presenta il sistema del doppio operatore) assicura uno stretto controllo a livello trascrizionale.

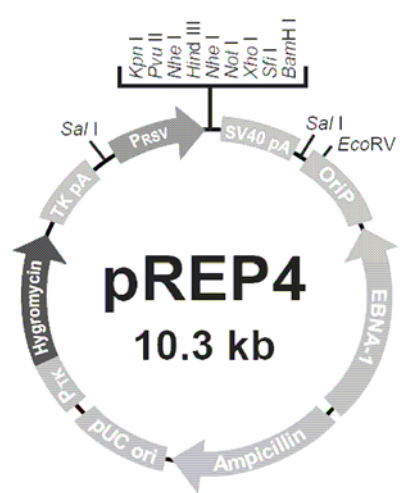


Figura 16. Plasmide pREP4.

Il plasmide pET22 è stato acquistato da NOVAGEN ed è stato disegnato con le caratteristiche per l'ottimizzazione del clonaggio, dell'analisi e della purificazione del prodotto (Fig. 17). Esso contiene:

- il promotore fagico T7;
- un gene per la resistenza all'ampicillina;
- una sequenza codificante per *6xHis-tag* che si può trovare al 5' o al 3' della regione di clonazione;
- siti di taglio unici per particolari enzimi di restrizione.

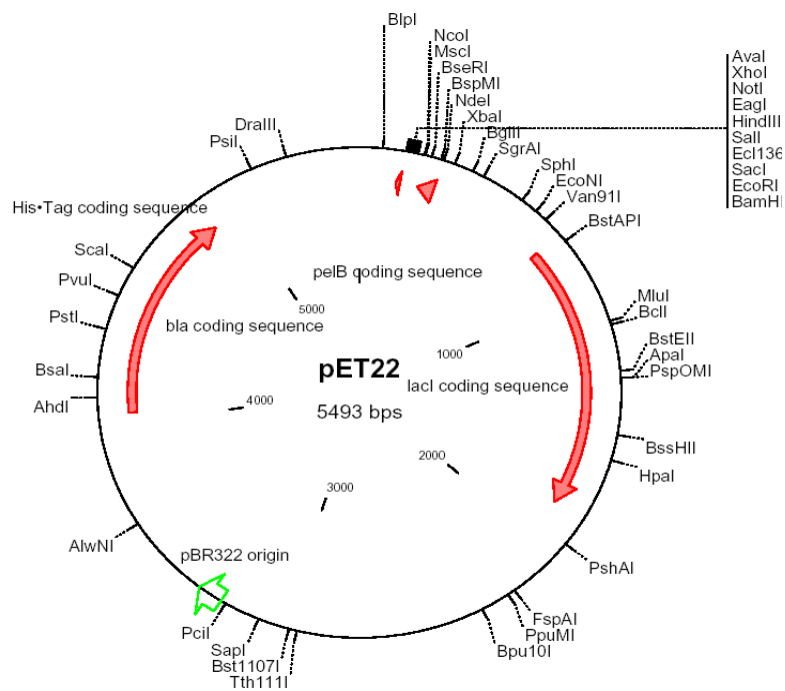


Figura 17. Schema del plasmide pET22.

3.6 Espressione e purificazione di rMOG_{ED}(His)₆

Cellule elettrocompetenti di *E. coli* appartenenti al ceppo ER2566 sono state trasformate con i plasmidi pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e pREP4, entrambi con concentrazione 0,120 µg/µl. La trasformazione è stata effettuata mediante elettroporazione. Successivamente le cellule sono state piastrare su terreno LB Agar contenente ampicillina e kanamicina e incubate a 37 °C per tutta la notte.

E' stata utilizzata una singola colonia derivante dalla trasformazione per inoculare 10 ml di terreno LB contenente ampicillina e kanamicina; la coltura è stata incubata 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

Un'aliquota di 1 ml della precoltura così ottenuta è stata usata per inoculare 1 litro di LB contenente ampicillina e kanamicina. I batteri sono stati fatti crescere sotto agitazione a 37 °C fino a quando la densità ottica misurata a 600 nm non ha raggiunto un valore compreso tra 0,5 e 0,8. Successivamente è stata indotta l'espressione di rMOG_{ED}(His)₆ tramite aggiunta di IPTG in concentrazione finale 1 mM e incubando a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

E. coli è largamente impiegato per la produzione di proteine ricombinanti che non necessitano di modificazioni post-traduzionali per la loro attività biologica. Tuttavia alti livelli di espressione di proteine ricombinanti in *E. coli* spesso portano ad accumularle come aggregati insolubili *in vivo*, cioè come corpi inclusi.^{64,65}

L'espressione proteica in questa forma presenta alcuni vantaggi:

- i corpi inclusi spesso contengono esclusivamente la proteina ricombinante;
- la proteina ricombinante contribuisce per più del 30% del totale delle proteine cellulari;

⁶⁴ J. F. Kane, D. L. Hartley, Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*, *Trends Biotechnol.*, **1988**, 6, 95–101.

⁶⁵ B. Fahnert, H. Lilie, P. Neubauer, Inclusion Bodies: formation and utilisation, *P. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **2004**, 89, 93–142.

- fornire una protezione alla cellula contro la tossicità causata dalla proteina ricombinante, poichè queste formazioni non presentano una propria attività biologica;
- i corpi inclusi possono essere accumulati nel citoplasma in quantità notevolmente più alte rispetto a proteine solubili.

Tuttavia le proteine espresse nei corpi inclusi sono prive di attività biologica e sono necessarie complesse procedure di solubilizzazione, *refolding* e purificazione per recuperare il prodotto effettivamente attivo.

La purificazione dei corpi inclusi dal restante lisato cellulare risulta piuttosto semplice, ma, al tempo stesso, esiste una problematica che si presenta nel momento in cui si procede alla solubilizzazione della proteina espressa. Generalmente i corpi inclusi sono solubilizzati usando un'alta concentrazione di agenti denaturanti, come l'urea o il guanidinio HCl, insieme a agenti riducenti come il β -mercaptoetanololo. Quindi è necessario utilizzare, nel passaggio successivo, un metodo di diminuzione della concentrazione dell'agente denaturante per permettere il giusto ripiegamento e, allo stesso tempo, prevenire l'aggregazione della proteina.

rMOG_{ED}(His)₆ è stata espressa nei corpi inclusi e il suo *refolding* è stato ottenuto sfruttando la possibilità di purificare la proteina tramite cromatografia di affinità; è stata usata la resina *Chelating Sepharose Fast Flow*, che contiene gruppi imminodiacetici legati al *Sepharose 6 Fast Flow* tramite legami eteri stabili mediante uno *spacer* a 7 atomi. Utilizzando uno ione metallico adatto (Ni²⁺) è perciò possibile trattenere le proteine che abbiano dei residui di His esposti, in quanto questi formano dei complessi con i metalli di transizione (Fig. 18).

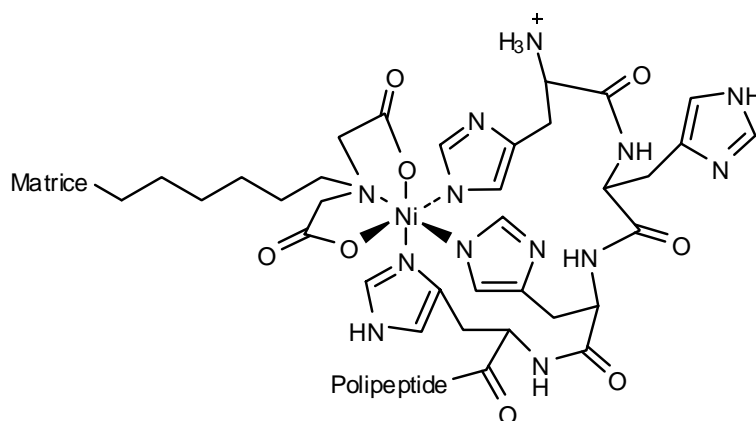


Figura 18. Interazione Ni-IDA-6xHis-tag.

Al fine di ottenere il corretto ripiegamento di rMOG_{ED}(His)₆ è stato necessario effettuare il passaggio da condizioni altamente denaturanti (guanidinio HCl 6 M) a condizioni non denaturanti ed eliminare gli agenti riducenti per permettere la formazione del ponte disolfuro. L'eluizione della proteina è stata effettuata utilizzando un tampone contenente imidazolo 0,5 M che, avendo un'affinità maggiore per il Ni rispetto alla coda di sei His della proteina ricombinante, ne ha permesso il distacco. Ogni passaggio è stato effettuato a temperatura ambiente, in quanto è stato osservato che la proteina precipita irreversibilmente se conservata a 4 °C.

Per ottenere rMOG_{ED}(His)₆ pura in soluzione in un tampone a bassa concentrazione salina, devono essere eliminati l'imidazolo e gli eventuali piccoli aggregati che possono essersi formati durante il processo cromatografico. E' stato pertanto necessario un ulteriore passaggio di purificazione.

La *gel filtration* è una metodica cromatografica molto indicata per questo scopo poiché separa le molecole in base alla loro dimensione. Può essere utilizzata per purificare molecole sensibili ai cambiamenti di pH o alle concentrazioni saline molto alte, è compatibile con la presenza di ioni, co-fattori, guanidinio HCl, detergenti, urea ed inoltre le proteine possono essere eluite con qualsiasi tipo di tampone. La fase stazionaria di una colonna per *gel*

filtration è una matrice porosa costituita da particelle sferoidali inerti che non presentano proprietà di reattività o di adsorbimento. Il principio su cui si basa questa tecnica è, perciò, legato alla mobilità delle molecole attraverso la fase stazionaria: le molecole di grosse dimensioni che non riescono a fluire attraverso i pori della matrice vengono eluite più rapidamente, le molecole che invece hanno una dimensione tale da riuscire ad attraversare la matrice sono rallentate nel loro percorso e quindi sono eluite molto più lentamente. La velocità di eluizione è perciò proporzionale alle dimensioni della molecola.

La purificazione di rMOG_{ED}(His)₆ tramite *gel filtration* è stata effettuata su colonna *Superdex75* utilizzando come tampone di eluizione 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5. La resa finale è stata molto bassa, con perdite in concentrazione prossime al 60% dovute, probabilmente, alla scarsa solubilità di rMOG_{ED}(His)₆ in tamponi a pH vicini al suo punto isoelettrico (pI 7.14).

Dall'analisi elettroforetica (SDS-PAGE 12%) dei campioni di rMOG_{ED}(His)₆, prelevati nei diversi stadi di purificazione, è risultato evidente che gli aggregati proteici (dimeri, trimeri) non sono presenti anche dopo il passaggio della cromatografia di affinità (Fig. 19).



Figura 19. SDS PAGE 12%: campioni derivanti da lisati cellulari provenienti da LB non indotto (n.I.) e LB indotto (I.), da corpi inclusi (IB), da Ni-IDA, da gel filtrazione (GF).

Non essendo presenti aggregati proteici da eliminare dalla soluzione di rMOG_{ED}(His)₆ ottenuta dopo eluizione per cromatografia di affinità, è stato

ritenuto quindi opportuno eliminare questo ulteriore passaggio cromatografico. Inoltre per cambiare il tampone in cui è dissolta la proteina, passaggio necessario per effettuare i successivi studi su rMOG_{ED}(His)₆, è stato deciso di utilizzare la dialisi, essendo questa una tecnica più semplice da eseguire rispetto alla *gel filtration*.

La proteina rMOG_{ED}(His)₆ ha una forte tendenza a precipitare in seguito a variazioni di concentrazione, di pH o temperatura.

Inizialmente è stato usato il tampone Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.5 che però ha causato la precipitazione per aggregazione di una consistente frazione della proteina in soluzione.

Sono state effettuate altre prove di solubilità in tamponi diversi per ridurre il tasso di precipitazione della proteina ed è stato deciso di utilizzare come tampone di dialisi il PBS a pH 8 che è adatto anche per i test ELISA.

Sono stati registrati spettri di massa di rMOG_{ED}(His)₆ purificata tramite cromatografia di affinità. È stato utilizzato lo spettrometro ESI Q-TOF (*Electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometer*) Micromass (Waters), che permette di identificare le proteine analizzando il rapporto massa/carica.

Il peso molecolare trovato sperimentalmente con lo spettrometro (15899 Da) conferma il peso molecolare calcolato teoricamente, convalidando l'identità della proteina (Fig. 20).

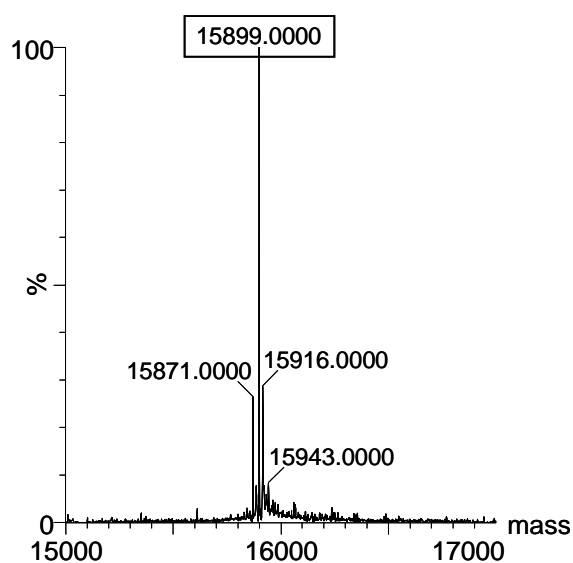


Figura 20. Spettro di massa di $rMOGED(His)_6$ dopo analisi di deconvoluzione.

3.7 Dicroismo Circolare

Il dicroismo circolare (normalmente abbreviato CD) è una delle tecniche fisiche più sensibili utilizzate per studiare le proprietà delle biomolecole in soluzione; questa tecnica non permette l'analisi della struttura tridimensionale di una proteina, ma costituisce comunque un valido strumento per poterne osservare i cambiamenti della struttura secondaria in soluzione.

Il dicroismo circolare fa parte delle spettroscopie chiro-ottiche, cioè di quelle tecniche spettroscopiche che, utilizzando luce polarizzata, mettono in risalto l'attività ottica delle molecole in esame; in pratica, rappresenta una spettroscopia di assorbimento, in cui viene misurata per un campione la differenza nell'assorbanza di due componenti, di polarizzazione circolare opposta, della radiazione incidente: ellitticità.

La possibilità di studiare la struttura secondaria di proteine (anche degli acidi nucleici) si basa sul fatto che particolari strutture secondarie, come le eliche sinistrorse e destrorse, hanno una propria attività ottica, oltre a

quella degli atomi di carbonio asimmetrici presenti, ad esempio, nei singoli amminoacidi. In breve, il dicroismo circolare permette di monitorare cambiamenti conformazionali, ma, soprattutto, di stimare la presenza di particolari strutture secondarie. In vista di ciò, rappresenta uno strumento di notevole utilità, da affiancare alla spettroscopia NMR, perché permette di valutare rapidamente il comportamento conformazionale in differenti condizioni (ad es. in diversi sistemi solventi, pH e temperatura).

Tutte le proteine che presentano una struttura β sono caratterizzate da uno spettro CD avente una singola banda negativa e una singola banda positiva, le cui intensità risultano molto inferiori rispetto a quelle di proteine presentanti una struttura α -elica. Solitamente, lo spettro è caratterizzato da un minimo presente a lunghezze d'onda comprese tra 210 nm e 225 nm, e un massimo, più intenso, tra 190 nm e 205 nm; le proteine α/β mostrano generalmente due bande negative a 222 nm e a 208-210 nm e una positiva intorno a 190-195 nm (Fig. 21).

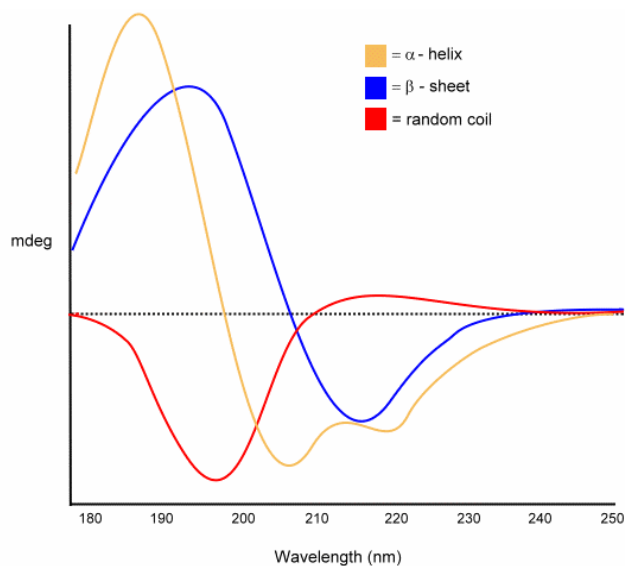


Figura 21. Polilisina in varie conformazioni con struttura secondaria differente.

Sono stati registrati spettri CD nel lontano UV di rMOG_{ED}(His)₆ in tampone PBS a pH 8. Gli spettri hanno evidenziato una caratteristica conformazione β -sheet, presentando un minimo a 218 nm e un massimo a 203 nm.

Gli spettri sono stati registrati a differenti temperature e non hanno mostrato sostanziali differenze del minimo caratteristico in seguito al riscaldamento, ma hanno messo in evidenza una variazione della banda positiva, che decresce a temperature superiori ai 40 °C, indice dell'inizio del fenomeno di aggregazione proteica, evento tipico delle proteine con conformazione β -sheet. Lo spettro ha mostrato anche che, se la proteina viene riportata alla temperatura di 4 °C, la sua struttura ritorna allo stato iniziale, indicando una alterazione reversibile della conformazione a seguito del riscaldamento (Fig. 22).

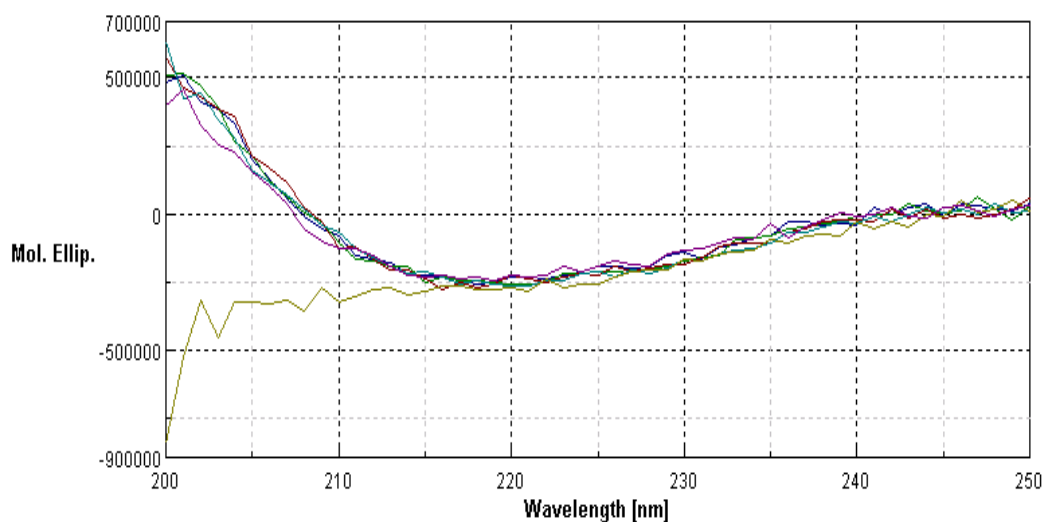


Figura 22. Spettri CD di rMOG_{ED}(His)₆ in tampone PBS pH 8 registrati a varie temperature: blu, 4 °C; verde, 20 °C; rosso, 40 °C; celeste, 60 °C; giallo, 80 °C; viola: lo spettro è stato registrato nuovamente a 4 °C, ma dopo aver eseguito l'ultima misura a 80 °C.

3.8 Saggi immunoenzimatici

I saggi immunoenzimatici sfruttano la capacità degli anticorpi di individuare biomolecole con alta sensibilità, specificità e a livelli molto bassi; si basano sull'interazione antigene-anticorpo per identificare un composto o una classe di composti.

I saggi immunoenzimatici su fase solida definiscono un sistema nel quale un antigene o un anticorpo è immobilizzato su una superficie inerte e reagisce con una soluzione contenente il corrispondente anticorpo o antigene.

I costituenti principali di questi saggi sono:

- un antigene o un anticorpo specifico per l'analita da determinare;
- un anticorpo secondario marcato con un enzima;
- un sistema di misura.

Una delle tecniche immunoenzimatiche più usate è il test ELISA, introdotto da Engvall e Perlmann.⁶⁶

I due componenti coinvolti in questo test sono: la fase solida, su cui uno specifico antigene o anticorpo è legato, e un anti-anticorpo marcato (o legato) con un enzima e coniugato al corrispondente anticorpo o antigene.

L'enzima agisce su un substrato specifico rilasciando un composto colorato, che può essere facilmente individuato da uno spettrofotometro.

Ci sono vari tipi di test ELISA:

- diretto: è usato per individuare un antigene dopo che è stato adsorbito sulla fase solida. Un anticorpo coniugato con una marcatura è poi incubato con l'antigene immobilizzato. Dopo il lavaggio dell'eccesso di coniugato e l'incubazione con un substrato e un cromogeno, la presenza di un colore indica una specifica interazione anticorpo-antigene;
- indiretto: è utile per il rilevamento di anticorpi usando antigeni specifici.

Dopo che l'antigene è stato adsorbito sulla fase solida, il primo anticorpo (anticorpo primario) è incubato con l'antigene e l'eccesso è lavato via.

L'anticorpo legato è rilevato dopo incubazione con uno specifico anti-

⁶⁶ E. Engvall, P. Perlmann, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes, *J. Immunol.*, **1972**, 109, 129-135.

anticorpo legato ad un enzima (anticorpo secondario), seguita da aggiunta del substrato dell'enzima;

- competitivo: è utile per l'identificazione e la quantificazione sia degli antigeni sia degli anticorpi. Nella determinazione dei primi, l'antigene presente nel campione compete per i siti sull'anticorpo con un antigene marcato aggiunto al mezzo: il cambio del colore sarà inversamente proporzionale alla quantità di antigene nel campione;
- inibizione: funziona in modo simile al competitivo. Un antigene è legato sulla fase solida e l'altro è aggiunto a concentrazioni diverse in presenza dell'anticorpo, che si lega all'antigene libero in soluzione piuttosto che a quello legato. In questo caso l'antigene libero inibisce il legame dell'anticorpo all'antigene adsorbito. Questo metodo è particolarmente utile nel determinare l'identità di specifici antigeni o anticorpi.

In particolare il metodo indiretto ELISA consiste nel far adsorbire l'antigene su un supporto solido, cioè sulla superficie di pozzetti in polistirene, bloccando i siti di legame aspecifici con opportune proteine inerti, normalmente contenute in siero fetale bovino (FBS). Successivamente nei pozzetti viene aggiunto il siero contenente gli anticorpi, ovvero le immunoglobuline, nel caso del siero umano. Queste ultime si legano quindi ai determinanti antigenici (epitopi) specifici del *target* adsorbito sul supporto solido. Il legame antigene-anticorpo viene successivamente rivelato aggiungendo ai pozzetti un anti-siero contenente anti-immunoglobuline, marcate con un enzima, capaci di legarsi alle immunoglobuline già impegnate nel complesso con l'antigene. La regione N-terminale (F_{ab}) dell'anticorpo riconosce l'epitopo dell'antigene legandosi in modo specifico, mentre la porzione C-terminale (F_c), generalmente di composizione costante, è la responsabile dell'interazione con l'anti-immunoglobulina marcata con l'enzima. Successivamente viene aggiunto un adeguato substrato capace di dare una reazione colorimetrica catalizzata dall'enzima. Il prodotto finale può essere determinato quantitativamente tramite l'uso di uno spettrofotometro per la misurazione dell'assorbanza a determinate lunghezze d'onda (Fig. 23).

Per marcare le immunoglobuline possono essere utilizzati enzimi differenti tra cui perossidasi o, come nel nostro caso, la fosfatasi alcalina. La scelta della più adeguata combinazione enzima/substrato è importante per migliorare la sensibilità del test immunoenzimatico.

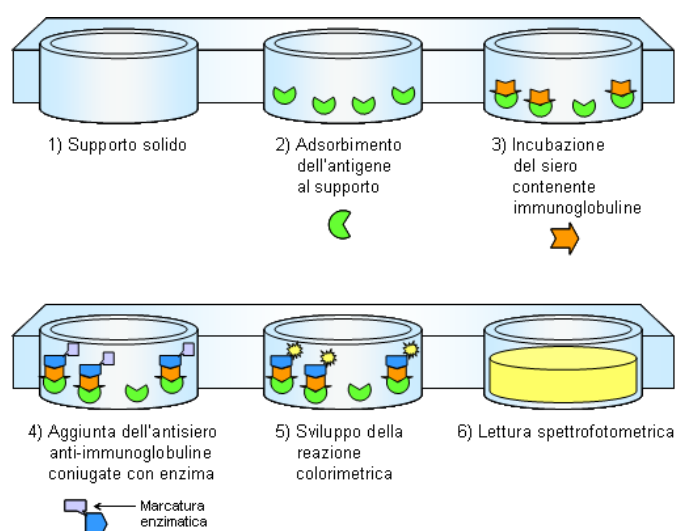


Figura 23. Rappresentazione schematica del test ELISA indiretto.

Le prime prove per rilevare anticorpi contro rMOG_{ED}(His)₆ nella SM e nei donatori sani sono state effettuate utilizzando il protocollo riportato da Lolli *et al.*^{26,27,28,67}

L'esecuzione corretta di ogni saggio immunoenzimatico dipende dal grado di ottimizzazione delle condizioni in cui questo viene eseguito. Per i test ELISA sono fondamentali la scelta del supporto, il pH e la forza ionica del tampone utilizzato per diluire l'antigene peptidico, la concentrazione dei vari reagenti, la temperatura ed i tempi di incubazione.⁶⁸

⁶⁷ A. M. Papini, Simple test for multiple sclerosis, *Nat. Med.*, **2005**, 11, 13.

⁶⁸ M. R. Price, M. Sekowski, D. S. W. Hooi, L. G. Durrant, F. Hudecz, S. J. B. Tendler, Measurement of antibody binding to antigenic peptides conjugated in situ to albumin-coated microtitre plates, *J. Immunol. Methods*, **1993**, 159, 277-281.

La metodica ELISA impiegata ha previsto l'adsorbimento di $rMOG_{ED}(His)_6$ sulla superficie dei pozzetti delle piastre, mentre i siti di legame aspecifici sono stati bloccati con FBS.

Sono state fatte tre diluizioni (1:100, 1:1000, 1:10000) dei sieri da testare, che sono stati incubati nei pozzetti per tutta la notte. L'aggiunta dell'anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina e del p-nitrofenilfosfato (p-NPP) ha permesso la formazione di un prodotto colorato; l'intensità della colorazione è stata letta da uno spettrofotometro.

Gli anticorpi sui quali è stata rivolta la nostra attenzione sono stati le IgM e le IgG. Le prime sono le principali immunoglobuline sintetizzate durante la risposta primaria, e, nel caso della SM, sono più specifiche rispetto alle IgG, poiché queste ultime, essendo immunoglobuline di memoria, sono presenti in concentrazioni maggiori ogni qualvolta sia in corso un'infezione. Nonostante ciò, non sono ancora state identificate con precisione le relazioni che legano la presenza di anticorpi anti-MOG e lo stato patologico associato alla SM.

E' stata effettuata una prima ricerca di anticorpi (IgM e IgG) anti- $rMOG_{ED}(His)_6$ con sieri di donatori sani (DS) (Grafici 1, 2).

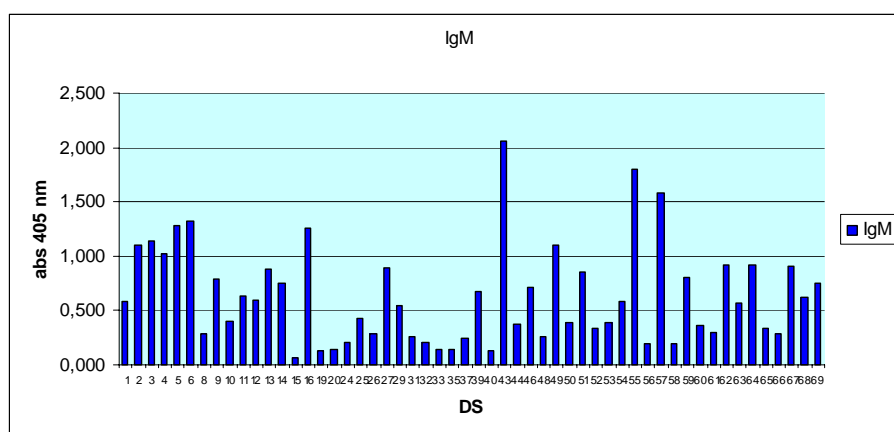


Grafico 1. IgM anti- $rMOG_{ED}(His)_6$ nei sieri di DS.

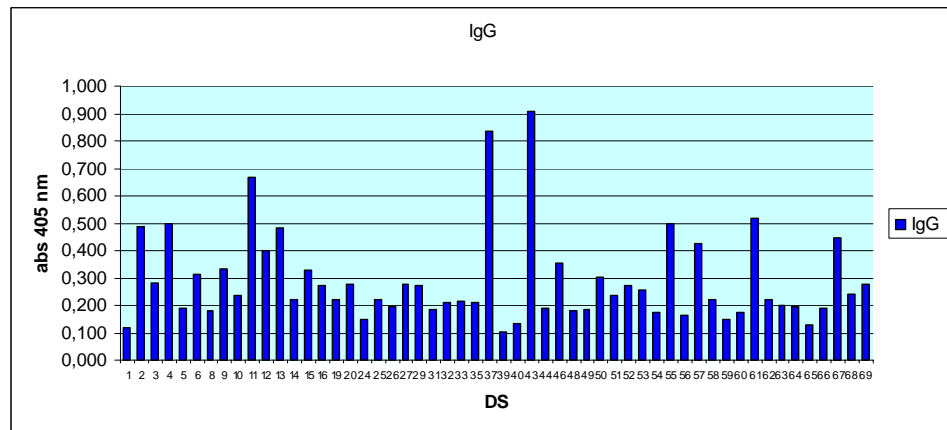


Grafico 2. IgG anti-rMOGED(His)₆ nei sieri di DS.

Per avere un confronto diretto tra la serie di dati relativi ai sieri dei DS e a quelli dei pazienti affetti da SM, è stato calcolato un valore di *cut off* sommando al valore medio dei DS il doppio della deviazione standard dei DS. I valori ottenuti sono stati: $cut\ off_{IgM}=1,53$; $cut\ off_{IgG}=0,63$; hanno permesso di valutare quanti sieri di pazienti affetti da SM mostravano un'assorbanza considerevolmente più alta rispetto ai sieri dei DS, tanto da poterli considerare positivi.

Utilizzando il protocollo ELISA ottimizzato per un peptide, non per una proteina quale rMOGED(His)₆, non sono stati ottenuti esiti positivi: il valore di *cut off* è stato elevato e nessun malato di SM è risultato positivo al test (Grafici 3,4).

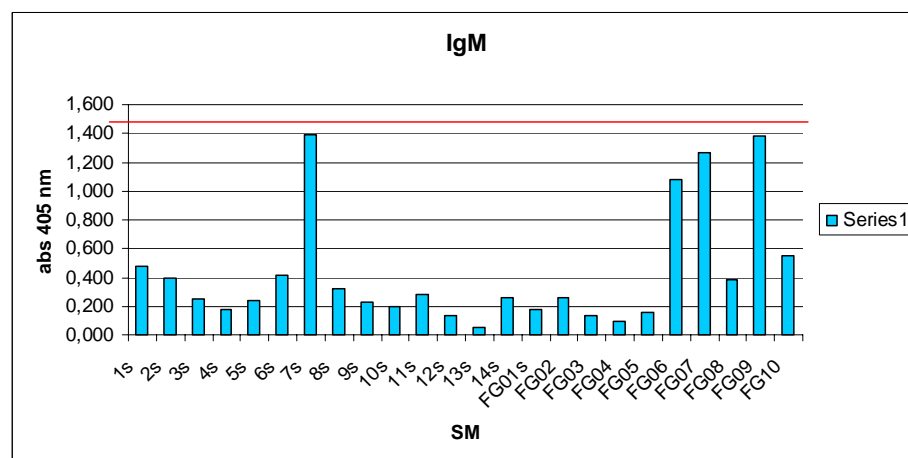


Grafico 3. IgM anti-rMOG_{ED}(His)₆ nei sieri di pazienti affetti da SM. La linea rossa rappresenta il valore di cut-off.

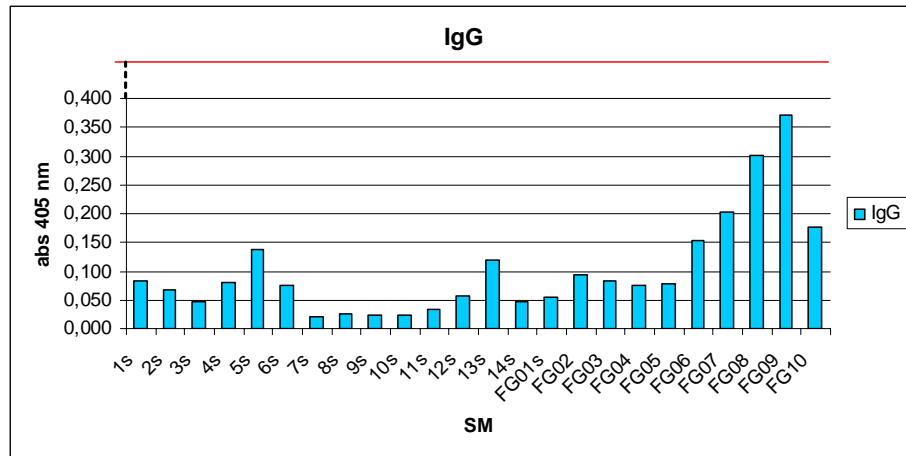


Grafico 4. IgG anti-rMOG_{ED}(His)₆ nei sieri di pazienti affetti da SM. La linea rossa rappresenta il valore di cut-off.

Pertanto si è cercato di ottimizzare il test in modo da renderlo più idoneo all'utilizzo di una proteina quale antigene. Sono state condotte, quindi, varie prove, al fine di ottenere un valido protocollo ELISA per rMOG_{ED}(His)₆ (Tabella 2).

Lo scopo principale di queste prove è stato quello di diminuire le interazioni aspecifiche che si possono avere tra gli anticorpi presenti naturalmente nei sieri e di evidenziare le interazioni più selettive tra rMOG_{ED}(His)₆ e gli anticorpi specifici presenti nei sieri di pazienti affetti da SM.

- *Diluizioni 2X e 4X*: la prima prova fatta è stata quella di variare le diluizioni degli anticorpi secondari anti-IgM e gli anti-IgG marcati con fosfatasi alcalina con diluizioni 2X e 4X, in modo tale da diminuire la concentrazione presente degli anti-anticorpi e favorire così le interazioni specifiche. Tuttavia si sono ottenuti sia nei sieri dei DS che in quelli dei

malati valori di assorbanza che diminuivano proporzionalmente alla diluizione (Grafici 5, 6, 7, 8).

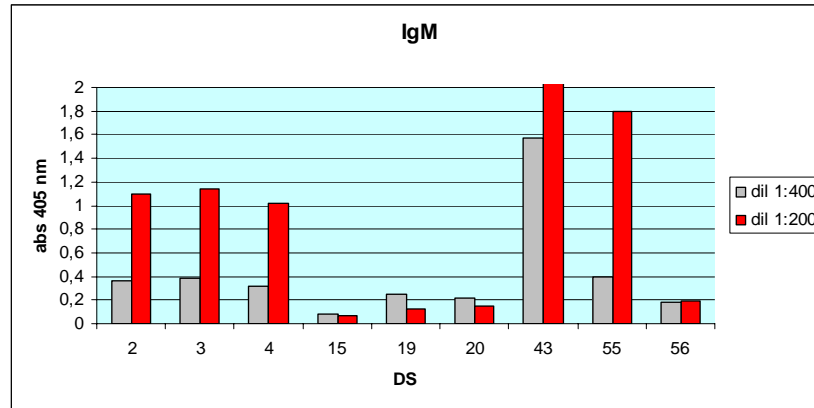


Grafico 5. IgM dei sieri di DS. Diluizioni dell'anticorpo secondario anti IgM marcato con fosfatasi alcalina 1:400.

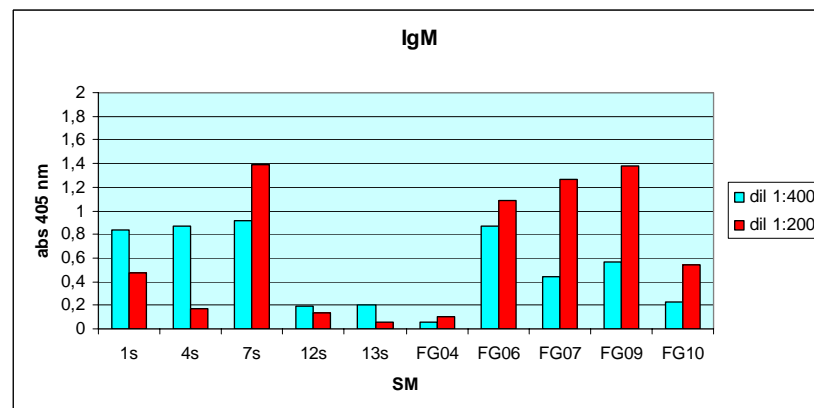


Grafico 6. IgM dei sieri di malati di SM. Diluizioni dell'anticorpo secondario anti IgM marcato con fosfatasi alcalina 1:400.

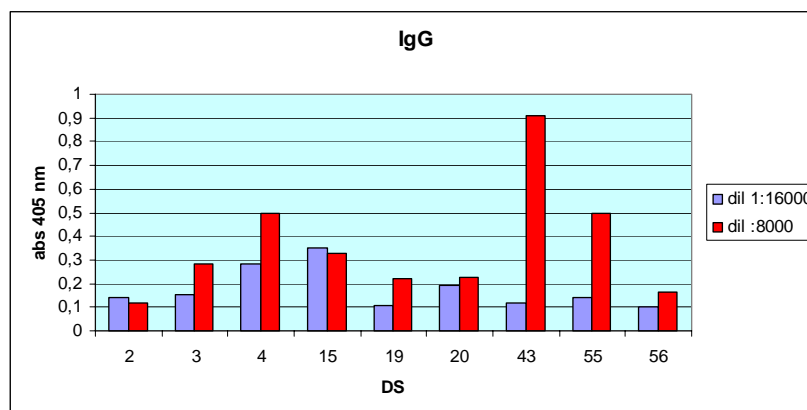


Grafico 7. IgG dei sieri di DS. Diluizioni dell'anticorpo secondario anti IgG marcato con fosfatasi alcalina 1:16000.

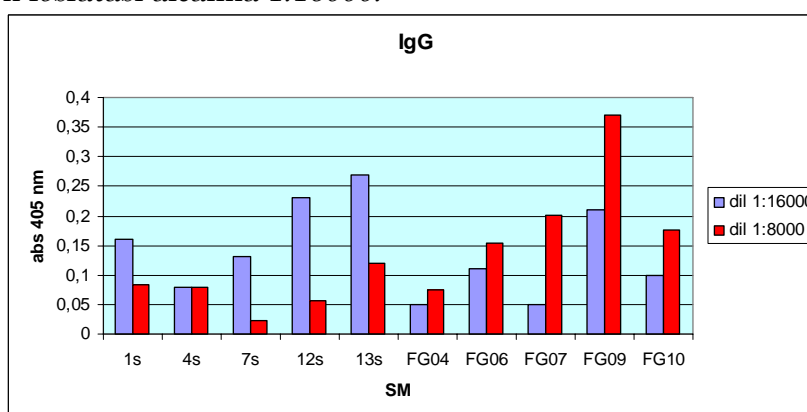


Grafico 8. IgG dei sieri di malati di SM. Diluizioni dell'anticorpo secondario anti IgG marcato con fosfatasi alcalina 1:16000.

- *Variazione del tampone di coating:* è stato usato come tampone di *coating* il *buffer* con cui è stata effettuata la dialisi della proteina (PBS pH 8), anziché una soluzione di Na_2CO_3 e NaHCO_3 a pH 9.6. Essendo la proteina sensibile a cambiamenti di tampone e di pH si è cercato di mantenere inalterate le condizioni di diluizione. Non si sono avute variazioni significative di assorbanza né nei sieri dei DS né in quelli dei malati; quindi il tampone di diluizione non incide nelle interazioni tra $\text{rMOG}_{\text{ED}}(\text{His})_6$ e gli anticorpi presenti nei sieri.
- *Variazione della percentuale di tensioattivo nella soluzione di lavaggio:* il tensioattivo Tween 20 nel protocollo standard viene usato alla

percentuale di 0,05%; questa è stata aumentata all'1%. L'operazione di lavaggio serve ad allontanare le molecole che si legano aspecificamente alla plastica delle piastre o con minor affinità all'antigene adsorbito sul fondo del pozzetto. L'effetto è basato sulla capacità dei detergenti di competere con altre molecole per i siti di legame sia idrofobici che idrofilici. Aumentando la concentrazione del detergente queste azioni sono facilitate; quindi nel pozzetto si elimineranno le interazioni aspecifiche mentre quelle specifiche, più forti, si conservano. Tuttavia i valori di assorbanza rispetto ai controlli non sono variati sensibilmente.

- *Variatione della soluzione di bloccaggio*: la percentuale di FBS è stata diminuita dal 10% al 2,5%. Gli agenti di bloccaggio possono essere usati per bloccare i siti rimasti liberi sulla superficie solida in modo da evitare interazioni aspecifiche del reagente successivo. Diminuendo la concentrazione di FBS si è cercato di impedire un'inibizione generalizzata e quindi meno specifica da parte dell'agente di blocco, in modo tale da lasciare liberi i siti specifici per l'anticorpo. È stata osservata una piccola variazione nei valori di assorbanza sia nei sieri dei DS che in quelli dei malati.
- *Variatione delle piastre*: sono state sostituite le piastre MaxiSorp con piastre *Biomat High Binding*. L'assorbimento di molecole su superfici di polistirene è dovuto a forze di attrazione intermolecolare (forze di Van der Waals); queste forze sono basate su interazioni elettrostatiche che possono essere distinte in forze dipolo-dipolo e forze dipolo indotto. Le piastre MaxiSorp presentano sulla loro superficie una combinazione di siti di legame idrofobici e idrofilici, buona per legami con proteine in quanto nella loro struttura presentano amminoacidi con entrambi i tipi di gruppo. L'utilizzo di piastre alternative è stato fatto per capire se un pozzetto con una superficie diversa permettesse un legame più stabile con rMOG_{ED}(His)₆. I risultati hanno mostrato che le assorbanze sono diminuite drasticamente, dimostrando che per questo tipo di test, le piastre *Biomat High Binding* sono meno efficienti.

- *Variatione dei tempi di incubazione dei sieri:* generalmente i sieri vengono lasciati in incubazione tutta la notte a 4 °C. E' stato pensato di diminuire il tempo di incubazione (1 h) e di aumentare la temperatura (temperatura ambiente); in questo modo la cinetica di reazione incrementa e l'interazione si forma in tempi più brevi. In questo intervallo più corto di reazione si permette la formazione di legami selettivi, che sono quelli tra la proteina e l'anticorpo, diminuendo la probabilità di instaurazione di legami non selettivi. Considerando che il tempo di incubazione è molto più breve si sono avuti comunque buoni valori di assorbanza; in particolare sono diminuite in modo significativo le assorbanze dei sieri dei DS (Grafico 9, 10, 11, 12).

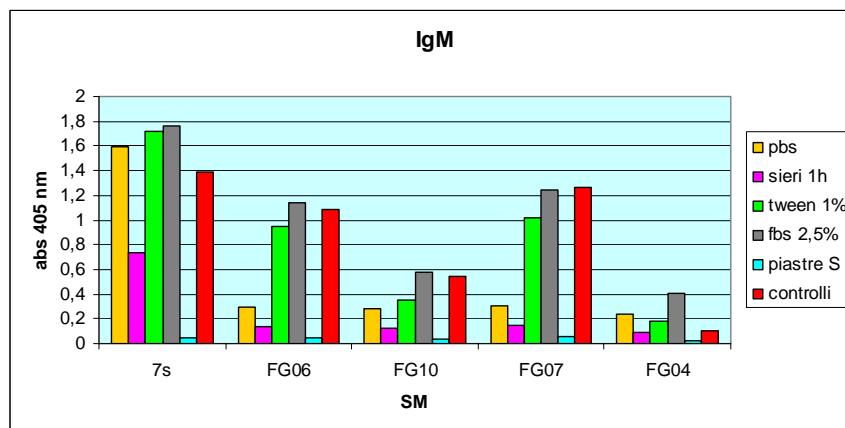


Grafico 9. IgM dei sieri di malati di SM. Confronto tra i controlli (protocollo standard ELISA) e modifiche apportate.

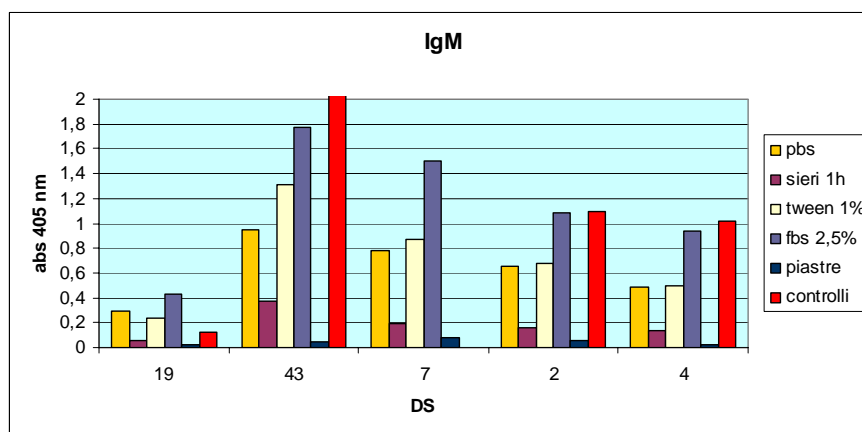


Grafico 10. IgM dei sieri di DS. Confronto tra i controlli (protocollo standard ELISA) e modifiche apportate.

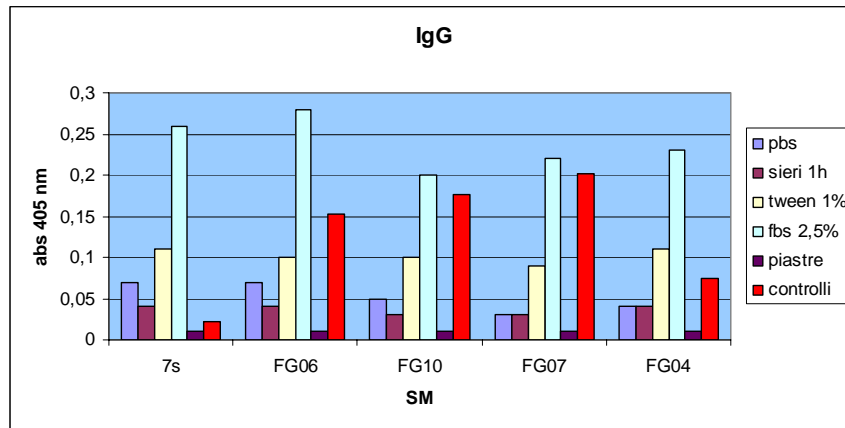


Grafico 11. IgG dei sieri di malati di SM. Confronto tra i controlli (protocollo standard ELISA) e modifiche apportate.

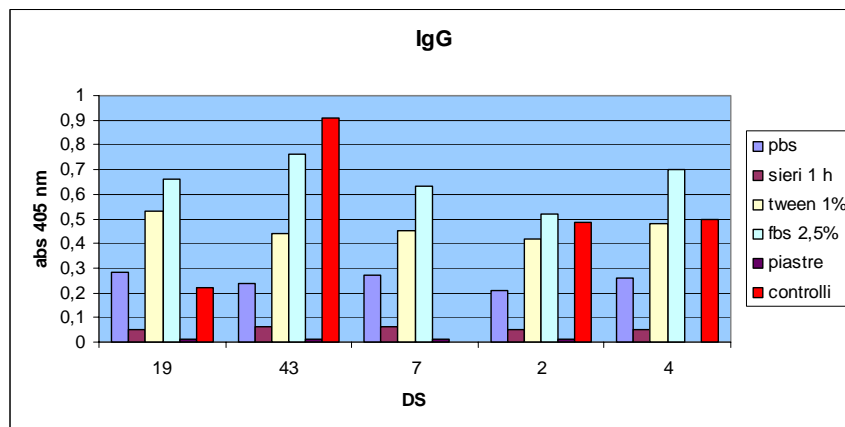


Grafico 12. IgG dei sieri di DS. Confronto tra i controlli (protocollo standard ELISA) e modifiche apportate.

- *Variatione dell'agente di bloccaggio*: l'albumina del siero bovino (BSA) è stata utilizzata come agente di blocco al posto di FBS; lo scopo, già spiegato precedentemente, è stato quello di cercare di bloccare solo i siti di legame aspecifici senza inibire quelli specifici tra rMOG_{ED}(His)₆ e l'anticorpo. Non sono state ottenute variazioni significative di

assorbanza rispetto al protocollo standard e, soprattutto, non si sono notate rilevanti differenze tra i DS e i malati (Grafici 13, 14, 15, 16).

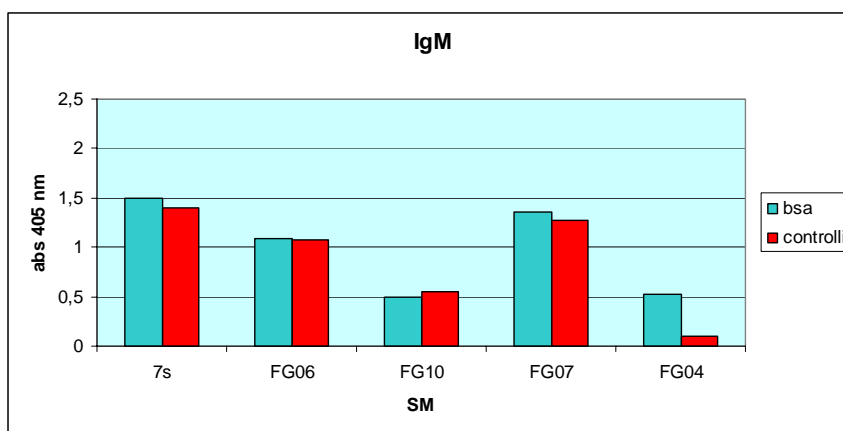


Grafico 13. IgM dei sieri di malati di SM. Test ELISA con BSA.

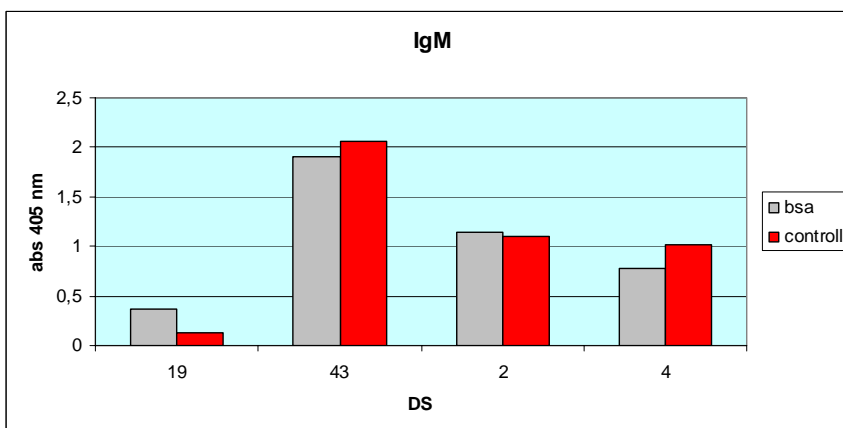


Grafico 14. IgM dei sieri di DSi. Test ELISA con BSA.

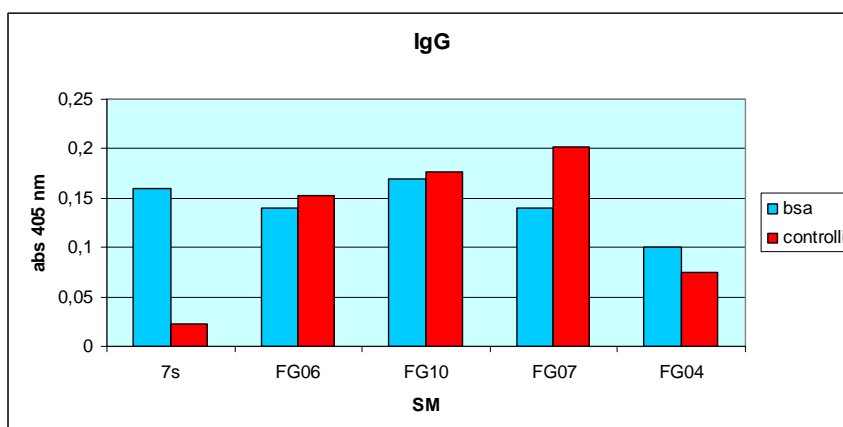


Grafico 15. IgG dei sieri di malati di SM. Test ELISA con BSA.

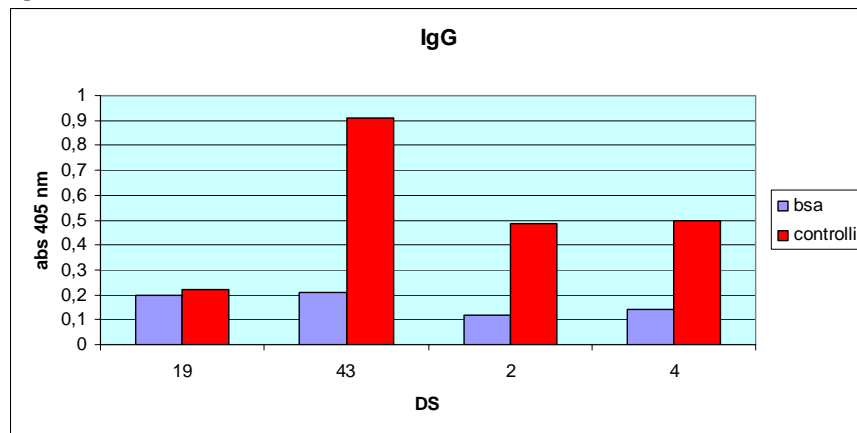


Grafico 16. IgG dei sieri di DS. Test ELISA con BSA.

Tabella 2. Tabella riassuntiva delle modifiche effettuate per ottimizzare il protocollo del test ELISA per la proteina rMOG_{ED}(His)₆.

Modifiche apportate al test ELISA	Risultati ottenuti rispetto al protocollo standard
Diluizioni 2X e 4X degli anticorpi secondari anti-IgM e gli anti-IgG	I valori di assorbanza nei sieri dei DS e in quelli dei malati sono diminuiti proporzionalmente alla diluizione.
Variazione del tampone di <i>coating</i> (PBS pH 8)	Non si sono avute variazioni significative di assorbanza né nei sieri dei DS né in quelli dei malati.
Aumento della percentuale di Tween 20 nella soluzione di lavaggio (da 0,05 a 1%)	Non si sono avute variazioni significative di assorbanza né nei sieri dei DS né in quelli dei malati.
Diminuzione della percentuale di FBS nella soluzione di bloccaggio (dal 10% al 2,5%)	E' stata osservata una piccola variazione nei valori di assorbanza sia nei sieri dei DS che in quelli dei malati.
Sostituzione delle piastre MaxiSorp con piastre <i>Biomat High Binding</i> .	Le assorbanze sono diminuite drasticamente, dimostrando che per questo tipo di test le piastre <i>Biomat High Binding</i> sono meno efficienti.
Variazione del tempo (1 h) e della temperatura (t. amb.) di incubazione dei sieri	Sono stati ottenuti buoni valori di assorbanza; in particolare sono diminuite le assorbanze dei sieri dei DS.
Variazione dell'agente di bloccaggio (BSA)	Non si sono avute variazioni significative di assorbanza né nei sieri dei DS né in quelli dei malati.

3.9 Espressione e purificazione di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ in terreni minimi

Al fine di effettuare lo studio della conformazione della proteina in soluzione è stata ottimizzata l'espressione di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ utilizzando *E. coli* e specifici mezzi di coltura, M9 e NMM, entrambi arricchiti con ¹⁵NH₄Cl come unica fonte di N, che generalmente permettono di ottenere la proteina marcata con ¹⁵N.

E' stato condotto un test di espressione di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ in entrambi i terreni di coltura e ne è stata confrontata l'efficienza mediante gel di poliacrilammide, in modo tale da poter selezionare il migliore terreno da utilizzare per l'ottenimento della proteina marcata.

Cellule elettrocompetenti di *E. coli* appartenenti al ceppo BL21(DE3) sono state trasformate con i plasmidi pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e pREP4, entrambi con concentrazione 0,120 µg/µl. La trasformazione è stata effettuata mediante elettroporazione. Successivamente le cellule sono state piastrare su terreno LB Agar contenente ampicillina e kanamicina e incubate a 37 °C per tutta la notte.

Singole colonie di *E. coli* BL21(DE3) sono state utilizzate per inoculare 10 ml dei terreni NMM e M9, in cui sono già presenti gli antibiotici necessari per la selezione; le colture sono state incubate a 37 °C sotto agitazione tutta la notte.

Aliquote di 100 µl delle precolture così ottenute sono state prelevate per inoculare 100 ml di NMM e M9. I batteri sono stati fatti crescere sotto agitazione a 37 °C fino a quando la densità ottica misurata a 600 nm non ha raggiunto un valore compreso tra 0,5 e 0,8. Successivamente è stata indotta l'espressione di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ tramite aggiunta di IPTG in concentrazione finale 1 mM e incubando a 30 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Da osservazione dei livelli di espressione mediante analisi elettroforetica (SDS-PAGE 12%) è stato evinto che il terreno M9 è risultato essere migliore rispetto a NMM, conducendo all'ottenimento di quantità

proteiche molto più elevate: per questo il mezzo M9 è stato scelto per effettuare l'espressione della proteina marcata con ^{15}N (Fig. 24).

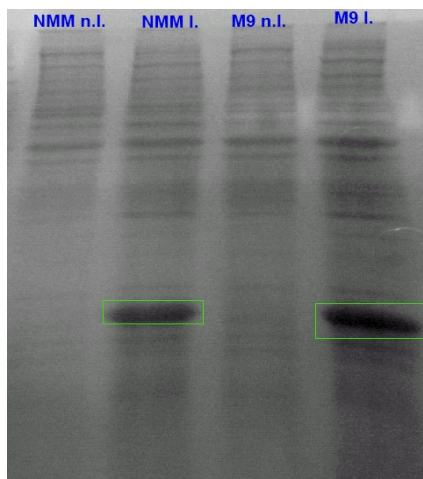


Figura 24. SDS-PAGE 12%: campioni derivanti da lisati cellulari provenienti da NMM non indotto (n.I.), NMM indotto (I.), M9 non indotto (n.I.), M9 indotto (I.).

Pertanto è stato deciso di ottenere $\text{rMOG}_{\text{ED}}^{15}\text{N}(\text{His})_6$ utilizzando il terreno di coltura M9.

Una singola colonia di *E. coli* BL21(DE3), derivante dalla trasformazione con $\text{pQE12rMOG}_{\text{ED}}(\text{His})_6$ e pREP4 , è stata utilizzata per inoculare 10 ml di terreno M9, contenente gli antibiotici necessari per la selezione; le colture sono state incubate a 37 °C sotto agitazione tutta la notte.

Un'aliquota di 1 ml della precultura così ottenuta è stata prelevata per inoculare 1 litro di M9. I batteri sono stati fatti crescere sotto agitazione a 37 °C fino a quando la densità ottica misurata a 600 nm non ha raggiunto un valore compreso tra 0,5 e 0,8. Successivamente è stata indotta l'espressione di $\text{rMOG}_{\text{ED}}^{15}\text{N}(\text{His})_6$ tramite aggiunta di IPTG (1 mM) e incubando a 30 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

$\text{rMOG}_{\text{ED}}^{15}\text{N}(\text{His})_6$ è stata espressa nei corpi inclusi e il suo *refolding* è stato ottenuto sfruttando la possibilità di purificare la proteina tramite cromatografia di affinità; è stata usata la resina *Chelating Sepharose Fast Flow* con lo ione Ni^{2+} immobilizzato su di essa.

La purificazione è stata effettuata a temperatura ambiente e ha previsto il passaggio da condizioni altamente denaturanti (guanidinio HCl 6 M) a condizioni non denaturanti, per ottenere il corretto ripiegamento di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆, e l'eliminazione degli agenti riducenti per permettere la formazione del ponte disolfuro. L'eluizione della proteina è stata effettuata utilizzando un tampone con imidazolo 0,5 M che, avendo un'affinità maggiore per lo ione Ni²⁺ rispetto alla coda di sei His della proteina ricombinante, ne ha permesso il distacco.

Al fine di determinare l'assenza di contaminazioni e la percentuale di isotopo ¹⁵N effettivamente incorporato, è stato registrato uno spettro di massa di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆, ottenuta dalla purificazione, utilizzando lo spettrometro MALDI-TOF UltraFlexIII (Bruker) (Fig. 25).

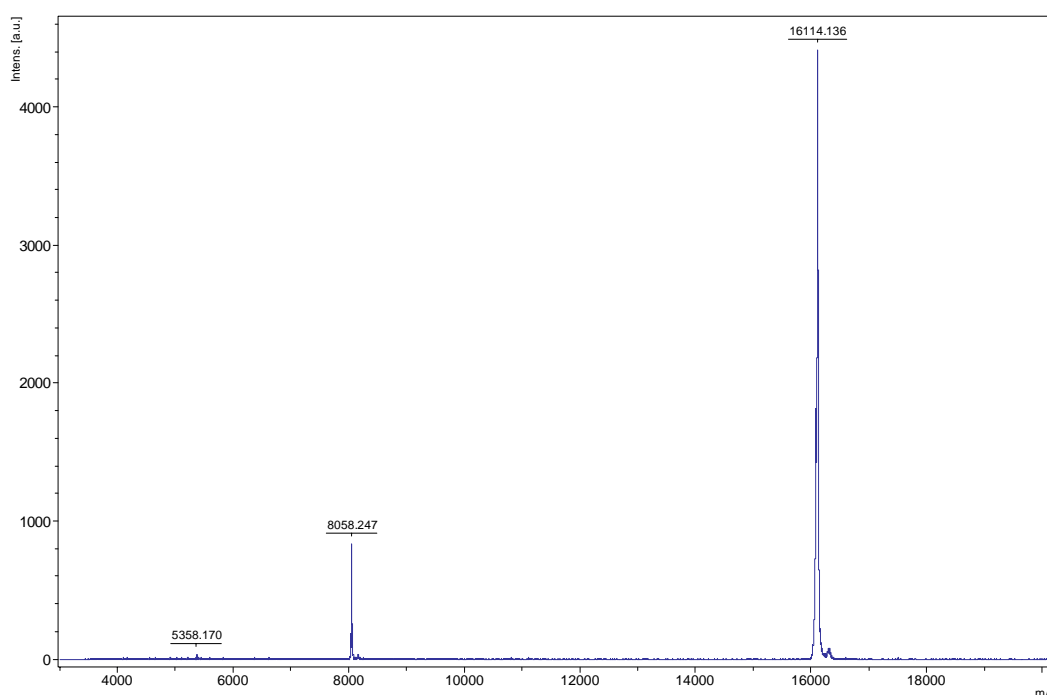


Figura 25. Spettro di massa di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆.

Successivamente sono state condotte varie prove di dialisi con tamponi diversi per determinare quale fosse più adatto per gli studi successivi da effettuare su rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ (Tabella 3).

Tamponi	Tempo di dialisi	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale
Acido citrico 100 mM pH 3.2	2 ore	1,56 mg/ml	1,63 mg/ml
CH ₃ COONa 100 mM pH 4.5	2 ore	1,39 mg/ml	1,55 mg/ml
Citrato di Sodio 100 mM pH 5.5	2 ore	1,39 mg/ml	1,37 mg/ml
CHES 100 mM pH 9.5	3 ore	1,86 mg/ml	1,68 mg/ml
CAPS 100 mM pH 10.5	3 ore	1,86 mg/ml	1,24 mg/ml

Tabella 3. Tamponi di dialisi utilizzati e risultati ottenuti.

La scelta del tampone di dialisi è caduta su CH₃COONa 100 mM pH 4.5, in quanto il valore di pH dello stesso, conferendo alla proteina una maggiore stabilità, permette di mantenerla in soluzione.

Tuttavia questo tampone, non essendo deuterato, non ha consentito di ottenere spettri NMR molto significativi, poiché la presenza del CH₃ dell'acetato, in un tampone avente concentrazione superiore a quella della proteina in analisi, ha coperto tutta l'area in cui cadono i segnali degli amminoacidi alifatici. Inoltre la presenza di cloruri, utilizzati per aggiustare il pH del tampone, ha interferito nella lettura degli spettri di dicroismo circolare.

Quindi è stato ricercato un altro tampone che potesse mantenere la proteina in soluzione, risultare stabile a quel valore di pH e non interferire con le successive analisi: è stato scelto il tampone H₃PO₄/H₂PO₄⁻, che ha dimostrato di possedere le caratteristiche richieste.

Dopo aver effettuato la dialisi di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ in tampone NaH₂PO₄ 20 mM pH 4.6, sono state condotte analisi CD su un campione della proteina. Sono stati registrati spettri a varie temperature che hanno mostrato che la proteina rimane inalterata, mantenendo la giusta conformazione anche a pH acido (Fig. 26).

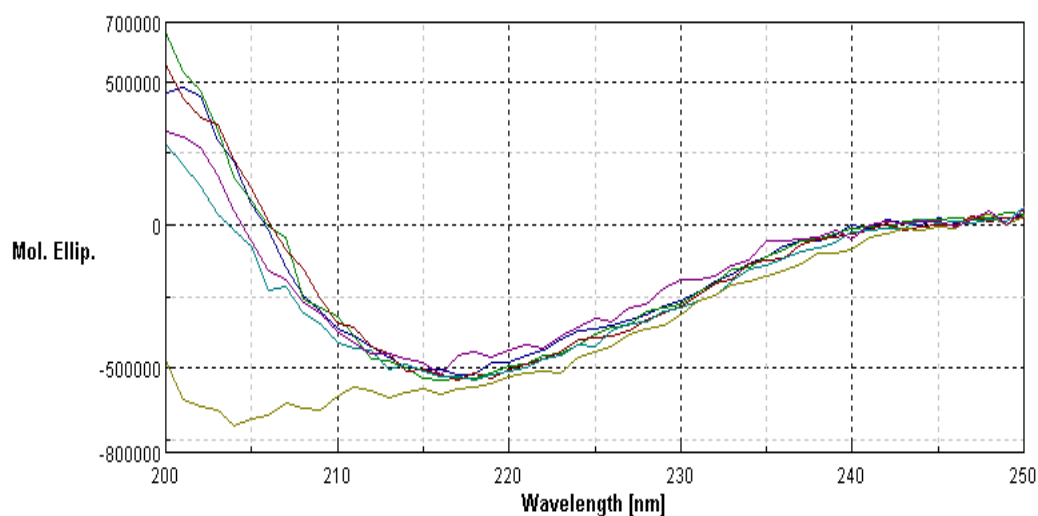


Figura 26. Spettri CD di $rMOG_{ED}^{15}N(His)_6$ in NaH_2PO_4 20 mM pH 4.6 registrati a varie temperature: blu, 4 °C; verde, 20 °C; rosso, 40 °C; celeste, 60 °C; giallo, 80 °C; viola: lo spettro è stato registrato nuovamente a 4 °C, ma dopo aver eseguito l'ultima misura a 80 °C.

3.10 Studi conformazionali in soluzione di $rMOG_{ED}^{15}N(His)_6$

Risonanza Magnetica Nucleare

La Risonanza Magnetica Nucleare fonda le sue basi sull'assunzione che molti nuclei atomici sono definiti da un momento angolare e da un momento magnetico. Il momento magnetico μ può essere immaginato come un ago fissato al centro nel nucleo atomico costretto a mantenere un angolo ben definito con la direzione del campo magnetico esterno e a precedere attorno a esso. L'estremità di questo ago virtuale può trovarsi solo in due posizioni, nella direzione del campo esterno o in quella contraria; poiché lo *spin* I è opposto a μ , i due casi descritti vengono individuati rispettivamente in *spin down* e in *spin up*, ai quali corrisponde un'energia del nucleo atomico minore o maggiore rispetto alla situazione in assenza di campo magnetico (Fig. 27).

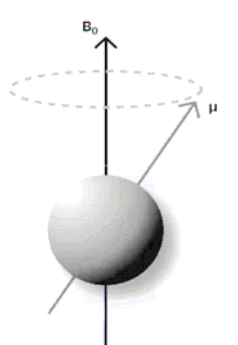


Figura 27. Moto di precessione di un nucleo avente momento magnetico μ posto in un campo magnetico.

Il nucleo può cambiare stato di *spin*, assorbendo o emettendo radiazione di energia esattamente pari alla differenza degli stati di *spin up* e *spin down*, la cui frequenza tipica è dell'ordine dei gigahertz (onde radio). Questo risulta essere il fenomeno attraverso cui si basano le Risonanze Magnetiche: l'energia assorbita o emessa viene quindi misurata con opportuni dispositivi, ottenendo un diagramma, denominato spettro, la cui forma caratteristica permette di risalire alle interazioni che il nucleo effettua durante il moto nella molecola. È possibile così stabilire a quale specie chimica appartenga la particella, o derivare informazioni sulla dinamica molecolare locale dell'intorno elettronico.

La prima tappa nello studio strutturale di qualsiasi molecola mediante NMR consiste nell'assegnazione di tutte le risonanze relative ad ogni nucleo dotato di momento magnetico e, quindi, a tutti i protoni; poiché gli isotopi più abbondanti di atomi quali C e N (^{12}C e ^{14}N) sono, rispettivamente, privi di momento magnetico e dotati di momento quadrupolare, è necessario condurre le analisi attraverso l'uso di sistemi arricchiti isotopicamente al carbonio o all'azoto (^{13}C e ^{15}N).

La prima fase di studio di un qualsiasi composto si sviluppa a partire da un'analisi qualitativa dello spettro monodimensionale, per rilevare eventuali peculiarità nei parametri più immediatamente leggibili, quali *chemical shift* e costanti di accoppiamento. Suddividendo lo spettro in tre zone si possono così individuare varie aree, nelle quali si identificano una zona a basso campo, dove

risuonano generalmente i protoni ammidici e i protoni degli anelli aromatici, una zona intermedia, in cui risuonano i protoni in α al carbonile, e una zona a campi alti, in cui sono presenti i protoni CH₂ delle catene laterali e i protoni alifatici. La presenza di gruppi polari o correnti d'anello possono, tuttavia, influenzare in maniera rilevante i *chemical shift* dei protoni vicini: questi effetti di schermaggio e deschermaggio sono facilmente rilevabili già a un primo esame dello spettro. Nel caso di proteine o peptidi che non possono essere espressi, si procede con classici esperimenti bidimensionali omonucleari, che richiedono maggiori interventi da parte della spettroscopia. Nell'assegnamento delle risonanze di una proteina o di un peptide si procede normalmente in due stadi:

1. assegnazione del tipo di residuo, per esempio stabilire che la risonanza di un certo protone ammidico appartiene ad un residuo di glicina (Gly) o ad un residuo di asparagina (Asn);
2. assegnazione sequenziale, che consiste nell'assegnare una data risonanza ad un NH della Gly³ (esempio precedente), piuttosto che a quello della Gly³². Tra i metodi di assegnazione delle risonanze protoniche è possibile utilizzare il "metodo dell'assegnazione sequenziale", o quello "diretto alla catena principale".⁶⁹

Terminata questa fase si procede alla raccolta dei parametri diagnostici dal punto di vista conformazionale, essenzialmente effetti NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), ovvero parametri di rilassamento traducibili in distanze interatomiche, costanti di accoppiamento, che possono essere trasformate in angoli diedri, e *chemical shift*, i quali, generalmente, danno informazioni sull'intorno elettronico. Questi parametri, indicati collettivamente come *constrain* (vincoli), possono essere tradotti univocamente in una struttura, purchè siano in numero sufficiente rispetto ai gradi di libertà del sistema in esame. Nel caso di piccoli peptidi è spesso possibile abbinare allo studio in soluzione calcoli di meccanica molecolare, che prevedono l'esplorazione di tutto

⁶⁹ K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acid*, Wiley, New York, 1986.

lo spazio conformazionale multidimensionale. Attraverso quest'approccio si può limitare il numero di conformazioni energeticamente accessibili.

Cenni su tecniche bidimensionali

Spettri NMR monodimensionali protonici affetti da notevoli sovrapposizioni di segnali non sono sempre legati alle dimensioni delle molecole in esame: in questi casi risulta difficile, e a volte impossibile, riuscire ad assegnare tutte le risonanze presenti a particolari protoni. Un enorme passo avanti nella potenzialità della tecnica NMR è stato compiuto con l'ideazione da parte di Jean Jeener, all'inizio degli anni '70, di un esperimento bidimensionale.⁷⁰ In questo tipo di esperimenti le risonanze vengono disperse su due dimensioni (piano) piuttosto che in una sola (retta), ossia i segnali risultanti sono funzione di due frequenze anziché di una sola: di conseguenza, la probabilità di sovrapposizione fra due risonanze è notevolmente ridotta.

Gli esperimenti bidimensionali possono essere classificati in due grandi gruppi:

1. esperimenti che danno informazioni sulle relazioni lungo i legami, quali COSY, DQF-COSY, e TOCSY;^{71,72}
2. esperimenti che danno informazioni sulle relazioni attraverso lo spazio, quali NOESY.⁷³

Il più semplice esperimento di correlazione è COSY (spettroscopia di correlazione omonucleare bidimensionale, *Correlation SpectroscopY*), che mostra solo le correlazioni dirette attraverso i legami. COSY rappresenta il primo esperimento 2D, suggerito da Jeener nel 1971, e costituisce il prototipo di tutti gli esperimenti bidimensionali omonucleari: la sua utilità riguarda la correlazione tra i *chemical shift* di protoni accoppiati scalarmente. Nel caso di un sistema di spin AX, indicando con δ_A il *chemical shift* di A e con δ_X il

⁷⁰ J. Jeener, *II Ampere Int. Summer School*, Basko Polje, Jugoslavia, **1971**.

⁷¹ U. Piantini, O. W. Soerensen, R. R. Ernst, Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6800-6801.

⁷² A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **1985**, 65, 335-360.

⁷³ J. Jeener, B. H. Meyer, P. Bachman, R. R. Ernst, Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546-4553.

chemical shift di X, i *cross peak*, indicanti il trasferimento di magnetizzazione tra A e X, saranno posti simmetricamente rispetto alla diagonale, con coordinate dA, dX e dX, dA, dove quest'ultimi, raggruppati in multipletti bidimensionali, hanno, in entrambe le dimensioni, una separazione pari alla costante di accoppiamento. I picchi sulla diagonale, o nelle immediate vicinanze, hanno tutti la stessa fase, mentre i *cross peak* hanno le componenti in antifase, cioè, pur avendo ciascuno un profilo in puro assorbimento, hanno segno opposto. Questa caratteristica ha una conseguenza importante: la risoluzione di uno spettro 2D deve essere sufficiente a separare le componenti di un *cross peak* dallo spettro. Questo esperimento di base è ormai stato superato da altri esperimenti più sofisticati, come il DQF-COSY (spettroscopia di correlazione omonucleare bidimensionale con filtro a doppio quanto, *Double-Quantum Filtered COSY*), che ha il vantaggio di mostrare le diagonali in puro assorbimento di fase.⁷⁴ Questi esperimenti mostrano solo le correlazioni dirette attraverso i legami e sono quindi di utilità limitata, a causa dei problemi di sovrapposizione spettrale; tale sovrapposizione aumenta procedendo dalla regione degli NH alla regione dei protoni alifatici. Per questo motivo risultano molto utili gli esperimenti che mostrano anche le correlazioni indirette o *relayed*, cioè trasmesse in più stadi attraverso i legami, come gli esperimenti COSY-RELAYED o TOCSY (*TOTally Correlated SpettroscopY*). Quest'ultimo esperimento è particolarmente utile in quanto, modificando il parametro "tempo di *mixing*" (t_m), è possibile ottenere, a scelta, correlazioni dirette o a *relay* singolo, doppio o multiplo; inoltre, nel TOCSY, le componenti dei multipletti dei *cross peak* sono tutte in fase, cioè hanno lo stesso segno, mentre in esperimenti di tipo COSY sono in antifase. Il vantaggio che si presenta, quindi, è quello di un esperimento (TOCSY) notevolmente più sensibile e con una risoluzione migliore rispetto agli esperimenti di tipo COSY.

Il carattere in antifase dei multipletti di un DQF-COSY limita l'applicabilità dell'esperimento: infatti, quando la larghezza di riga è

⁷⁴ M. Rauce, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, Improved spectral resolution in COSY ¹H NMR spectra of proteins via double quantum filtering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 117, 479-485.

confrontabile o superiore alla costante di accoppiamento si hanno pesanti cancellazioni che diminuiscono il rapporto segnale/rumore; inoltre, sovrapposizioni fra protoni di diversi sistemi di *spin* potrebbero causare incertezze nell'assegnazione. L'esperimento TOCSY risolve entrambi i problemi, infatti, mediante un'opportuna sequenza di impulsi si opera un trasferimento di magnetizzazione in fase anziché in antifase, per cui il multipletto che costituisce il *cross-peak* è formato da segnali aventi tutti lo stesso segno.

Una volta identificati i sistemi di *spin*, si può procedere sistematicamente nella ricerca dei contatti sequenziali tra sistemi di *spin* vicini; tali informazioni si ottengono dall'analisi delle regioni degli spettri NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) contenenti i *cross peak*: $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+1}$, $\text{NH}_i\text{-}\alpha\text{CH}_{i-1}$, $\text{NH}_i\text{-}\beta\text{CH}_{i-1}$. In pratica è necessario sia il NOESY, nel quale gli esperimenti di correlazione possono essere mediati da fenomeni di trasferimento di magnetizzazione longitudinale incoerente, attraverso *cross-relaxation* dipolare o di scambio chimico, sia il COSY (o il TOCSY) per ottenere un'analisi conformazionale soddisfacente, in quanto è necessario collegare continuamente le informazioni sulle relazioni attraverso i legami e quelle attraverso lo spazio.

Un effetto di rilevante importanza che interviene in questi esperimenti è rappresentato dall'effetto *Overhauser* Nucleare (NOE), un fenomeno strettamente connesso al rilassamento. La definizione è la seguente: il NOE (η_1) è la variazione frazionaria dell'intensità del segnale NMR dello *spin* I quando un altro *spin* J viene saturato. Dal confronto con la sequenza di impulsi del COSY si vede che quella del NOESY presenta, dopo l'impulso di *mixing*, un intervallo durante il quale si verifica il fenomeno di *cross-relaxation* o scambio; infine il terzo impulso a 90° serve ad acquisire la magnetizzazione. I *cross peak* dello spettro NOESY identificano i nuclei tra cui vi è accoppiamento dipolare; se consideriamo un sistema a due *spin*, costituito dai due nuclei A e B vicini nello spazio, in modo che siano dipolarmente accoppiati, quando si perturbano le popolazioni relative al nucleo A si induce

un riassetamento delle sue popolazioni, ma anche quelle del nucleo B, per i processi di scambio che intercorrono tra i due nuclei. In questo modo si realizza un trasferimento di magnetizzazione tra i due *spin*, che conduce a una variazione delle intensità delle linee spettrali del nucleo B.

In un esperimento NOESY una scelta critica è quello del tempo di *mixing*; nel caso di molecole di piccole dimensioni bisognerebbe avere informazioni sul tempo di correlazione (τ_c), il più piccolo tempo di attesa necessario affinché la maggior parte dei vettori interprotonici (ognuno relativo a una coppia di nuclei della molecola) invertano la loro orientazione; nel caso di proteine che hanno tempi di correlazione alti, valori utili sono tra 50 e 200 ms. Gli effetti NOE, osservati per una coppia di protoni, dipendono dalla distanza, ma anche dalla frequenza dei moti del vettore interprotonico.⁷⁵ Quando il tempo di correlazione rotazionale della molecola in esame è vicino al reciproco della frequenza dello spettrometro (ω), cioè $\omega\tau_c=1$, come spesso accade nel caso di molecole piccole studiate con apparecchi NMR ad alto campo, si verificano effetti NOE molto piccoli oppure non si osservano del tutto. Un approccio possibile, negli studi di effetti NOE di piccole molecole, è quello di modificare le condizioni sperimentali in maniera tale che $\omega\tau_c$ non sia vicino all'unità, mentre variare la forza del campo (ω) non risulta pratico poiché, a causa della maggiore sensibilità e risoluzione, è preferibile usare un campo magnetico più alto. Una valida alternativa è rappresentata dall'aumento del τ_c effettivo che consente di ottenere effetti NOE negativi anche per piccole molecole. Un aumento della viscosità della soluzione, in accordo con la teoria della microviscosità, produce un aumento del τ_c ;⁷⁶ infatti:

$$\tau_c = \eta V_m f_r / kT$$

dove η è la viscosità del mezzo, V_m è il volume della molecola di soluto, f_r è il fattore di microviscosità, k è la costante di Boltzmann e T la temperatura. Una

⁷⁵ J. H. Noggle, R. E. Schimer, *The Nuclear Overhauser Effect - Chemical Applications*. Academic Press, New York, 1971.

⁷⁶ A. Gierer, K. Wirtz, *Z. Naturforsch*, 1953, A8, 532-537.

volta effettuata l'assegnazione sequenziale si procede alla raccolta dei parametri utilizzabili per l'analisi conformazionale quali effetti NOE, costanti di accoppiamento e coefficienti di temperatura dei protoni labili. Parametri molto importanti da considerare sono, innanzitutto, le costanti di accoppiamento J e, in particolare, le costanti ${}^3J_{NH_i/C\alpha_i}$: quest'ultima è la più semplice da determinare sperimentalmente attraverso la misurazione della separazione delle componenti in antifase dei *cross peak* $NH_i-\alpha CH_i$ in esperimenti di tipo COSY sfruttando l'equazione di Pardi, qui di seguito riportata:⁷⁷

$${}^3J_{NH_i/C\alpha_i} = 6.4\cos^2\theta - 1.4\cos\theta + 1.9$$

Queste relazioni, tuttavia, forniscono risultati univoci solo per valori grandi delle costanti di accoppiamento (8-10 Hz), per valori intermedi si hanno, invece, risultati incerti, perché molti angoli diedri possono corrispondere ad una certa costante; infine, per piccoli peptidi in soluzione, i valori delle costanti di accoppiamento possono essere una media di valori derivanti da più conformazioni in soluzione (ripiegate ed estese) in veloce equilibrio tra loro.

Nell'analisi conformazionale dei peptidi i parametri spettrali legati ai protoni ammidici possono essere di valore diagnostico. *Chemical shift* di protoni più grandi di 8,5 ppm (quindi deschermati) sono un indizio di un possibile coinvolgimento di un legame a idrogeno, poiché questo tipo di legame generalmente provoca una diminuzione della densità elettronica del protone coinvolto. Ancora più significativi sono i valori dei coefficienti di temperatura di questi segnali, cioè le variazioni delle risonanze dei protoni ammidici con la temperatura. E' stato dimostrato che se un protone ammidico forma un legame idrogeno e rimane legato nell'intero intervallo di temperatura esaminato, il suo *chemical shift* rimane approssimativamente costante, in quanto coefficienti di

⁷⁷ A. Pardi, M. Rillater, K. Wüthrich, Calibration of the angular dependence of the amide proton- C^α proton coupling constants, ${}^3J_{HN\alpha}$, in a globular protein: use of ${}^3J_{HN\alpha}$ for identification of helical secondary structure, *J. Mol. Biol.*, **1984**, 180, 741-751.

temperatura bassi ($< 2 \text{ppb/K}$) indicano che il protone è impegnato in un legame idrogeno stabile in quell'intervallo di temperatura. Se invece l'aumento di temperatura provoca una rottura del legame a idrogeno, si possono avere diversi andamenti in funzione della capacità del solvente stesso di formare legami. Solventi come acqua e dimetilsolfossido, che sono buoni accettori di legami a idrogeno, hanno una forte tendenza a sostituire l'ossigeno carbonilico della molecola, competendo nella formazione di questi legami: in conseguenza di questo, il protone ammidico può essere esposto a un largo spettro di situazioni di non facile previsione, in quanto funzione sia della solvatazione sia della conformazione; dopotutto è possibile trovarsi in presenza di equilibri conformazionali e quindi di valori poco significativi in quanto mediati su più strutture.

Le informazioni derivanti dagli effetti NOE, le cui intensità dipendono dalle distanze interprotoniche di atomi vicini nello spazio, rivestono il ruolo di maggior importanza. Gli effetti NOE possono essere misurati solo tra protoni che sono ad una distanza relativamente corta ($< 5 \text{ \AA}$), a causa del debole momento magnetico protonico e della dipendenza dalla distanza internucleare per un fattore di r^{-6} . Attraverso l'uso di opportune procedure questi NOE possono essere tradotti in intervalli di distanze inter-protoniche; proprio questi costituiscono l'incertezza della misura e le violazioni dei limiti inferiori e superiori e sono stati presi come criterio per valutare la qualità dei modelli strutturali della molecola, ottenuti mediante l'uso di algoritmi eseguiti attraverso *software* specifici.

Gli elementi regolari di una struttura secondaria possono essere facilmente identificati sulla base di un'interpretazione qualitativa degli effetti NOE sequenziali: infatti, ogni tipo di struttura secondaria è caratterizzato da uno schema particolare di NOE di *short range* tra residui distanti non più di cinque posizioni nella sequenza amminoacidica del peptide o della proteina. Le α -eliche sono caratterizzate da una serie di effetti NOE di intensità forte-media del tipo $\text{NH}_j\text{-NH}_{j+1}$, $\beta\text{CH}_j\text{-NH}_{j+1}$, $\alpha\text{CH}_j\text{-NH}_{j+3}$, $\alpha\text{CH}_j\text{-}\beta\text{CH}_{j+3}$ e da effetti deboli $\alpha\text{CH}_j\text{-NH}_{j+1}$, mentre le strutture β sono caratterizzate da forti $\alpha\text{CH}_j\text{-}$

NH_{j+1} e dall'assenza di altri effetti di *short range*. Per quanto riguarda i piccoli peptidi gli elementi strutturali più ricorrenti sono i β - e γ -turn; per i primi esistono dei tipici *pattern* di NOE e costanti di accoppiamento, che permettono di identificare il tipo di β -turn.

NMR di proteine

La spettroscopia NMR permette di studiare, attraverso l'uso di programmi di calcolo strutturali, il *folding* proteico e le regioni conosciute come domini di *unfolded*, aree molecolari non organizzate funzionalmente. Gli studi conformazionali condotti in soluzione sono preferibili, in quanto permettono di evidenziare, come precedentemente affermato, le alterazioni indotte dal mezzo chimico sulla conformazione della proteina, sulle relazioni struttura-attività, sulla solubilità. Deve però essere preso in debita considerazione che, se non progettati con un'opportuna strategia, questi studi possono risultare poco informativi: infatti, l'interconversione tra conformeri di energia paragonabile è rapida nella scala dei tempi NMR, per cui il rischio maggiore che si può presentare è quello di ottenere conformazioni prive di significato fisico. Come già sostenuto, la relativa stabilità delle conformazioni accessibili può essere sensibilmente influenzata dal mezzo impiegato: questo rappresenta il grande vantaggio degli studi in soluzione, in quanto è possibile scegliere il mezzo con caratteristiche chimico-fisiche più simili a quelle dell'ambiente biologico in cui la proteina esplica la sua attività e che, nel contempo, favorisca la presenza di strutture ordinate. Risulta così di fondamentale importanza riuscire a stabilire i criteri di scelta del solvente, anche se possono intervenire notevoli limitazioni: una di queste è rappresentata dalle dimensioni della proteina in analisi, in quanto, tramite esperimenti ^1H -NMR, è possibile studiare proteine costituite da un massimo di 250-300 residui. Da ciò deriva la necessità di ottenere un campione marcato in ^{15}N e/o in ^{13}C , che può essere ottenuto facendo produrre la proteina da organismi procarioti, quali *E. coli*, fatti sviluppare su terreni minimi contenenti $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e glucosio con ^{13}C . Un'ulteriore esigenza che può limitare lo studio di queste proteine è legata alla

necessità di ottenimento di campioni a elevata concentrazione (circa 1 mM), solubili nel mezzo di interesse e, al tempo stesso, dotati di una buona stabilità nell'arco del tempo richiesto per l'analisi.

Spettri NMR di rMOGED(His)₆

Gli spettri NMR mono e bi-dimensionali sono stati registrati dalla Prof.ssa Anna Maria D'Ursi, presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Salerno. Il tampone utilizzato per questi studi preliminari è stato il fosfato di sodio a pH 4.6.

Lo spettro monodimensionale del campione ovviamente non è in grado di fornire alcuna informazione strutturale sulla proteina, date le dimensioni della stessa; è comunque molto utile in questo stadio poiché conferma la buona purezza del campione, già anticipata dal gel elettroforetico e dallo spettro di massa, ma soprattutto indica che la proteina ricombinante è strutturata in maniera univoca, come risulta in particolare, dalla presenza di alcuni segnali caratteristici e isolati (-1.4, 0.1, 11.2 ppm) (Fig. 28).

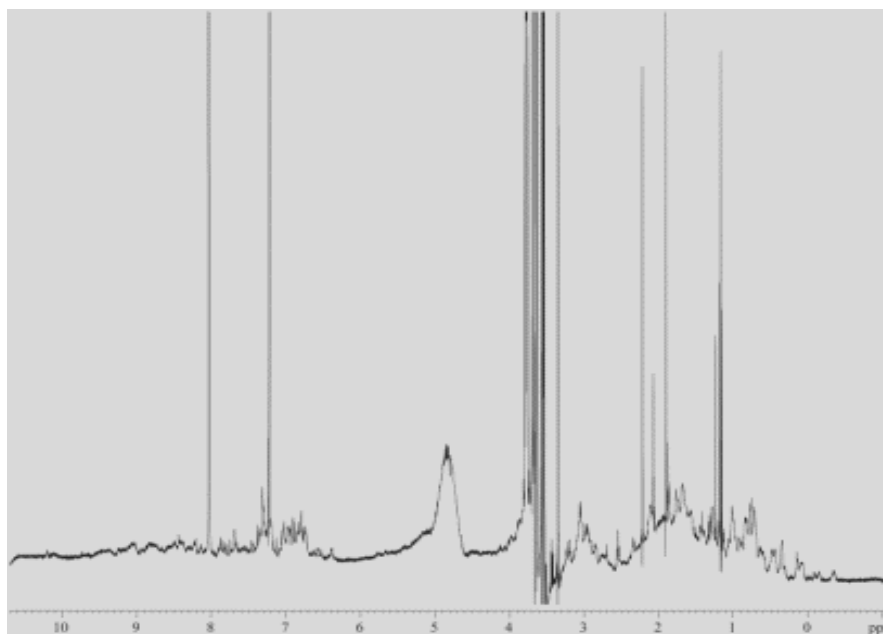


Figura 28. Spettro NMR monodimensionale.

L'intensità, l'omogeneità e la buona dispersione dei segnali nello spettro NMR bidimensionale eteronucleare $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) sono ancora buoni indizi circa la strutturazione della proteina (Fig. 29).

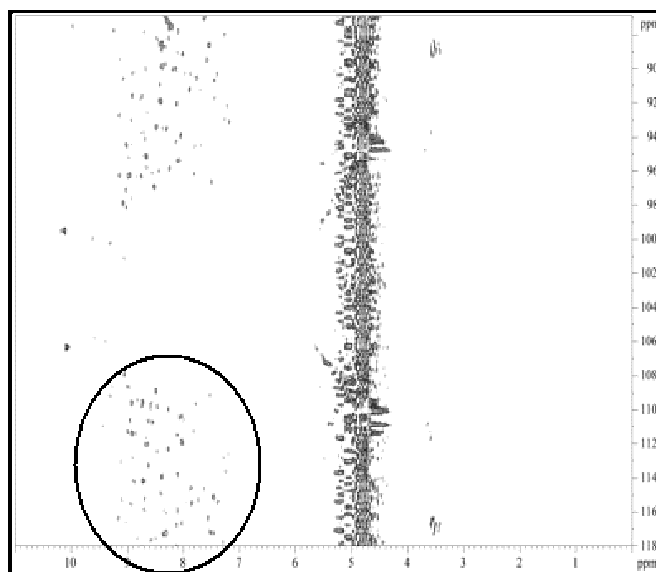


Figura 29. Spettro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC.

Lo spettro ^{15}N -HSQC mostra le correlazioni relative all'accoppiamento tra i protoni e gli atomi d'azoto marcati (^{15}N) della proteina. I dati ottenuti evidenziano la presenza dei segnali relativi agli NH a campi relativamente bassi (8,5 - 9 ppm), tipici della prevalenza nella proteina di strutture β -strand (Fig. 30).

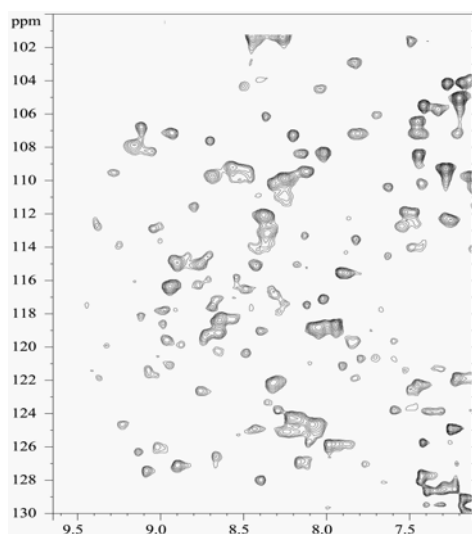


Figura 30. Spettro ^{15}N HSQC.

Lo spettro NOESY registrato evidenzia anche in questo caso la presenza oltre che degli NH, dei segnali relativi ai $\text{CH}\alpha$ a campi bassi, a conferma della presenza di struttura β . I segnali $\text{CH}\alpha$, oltre a presentare effetti NOE di tipo sequenziale (i+1), indispensabili ai fini di una buona strutturazione, presentano effetti NOE *inter-strand* (Fig. 31).

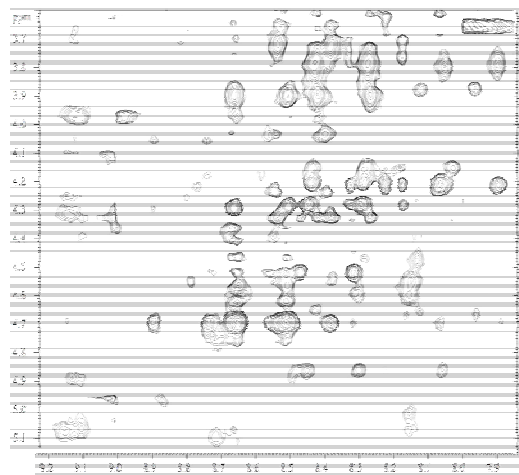


Figura 31. Spettro NOESY.

Le analisi preliminari effettuate su rMOG_{ED}(His)₆ hanno confermato la buona purezza del campione ed hanno rivelato una strutturazione della proteina con una prevalenza di strutture β -strand. Tuttavia, data la ridotta solubilità della proteina nel tampone di analisi, non è stato possibile ottenere maggiori informazioni sulla struttura della proteina.

Per risolvere questo problema è stato deciso di modificare la sequenza della proteina da studiare eliminando alcuni amminoacidi presenti in posizione N-terminale, facenti già parte del dominio transmembrana, in modo da facilitare la sua solubilizzazione e migliorare la stabilità nei tamponi necessari ad effettuare gli studi strutturali in soluzione.

3.11 Espressione e purificazione di rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ in terreni minimi

Per agevolare lo studio tramite spettroscopia NMR della conformazione in soluzione di rMOG_{ED}(His)₆ è stato deciso di modificare la sequenza della proteina eliminando il frammento di 8 amminoacidi in posizione N-terminale.

Il cDNA di rMOG_{ED} inserito nel plasmide pQE12 è costituito da:

- un segmento esterno alla cellula coinvolto nel riconoscimento anticorpale;
- una piccola coda di 8 amminoacidi che appartengono al dominio transmembrana;
- delle sequenze di amminoacidi aggiunti inserendo i siti per gli enzimi di restrizione.

In un precedente lavoro di tesi⁷⁸ la sequenza di rMOG_{ED}(His)₆ priva della porzione transmembrana è stata amplificata tramite PCR ed è stata inserita tramite reazione di taglio enzimatico e ligazione in un nuovo plasmide (pET22) (Figg. 32-34).

MRGS	GQFRVI	GPGHP	IRALV	GDEAELPCRI	SPGKNATGME
VGWYRSPFSR	VVHLYRNGKD	QDAEQAPEYR	GRTELLKESI		
GEGKVALRIQ	NVRFSDDEGGY	TCCFRDHSYQ	EEAAVELKVE		
D	PFFYWINPG	RSRS	HHHHHH		

Figura 32. Traduzione della sequenza nucleotidica della proteina rMOG_{ED}(His)₆: in blu la porzione transmembrana, in rosso la coda di sei His, in verde gli amminoacidi aggiunti inserendo i siti di restrizione nella sequenza nucleotidica.

⁷⁸ Luca De Lellis, Strategie di espressione e caratterizzazione della Glicoproteina Oligodendrocitica della Mielina, Università degli Studi di Firenze, Tesi di Laurea in Biotecnologie Farmaceutiche, A.A. 2006-2007. Relatore: Prof. Paolo Rovero.

MRGS	GQFRVI	GPGHPIRALV	GDEAELPCRI	SPGKNATGME
VGWYRSPFSR	VVHLYRNGKD	QDAEQAPEYR	GRTLLKESI	
GEGKVALRIQ	NVRFSDGGY	TCFFRDHSYQ	EEAAVELKVE	
DLE	HHHHHH			

Figura 33. Sequenza $rMOG_{ED}(1-117)(His)_6$ dopo amplificazione tramite PCR di $rMOG_{ED}(His)_6$: in rosso la coda di sei His, in verde gli amminoacidi aggiunti inserendo i siti di restrizione nella sequenza nucleotidica.

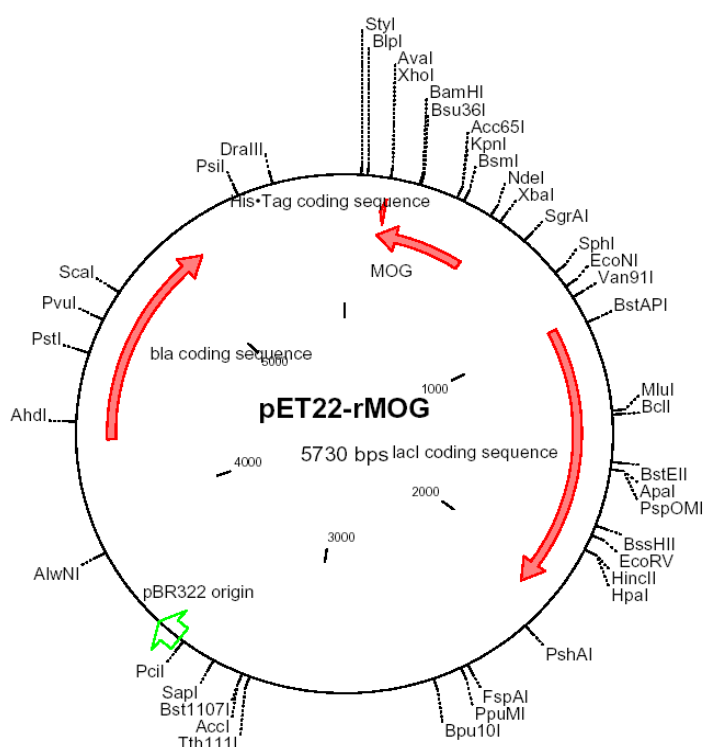


Figura 34. Plasmide $pET22rMOG_{ED}(1-117)(His)_6$.

Sono stati effettuati, successivamente, studi di stabilità di $rMOG_{ED}(1-117)(His)_6$ in soluzione, utilizzando tamponi compatibili con le spettroscopie di dicroismo circolare e NMR, al fine di comprendere quale sia il *buffer* più indicato per la conservazione e l'analisi della proteina d'interesse. La tecnica scelta per la valutazione di eventuali cambiamenti conformazionali subiti dalla

proteina durante la conservazione nel tampone è stato il dicroismo circolare, perché permette di stimare la presenza di particolari strutture secondarie e rivela le eventuali modifiche avvenute a livello di queste ultime.

Cellule elettrocompetenti di *E. coli* appartenenti al ceppo ER2566 sono state trasformate con il plasmide pET22rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ con concentrazione 0,120 µg/µl. La trasformazione è stata effettuata mediante elettroporazione. Successivamente le cellule sono state piastrare su terreno LB Agar contenente ampicillina e incubate a 37 °C per tutta la notte.

E' stato effettuato inizialmente un test di espressione in LB in quanto era la prima volta che veniva espressa questa proteina. Il controllo dell'espressione è stato effettuato tramite corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 12% (Fig. 35).

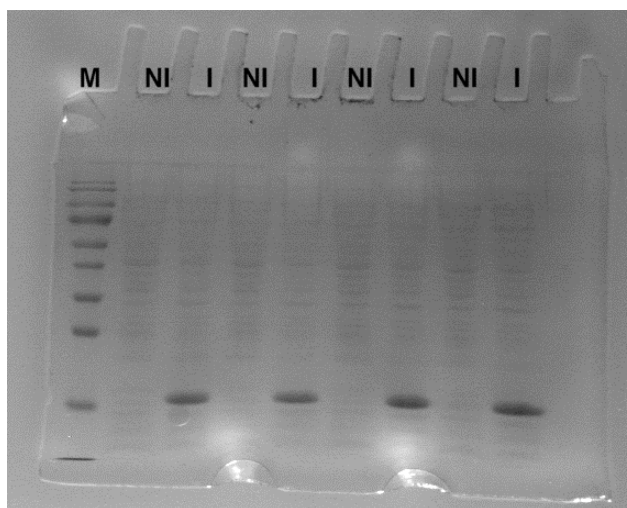


Figura 35. SDS-PAGE 12%: test di espressione di rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ in LB. M=marker; NI=non indotto; I=indotto.

Come riportato in letteratura per ottenere maggiori rese di espressione di proteine ricombinanti in terreni minimi, in modo tale da raggiungere la concentrazione necessaria per gli studi NMR, è necessario aumentare la densità cellulare attraverso una crescita iniziale delle cellule in un terreno

ricco, seguita da centrifugazione e risospensione delle cellule nel mezzo minimo.⁷⁹

Una singola colonia di *E. coli* ER2566, derivante dalla trasformazione con pET22rMOG_{ED}(1-117)(His)₆, è stata utilizzata per inoculare 100 ml di LB, contenente ampicillina; la coltura è stata incubata a 37 °C, sotto agitazione, tutta la notte.

Successivamente è stata centrifugata e parte del precipitato è stato risospeso in terreno M9 ed aggiunto ad 1 l di terreno minimo fino a quando il valore di densità ottica, misurato a 600 nm, non ha raggiunto il valore di 0,1. I batteri sono stati fatti crescere sotto agitazione a 37 °C fino a quando la densità ottica non ha raggiunto un valore compreso tra 0,5 e 0,8. Successivamente è stata indotta l'espressione di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆ tramite aggiunta di IPTG (1 mM) e incubando a 30 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆ è stata espressa nei corpi inclusi e il suo *refolding* è stato ottenuto sfruttando la necessità di purificare la proteina tramite cromatografia di affinità; è stata usata la resina *Chelating Sepharose Fast Flow* con lo ione Ni²⁺ immobilizzato su di essa.

La purificazione è stata effettuata a temperatura ambiente e ha previsto il passaggio da condizioni altamente denaturanti (guanidinio HCl 6 M) a condizioni non denaturanti, per ottenere il corretto ripiegamento di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆, e l'eliminazione degli agenti riducenti per permettere la formazione del ponte disolfuro. L'eluizione della proteina è stata effettuata utilizzando un tampone con imidazolo 0,5 M che, avendo un'affinità maggiore per lo ione Ni²⁺ rispetto alla coda di sei His della proteina ricombinante, ne ha permesso il distacco.

⁷⁹ J. Curtis-Fisk, R. M. Spencer, D. P. Weliky, Isotopically labeled expression in *E. coli*, purification, and refolding of the full ectodomain of the influenza virus membrane fusion protein, *Protein Expression and Purification*, **2008**, 61, 212-219.

3.12 Prove di stabilità e spettri di dicroismo circolare di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆

Sono state condotte prove di stabilità di rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ per determinare il tampone migliore in cui conservare la proteina per effettuare spettri CD e NMR. Poiché queste analisi non possono essere realizzate correttamente in presenza di imidazolo, la soluzione proteica derivante dalla purificazione è stata sottoposta a dialisi, al fine di eliminare completamente il tampone di eluizione.

Il tampone scelto per condurre queste prove è stato NaH₂PO₄ 20 mM, già utilizzato per gli studi effettuati su rMOG_{ED}(His)₆. Si è cercato di individuare il pH più appropriato a cui condurre l'analisi poiché era stato notato che rMOG_{ED}(His)₆ precipitava in NaH₂PO₄ 20 mM pH 4.6 dopo qualche giorno; a tale scopo sono stati preparati soluzioni di tampone fosfato aventi pH differente (4.7; 6; 8), tenendo presente che il punto isoelettrico della proteina è 6.2.

Dopo aver effettuato la dialisi per sostituire *EluBuffer* con tali soluzioni, sono stati condotti spettri CD a cadenza settimanale, per verificare il mantenimento della conformazione nativa della proteina, e a varie temperature (4 °C, 20 °C, 40 °C, 60 °C, 80 °C e nuovamente 4 °C), per determinare la stabilità nelle diverse condizioni.

Gli spettri ottenuti subito dopo la dialisi di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆ nelle varie soluzioni hanno evidenziato una caratteristica conformazione β -*sheet*, presentando un minimo tra 210 nm e 225 nm e un massimo intorno ai 200 nm; la variazione di temperatura non ha causato variazioni del minimo caratteristico, ma ha messo in evidenza una variazione della banda positiva, che decresce a temperature superiori ai 40 °C, indice dell'inizio dell'aggregazione proteica. Lo spettro ha mostrato anche che, se la proteina viene riportata alla temperatura di 4 °C, la sua struttura ritorna allo stato iniziale, indicando un'alterazione reversibile della conformazione a seguito del riscaldamento.

Il tampone fosfato 20 mM a pH 4.7 si è rivelato inadatto in quanto è stato osservato, tramite lo studio dello spettro, che la proteina subisce danni di tipo strutturale dopo due settimane (Fig. 36).

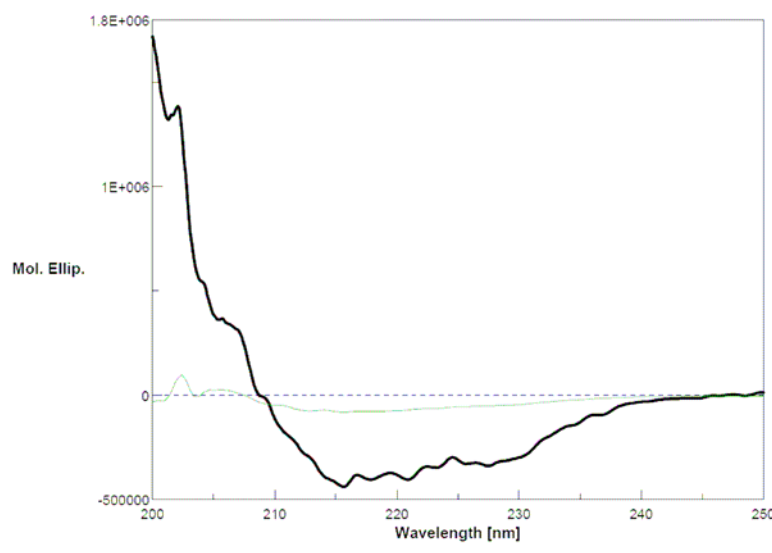


Figura 36. Spettri CD registrati a 20 °C di $rMOGED(1-117)^{15}N(His)_6$ in tampone fosfato 20 mM pH 4.7: nero, subito dopo la dialisi; verde, dopo 2 settimane.

E' stato notato che la proteina manteneva la sua conformazione nativa sia nel tampone fosfato 20 mM a pH 6 che in quello a pH 8; infatti, dopo 4 settimane di conservazione in tali tamponi, non sono stati osservati sostanziali cambiamenti negli spettri (Figg. 37, 38).

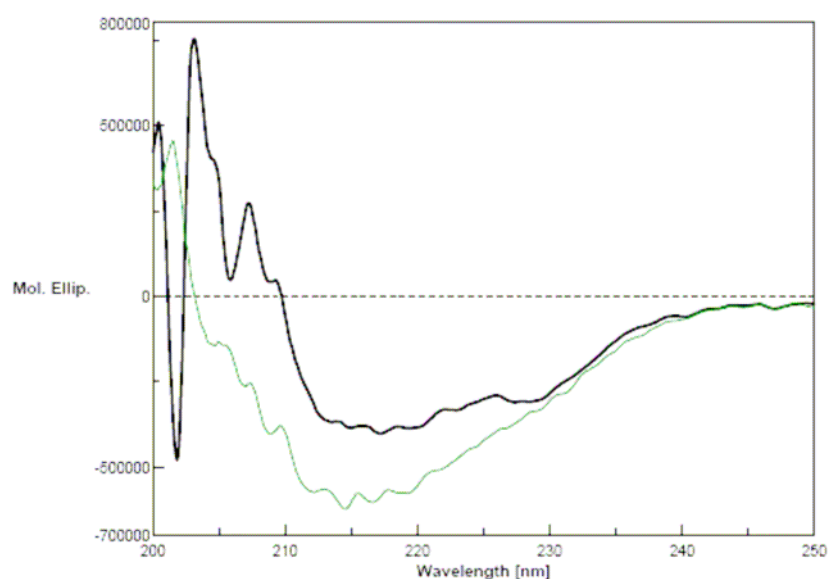


Figura 37. Spettri CD registrati a 20 °C di $rMOGED(1-117)^{15}N(His)_6$ in tampone fosfato 20 mM pH 6: nero, subito dopo la dialisi; verde, dopo 4 settimane.

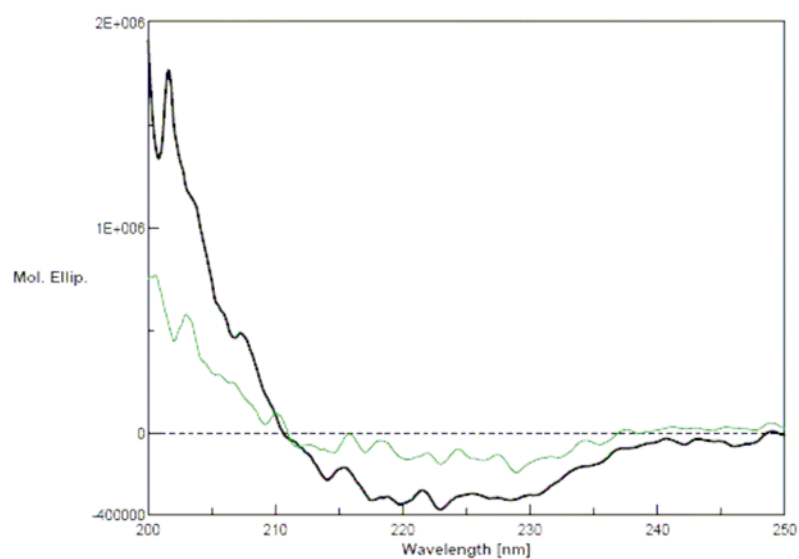


Figura 38. Spettri CD registrati a 20 °C di $rMOGED(1-117)^{15}N(His)_6$ in tampone fosfato 20 mM a pH 8: nero, subito dopo la dialisi; verde, dopo 4 settimane.

Sia il tampone fosfato 20 mM a pH 6 che quello a pH 8 si sono rivelati adeguati per le successive analisi (spettri di massa e NMR), in quanto hanno consentito una totale solubilizzazione della proteina che è risultata stabile in

questi tamponi sia nel tempo che al variare della temperatura. Tuttavia tra i due è stato scelto di utilizzare il tampone fosfato 20 mM a pH 8 poiché è adatto per poter effettuare eventuali test ELISA sulla proteina.

3.13 Spettri di massa di $rMOG_{ED}(1-117)^{15}N(His)_6$

$rMOG_{ED}(1-117)^{15}N(His)_6$ in tampone fosfato 20 mM pH 8 è stata analizzata tramite spettrometria di massa al fine di determinare l'assenza di contaminazioni e la percentuale di isotopo ^{15}N effettivamente incorporato; è stato registrato uno spettro di massa utilizzando lo spettrometro ESI Q-TOF.

Dato che il peso molecolare calcolato e quello trovato coincidono (14878 kDa) nel campione in tampone fosfato 20 mM a pH 8, è stato osservato che la proteina è pura, correttamente marcata su tutti gli N e priva di contaminazioni (Fig. 39).

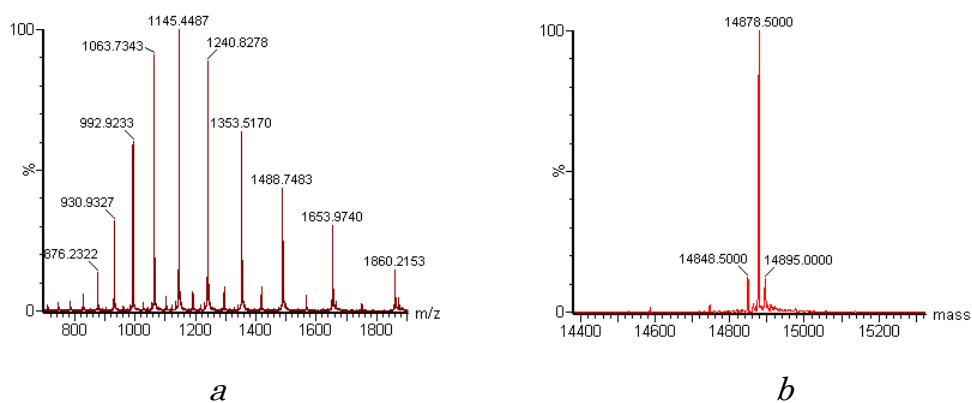


Figura 39. *a*: spettro di massa di $rMOG_{ED}(1-117)^{15}N(His)_6$ in tampone fosfato 20 mM pH 8. *b*: deconvoluto di $rMOG_{ED}(1-117)^{15}N(His)_6$.

3.14 Discussione e sviluppi futuri

In questa parte del lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata sull'espressione in *E. coli* e sulla purificazione della Glicoproteina Oligodendrocitica della Mielina al fine di ottenere informazioni sulla conformazione in soluzione e sull'utilizzo della proteina, correttamente ripiegata, come sonda antigenica per la determinazione di autoanticorpi come *biomarker* di malattia e per lo studio dell'interazione tra MOG, putativo antigene, e il corrispondente autoanticorpo.

Gli autoanticorpi, nelle funzioni di *biomarker*, rappresentano un valido aiuto nella diagnosi e nella prognosi della patologia. I saggi immunoenzimatici sono un metodo semplice ed affidabile per valutare il titolo anticorpale. Il test ELISA, utilizzato in questo lavoro di tesi, ha permesso di valutare il ruolo di MOG, considerata un possibile autoantigene per la SM, nel riconoscimento di anticorpi presenti nei sieri di malati in confronto con donatori sani.

I primi risultati ottenuti, con i test effettuati secondo il metodo messo a punto da Lolli *et al.*, hanno mostrato che non si evidenziavano sostanziali differenze tra il titolo anticorpale nei malati e nei donatori sani. Tale osservazione può essere spiegata considerando il fatto che la proteina rMOG_{ED(His)₆}, espressa in *E. coli*, risulta non glicosilata e quindi non riproduce correttamente il putativo autoantigene nativo. Inoltre è ipotizzabile che il test, essendo stato progettato per il glicopeptide CSF114(Glc), quindi per una struttura molto più piccola ottenuta tramite sintesi, non sia adatto per una proteina.

Il lavoro svolto ha riguardato, in prima analisi, l'ottimizzazione di tutti i passaggi previsti per l'ottenimento dell'espressione e della purificazione della proteina al fine di ottenere la corretta struttura e conformazione, entrambe essenziali per l'esposizione del sito di legame con l'anticorpo.

È stata quindi svolta una serie di saggi ELISA per ottimizzare il test in modo da trovare le condizioni idonee per utilizzare l'antigene proteico. È stato evidenziato che:

- diluizioni maggiori degli anticorpi (1:200 per le IgM, 1:8000 per le IgG nel protocollo base), comportano solo una lettura del titolo anticorpale più bassa, senza determinare una maggiore specificità per i pazienti;
- utilizzare come tampone di *coating* lo stesso usato per dializzare la proteina non determina importanti cambiamenti nella valutazione del titolo anticorpale. Risultati simili sono stati ottenuti nella variazione di percentuale del reagente di blocco e del tensioattivo nella soluzione di lavaggio;
- diminuire il tempo di incubazione dei sieri permette di avere una maggiore specificità per gli anticorpi dei pazienti;
- il test effettuato con la BSA con tempi di incubazione di un'ora per i sieri, non ha portato modifiche nei valori anticorpali, ma ha comunque confermato che non è necessario prolungare i tempi di incubazione per tutta la notte.

Per quanto riguarda lo studio della conformazione in soluzione di rMOG_{ED}(His)₆ gli spettri NMR mono e bi-dimensionali sono stati registrati dalla Prof.ssa Anna Maria D'Ursi, presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Salerno, in seguito ad una collaborazione stretta con il nostro laboratorio: le analisi preliminari effettuate hanno confermato la buona purezza del campione, così come già indicato da analisi con gel elettroforetico e dallo spettro di massa, ed hanno rivelato una strutturazione della proteina con una prevalenza di strutture *β-strand*.

Le analisi di dicroismo circolare effettuate registrando gli spettri a differenti temperature hanno messo in evidenza una caratteristica conformazione *β-sheet* di rMOG_{ED} presentando una variazione della banda positiva, che decresce a temperature superiori ai 40 °C, indice dell'inizio del fenomeno di aggregazione proteica, tipico di proteine aventi tale conformazione. Un aspetto di rilevante importanza messo in risalto dalle analisi condotte riguarda la capacità della proteina ricombinante di ritornare nella conformazione iniziale in seguito ad un decremento di temperatura fino al valore di 4 °C, rilevando così la stabilità della stessa.

Inoltre per facilitare lo studio tramite NMR della conformazione in soluzione di rMOG_{ED}(His)₆ è stato deciso di modificare la sequenza della proteina eliminando il frammento di 8 amminoacidi, già parte del dominio trans membrana, in modo da migliorare la solubilità della proteina nei tamponi di analisi. Pertanto è stata messa a punto l'espressione e la purificazione di rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ nel terreno M9 utilizzando il vettore pET22rMOG_{ED}(1-117)(His)₆.

Sono stati effettuati studi di stabilità di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆ in soluzione, utilizzando tamponi compatibili con le spettroscopie CD e NMR, al fine di comprendere quale fosse il *buffer* più indicato per la conservazione e l'analisi della proteina d'interesse. La tecnica scelta per la valutazione di eventuali cambiamenti conformazionali subiti dalla proteina durante la conservazione nel tampone è stata la spettroscopia CD, perché ha permesso di stimare la presenza di particolari strutture secondarie e rivelare le eventuali modifiche avvenute a livello di queste ultime. Il tampone fosfato 20 mM a pH 8 e a pH 6 si sono rivelati adeguati, in quanto possono essere utilizzati per analisi di tipo CD e NMR e consentono una totale solubilizzazione di MOG; inoltre, tramite gli spettri CD è stato osservato che la proteina è stabile in questi tamponi sia nel tempo che al variare della temperatura.

Dovranno quindi essere effettuate analisi NMR di rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ al fine di ottenere il modello strutturale della proteina.

4 PARTE B

4.1 Modificazioni post-traduzionali

La scoperta del genoma umano ha rivelato tra i 30000 e i 40000 geni nel nostro corredo genetico; tuttavia il numero dei prodotti dei geni è molto più grande a causa dei molteplici modi in cui le proteine possono essere modificate post-traduzionalmente.

Si stima che il 50-90% delle proteine del corpo umano vengano trasformate da modificazioni post-traduzionali, che avvengono all'atomo di N o a quello C terminale di una proteina o nelle catene laterali di un amminoacido singolo.

Queste modificazioni possono essere introdotte tramite reazioni mediate da enzimi, come avviene ad esempio per la glicosilazione, la fosforilazione o la metilazione, o tramite processi che possono verificarsi spontaneamente e trasformare un amminoacido in una nuova molecola, come ad esempio la deamidazione che converte un residuo di asparagina in acido aspartico. In questo modo i 20 amminoacidi naturali diventano quasi 140 amminoacidi unici.⁸⁰

La comprensione della funzione delle proteine è al centro della biologia sperimentale e richiede una completa descrizione delle modifiche post-traduzionali di una proteina e di come loro influenzano la funzione, la stabilità, la localizzazione e la struttura tridimensionale, oltre che le interazioni con le altre molecole.

La chimica ha da sempre un ruolo fondamentale nello studio dei processi biologici. Le proteine sono sempre state il maggiore obiettivo della ricerca della chimica biologica sia per capire a pieno la loro funzione biologica

⁸⁰ R. Uy, F. Wold, Posttranslational covalent modification of proteins, *Science*, **1977**, 198, 890-896.

intrinseca sia per sfruttare quella funzione per applicazioni non biologiche, come ad esempio la catalisi di reazioni chimiche non fisiologiche.

Molti approcci richiedono l'accesso a molecole proteiche impossibili da preparare usando la sintesi ribosomiale, come proteine con amminoacidi non naturali, modificati o contenenti modificazioni post-traduzionali. Infatti è estremamente difficile ottenere preparazioni omogenee di proteine modificate per studi biochimici o strutturali attraverso purificazione. Quindi la richiesta di proteine modificate specificamente ha spronato negli ultimi anni lo sviluppo di una varietà di metodologie diverse di ingegneria proteica.

La definizione di semisintesi di proteine è originalmente riferita ai processi in cui frammenti di proteine naturali, scissi tramite processi proteolitici o chimici, erano usati come *building block* per la resintesi di una proteina. Questa può essere ulteriormente allargata per includere qualsiasi processo che porta alla modificazione sito-specifica di una proteina naturale. Il più semplice di questi comporta l'introduzione, tramite una *site-directed mutagenesis*, di un residuo di cisteina in una data posizione nella proteina di interesse permettendo la selettiva derivatizzazione del gruppo sulfidrico con una sonda chimica tiolo-reattiva. Le più recenti tecniche, *nonsense suppression mutagenesis* e *Expressed Protein Ligation*, combinano la sintesi organica alla tecnologia del DNA ricombinante.

4.2 Glicosilazione

La funzione di un gene si manifesta a livello proteico attraverso la traduzione, la trascrizione e, in molti casi, le modificazioni post-traduzionali.

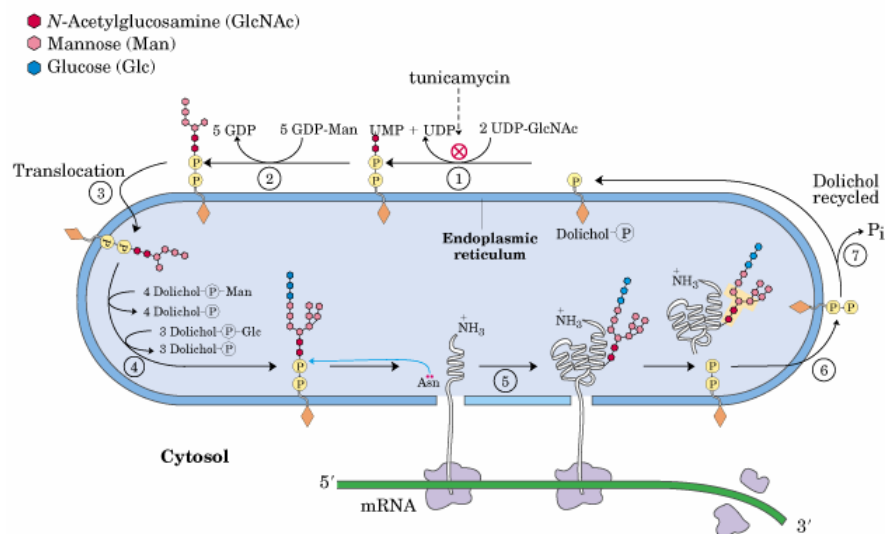
La glicosilazione è una complessa modificazione co- o post-traduzionale che espande la diversità del proteoma. Nelle glicoproteine originate da organismi eucarioti è stato identificato un vasto apparato di unità di carboidrati insieme con una varietà di legami glicoside-proteina; queste proteine sono coinvolte in una moltitudine di processi cellulari tra cui la

risposta immunitaria, il riconoscimento intercellulare, *intracellular targeting* e il corretto ripiegamento e la stabilità delle proteine.⁸¹

La glicosilazione delle proteine avviene all'interno della cellula, nel reticolo endoplasmatico (RE) e nell'apparato del Golgi, e coinvolge una serie complessa di reazioni catalizzate da enzimi quali le glicosiltransferasi e le glicosidasi, particolarmente sensibili agli altri eventi che avvengono nella cellula in cui la proteina è espressa.

Il RE è un sistema di cavità vescicolari o tubulari delimitate da membrane variamente ramificate che si estendono attraverso il citoplasma. Si distingue in RE liscio (REL) e in RE rugoso (REr), al quale sono legati i ribosomi. Il REr è il sito in cui avviene la biosintesi delle proteine di membrana, lisosomiali e di secrezione. Tutte le altre proteine sono sintetizzate nel citoplasma dai ribosomi non legati alle membrane del RE.

Molte proteine sintetizzate nel REr subiscono modificazioni post-traduzionali. Queste possono rimanere all'interno del REr come proteine di membrana, oppure essere trasportate nell'apparato del Golgi, costituito da cavità delimitate da membrane lisce prive di ribosomi, da cui si distaccano vescicole secretorie (Fig. 40).



⁸¹ A. Varki, Biological roles of oligosaccharides—all of the theories are correct, *Glycobiology*, **1993**, 3, 97–130.

Figura 40. Meccanismo di modificazione post-traduzionale nel RE.

Esistono due tipi di glicosilazione nelle proteine: la *N*-glicosilazione, in cui il primo residuo oligosaccaridico è legato ad un residuo di asparagina (Asn) mediante legame ammidico, e la *O*-glicosilazione, in cui il primo residuo oligosaccaridico è invece legato ad una serina (Ser) o ad una treonina (Thr) tramite legame etereo.

La *N*-Glicosilazione è il tipo più abbondante in natura di attacco di carboidrati alle proteine.⁸² E' un processo co-traduzionale che avviene nel REr, contemporaneamente alla sintesi della proteina da parte dei ribosomi, ed è catalizzato dalla oligosaccariltransferasi, un complesso proteico localizzato nel lumen. La reazione è altamente specifica e avviene solo al residuo Asn inserito nella sequenza di consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, dove Xaa è qualsiasi amminoacido eccetto Pro.⁸³

La *O*-glicosilazione e la maggior parte delle altre modificazioni post-traduzionali, quali la fosforilazione, la metilazione, l'ossidrilazione e la lipidazione, avvengono in varie regioni dell'apparato del Golgi. Le proteine modificate vengono quindi trasportate nelle zone di destinazione all'interno della cellula (lisosomi, membrana plasmatica e vescicole secretorie).

Le glicoproteine sono caratterizzate da un'alta eterogeneità della porzione oligosaccaridica, che risulta spesso ramificata con una prevalenza di zuccheri quali mannosio, glucosio, *N*-acetilglucosammina, acido sialico, galattosio e L-fucosio, questa volta legati tra loro tramite legami *O*-glicosidici. In genere i polisaccaridi legati all'Asn sono costituiti da un'unità centrale di due *N*-acetilglucosammine e tre residui di mannosio, che formano il primo punto di ramificazione della catena oligosaccaridica (Fig. 41).

⁸² R. G. Spiro, Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology*, **2002**, 12, 43r-56r.

⁸³ R. Kornfeld, S. Kornfeld, Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, 54, 631-664.

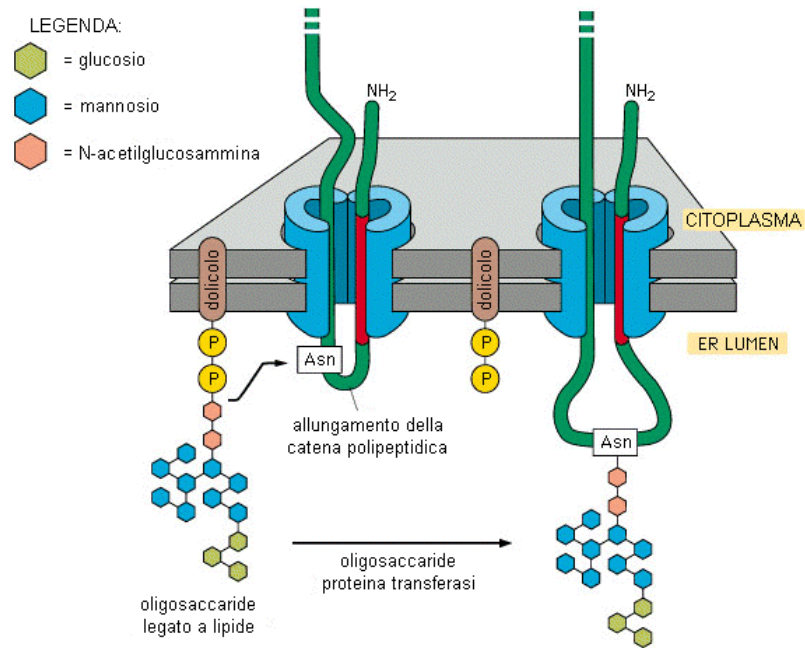


Figura 41. Glicosilazione delle proteine.

A causa della complessità degli oligosaccaridi, la glicosilazione può introdurre nelle proteine enormi differenze strutturali e, conseguentemente, ampliare l'informazione del genoma. La glicosilazione può influenzare il *folding* e migliorare il tempo di emivita biologico delle proteine aumentando la loro solubilità in acqua e inibendo la loro proteolisi e denaturazione termica.

Le proteine glicosilate sono componenti della matrice extracellulare e delle superfici cellulari e le porzioni oligosaccaridiche sono implicate in numerosi eventi di riconoscimento cellula-cellula e cellula-matrice.

Molte glicoproteine espongono agli anticorpi epitopi discontinui, i quali presentano siti di glicosilazione. E' stata messa in evidenza l'esistenza di anticorpi in grado di riconoscere solamente una specifica conformazione del frammento peptidico indotta dalla glicosilazione presente.³ Molti determinanti conformazionali, infatti, non sono più riconosciuti se viene eliminato il sito di *N*-glicosilazione; in numerosi casi l'antigenicità di epitopi glicopeptidici è da

attribuirsi alla conformazione indotta dal residuo glicosilico piuttosto che alla partecipazione di quest'ultimo nel riconoscimento antigenico.⁴

In questo contesto è evidente quanto le glicoproteine, ed in particolare eventuali difetti di glicosilazione o glicosilazioni aberranti delle proteine rispetto al loro stato nativo, risultino estremamente importanti per l'identificazione di neoantigeni, riconosciuti come *not-self*, e perciò scatenanti una risposta autoimmune. A causa di questi effetti concomitanti, risulta evidente come le glicoproteine possano influire su diversi aspetti del sistema immunitario e come proprio gli zuccheri, influenzando la struttura ed il riarrangiamento intracellulare nelle glicoproteine, possano agire sullo sviluppo, la migrazione e la risposta autoimmune.⁵

4.3 Scopo della ricerca

E' stato rilevato che la glicosilazione può rappresentare un livello di variabilità (molecolare) che è necessario per i processi complessi degli organismi superiori. Questo è evidenziato dal fatto che più del 50% delle proteine umane sono glicosilate, mentre i batteri come *E. coli* non hanno il meccanismo che permette l'introduzione di queste modificazioni.

Nonostante la straordinaria importanza delle glicoproteine, sono stati fatti lenti progressi verso la comprensione delle loro strutture e funzioni a causa della difficoltà di ottenere glicoproteine omogenee.

Poiché la glicosilazione proteica non è sotto diretto controllo genetico, questa porta alla formazione di una gamma eterogenea di glicoforme che possiedono la stessa struttura peptidica ma differiscono per la natura e il sito di glicosilazione. La produzione di proteine ricombinanti che sono *N*-glicosilate nelle forme native richiede un organismo mammifero ospite di espressione che ha la capacità di mimare la glicosilazione umana; un esempio sono le cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary*), le più usate per la produzione industriale di proteine ricombinanti utilizzate come farmaci. I procarioti come *E. coli* non

sono capaci di glicosilare le loro proteine, mentre sistemi di espressione eucariotici come i lieviti e gli insetti non sono in grado di fornire una glicosilazione come quella mammifera.

L'isolamento di glicoproteine omogenee in quantità significanti da fonti naturali è quindi impossibile con le tecniche attualmente disponibili. La sintesi chimica e enzimatica sono gli unici modi per risolvere il problema in quanto permettono di ottenere materiali ben definiti, contenenti amminoacidi non naturali o funzioni glicosidiche, per lo studio delle strutture e delle proprietà delle glicoproteine e per il loro sviluppo in ambito terapeutico.

Molti approcci puramente sintetici richiedono un accesso alle molecole proteiche impossibile da realizzare secondo la comune biosintesi ribosomiale. Altre strategie comprendono l'espressione di proteine tramite tecnologie ricombinanti contenenti amminoacidi non naturali o modificati. Questi bioconiugati sono estremamente difficili da realizzare, da purificare e soprattutto da ottenere in larga scala.

Dagli studi condotti presso PeptLab sul peptide glicosilato CSF114(Glc) è stato evidenziato come sia lo zucchero e non la sequenza peptidica ad essere importante per il riconoscimento dell'anticorpo.

Pertanto è stato deciso di ottenere la proteina rMOG_{ED}(His)₆ ricombinante glicosilata al fine di indagare l'influenza della porzione glicosidica nel riconoscimento autoanticorpale.

Per ottenere il dominio extracellulare di rMOG opportunamente glicosilato, è stato deciso di sfruttare due diverse strategie semisintetiche: la *Cys-Ligation* e l'*Expressed Protein Ligation* (EPL).^{84,85}

⁸⁴ D. Macmillan, R. M. Bill, K. A. Sage, D. Fern, S. L. Flitsch, Selective in vitro glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogeneous glycoforms of human erythropoietin, *Chem. Biol.*, **2001**, 8, 133–145.

⁸⁵ T. Muir, Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation, *Annu. Rev. Biochem.*, **2003**, 72, 249-289.

4.4 *Cys-Ligation*

La combinazione tra la *site-directed mutagenesis* e l'attacco chimico di unità saccaridiche sintetiche offre un approccio per la preparazione di glicoproteine ben strutturate.^{86,87}

Questa strategia implica l'introduzione di un residuo di cisteina (Cys) in una proteina che può essere accoppiata selettivamente con un residuo saccaridico sintetico contenente un gruppo elettrofilo. Questo approccio sfrutta il fatto che le cisteine sono presenti nelle proteine come ponti disolfuro; tuttavia può essere aggiunta una Cys in qualsiasi punto di una catena polipeptidica attraverso una mutazione puntiforme e il gruppo SH libero nucleofilo può essere fatto reagire con uno zucchero al fine di dare una neoglicoproteina. In questo modo si ha la sintesi di proteine glicosilate omogeneamente che portano alla produzione di una catena oligosaccaridica in punti di glicosilazione nativi o non naturali.

Flitsch e collaboratori hanno applicato il metodo della *Cys-Ligation* all'eritropoietina umana, un'importante glicoproteina terapeutica con tre siti di *N*-glicosilazione che sono essenziali per l'attività biologica *in vivo*.

E' stato dimostrato che l'eritropoietina, espressa in *E. coli* con specifiche mutazioni Asn→Cys ai siti naturali di glicosilazione (N24, N38, e N83), può essere glicosilata usando β -*N*-glicosil-iodoacetammide anche in presenza di due ponti disolfuro (Fig. 42). Queste scoperte forniscono le basi per un'ulteriore elaborazione della struttura saccaridica e per lo sviluppo di questa metodologia per la semisintesi di glicoproteine.

⁸⁶ B. G. Davis, Mimicking posttranslational modifications of proteins, *Science*, **2004**, 303, 480–482.

⁸⁷ Y. L. Khmelnsky, Current strategies for in vitro protein glycosylation, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2004**, 31, 73–81.

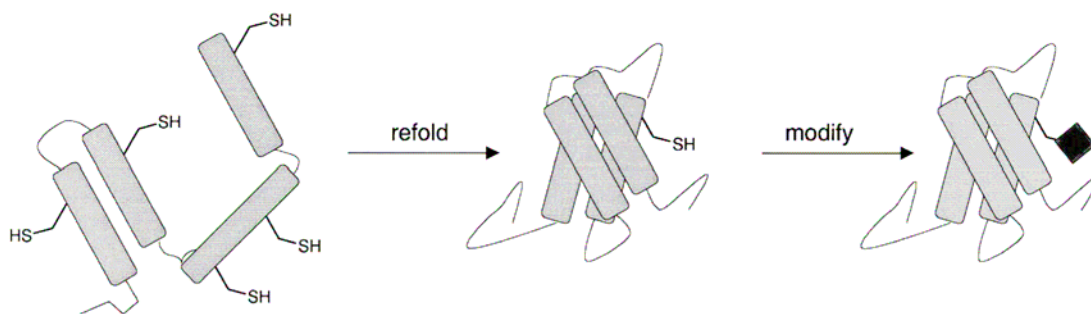


Figura 42. L'eritropoietina contenente la mutazione $Asn \rightarrow Cys$ è stata fatta reagire con β -N-glicosil-iodoacetammide dopo il refolding.

E' stato deciso di sfruttare la *Cys-Ligation* per introdurre un residuo glicosidico in posizione 31, sito nativo di glicosilazione della proteina MOG. Perciò è stata effettuata una *site-directed mutagenesis* sul plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆ con lo scopo di ottenere la mutazione $Asn \rightarrow Cys$ in posizione 31.

Nella proteina sono presenti altri due residui di Cys che si ipotizza si uniranno tra loro formando il ponte disolfuro necessario per ottenere la giusta conformazione della proteina espressa in *E. coli*.

Il nuovo residuo di Cys, invece, verrà fatto reagire con lo iodoacetammido derivato del glucosio, 1-N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio, con lo scopo di ottenere una nuova proteina aberrantemente glucosilata (Fig. 43).

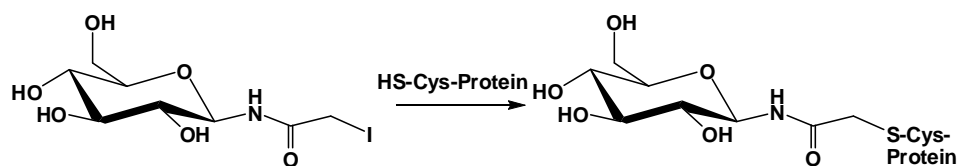


Figura 43. Reazione di *Cys-Ligation* tra rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ e 1-N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio.

Nei laboratori di Peptlab del Dipartimento di Chimica Organica è stato sintetizzato lo zucchero 1-N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio e sono state

messe a punto le condizioni di reazione utilizzando il peptide CSF114, modificato in posizione 7 con un residuo di Cys, con lo scopo di determinare le condizioni migliori per effettuare la *Cys-Ligation* su rMOG_{EDN(31)C(His)₆}.

4.5 Mutagenesi sito specifica per la sostituzione di singoli residui amminoacidici

La mutagenesi sito specifica (*site-directed mutagenesis*) è un insieme di metodi utilizzati per la produzione di mutazioni tramite delezione, inserzione o sostituzioni di basi nucleotidiche.

La tecnica di mutagenesi prevede l'utilizzo di un vettore plasmidico a doppio filamento superavvolto in cui è inserita la sequenza di DNA di interesse e due oligonucleotidi (*primer*) che agiscono da innesco, ognuno recante la mutazione desiderata e complementari fra loro. Gli oligonucleotidi vengono estesi durante cicli a diverse temperature da una DNA polimerasi, la *PfuTurbo*[®], generando un plasmide recante la mutazione.

In questo lavoro è stato utilizzato il kit *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis* commercializzato da Stratagene per introdurre la mutazione Asn→Cys in posizione 31 sul dominio extracellulare di rMOG.

Per disegnare opportuni oligonucleotidi mutagenici devono essere tenuti in considerazione alcuni parametri:

- entrambi gli oligonucleotidi mutagenici devono contenere la mutazione desiderata e devono appaiarsi alla stessa sequenza sui filamenti opposti del plasmide;
- gli oligonucleotidi devono essere lunghi da 25 a 45 basi nucleotidiche, con una temperatura di *melting* maggiore o uguale a 78 °C. Questa è la temperatura alla quale il 50% delle molecole si trova in forma di doppia elica stabile ed il restante 50% in forma di singola elica; tale proprietà è strettamente correlata al contenuto nucleotidico in Adenina-Timina (AT) (o in Guanina-Citosina, GC). Gli oligonucleotidi più lunghi di 45 basi

possono essere usati ma è aumentata la probabilità di formazione di strutture secondarie che possono influenzare l'efficienza della reazione di mutagenesi;

- la mutazione desiderata dovrebbe essere posta in mezzo agli oligonucleotidi mutagenici con circa 10-15 basi corrette da entrambi i lati;
- il contenuto minimo di GC deve essere del 40% e gli oligonucleotidi devono terminare con una o più basi C o G;
- gli oligonucleotidi non devono essere fosforilati in 5' e devono essere purificati.

Le sequenze nucleotidiche dei *primer* mutagenici che sostituiscono Asn³¹ (ATT) con Cys³¹ (TGT) nel plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆ sono le seguenti:

- rMOG_{ED}N31C forward:

5'-CTCCTGGGAAG**TGT**GCCACGGGCATG-3'

- rMOG_{ED}N31C reverse:

5'-CATGCCCGTGGC**CACTT**CCCAGGAG-3'.

La mutagenesi sito specifica è stata effettuata utilizzando un termociclatore e la DNA polimerasi *PfuTurbo*[®], che replica entrambi i filamenti plasmidici con alta fedeltà.⁸⁸

La procedura ha previsto l'utilizzo del vettore plasmidico a doppio filamento superavvolto in cui è inserita la sequenza di DNA di interesse e dei due oligonucleotidi che agiscono da innesco. Questi sono stati estesi durante cicli a diverse temperature dalla DNA polimerasi *PfuTurbo*[®] generando il plasmide con la mutazione.

Per eliminare i filamenti parentali di partenza è stato aggiunto al prodotto di reazione la endonucleasi *DpnI* (sequenza target: 5'-Gm6ATC-3'), che è in grado di riconoscere e degradare solo i filamenti di DNA parentale in base al loro stato di metilazione o di emimetilazione. In questo modo il

⁸⁸ U.S. Patent Nos. 6,183,997, 6,333,165, 6,379,553, 5,948,663, 5,866,395, 5,545,552, 6,444,428, 5,556,772 and patents pending.

prodotto della reazione mutagenica è un DNA superavvolto contenente una sequenza mutata utilizzabile per una nuova trasformazione (Fig. 44).⁸⁹

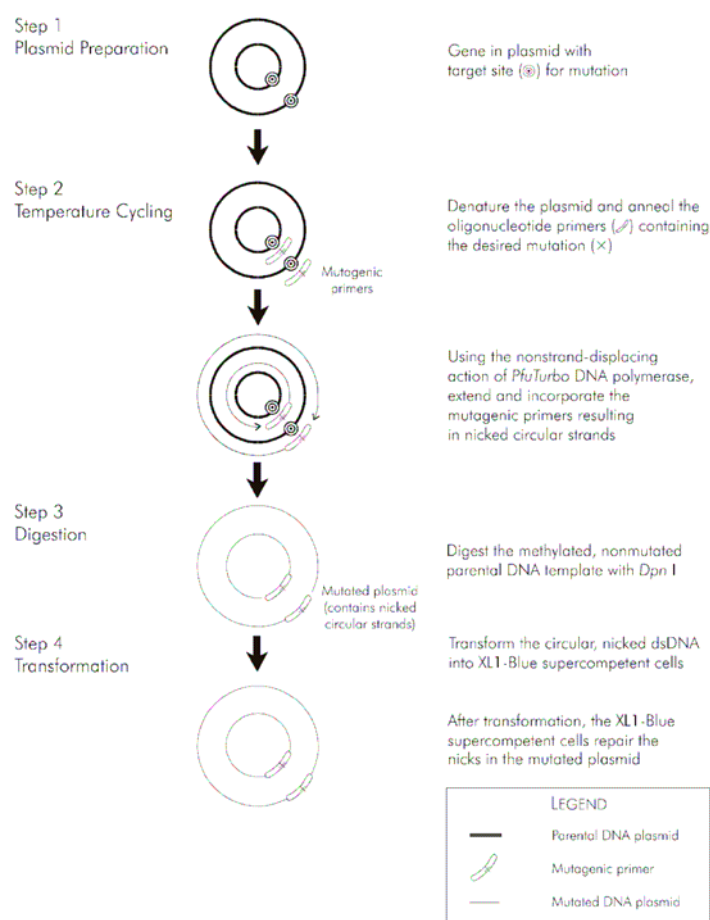


Figura 44. Schema del metodo di site-directed mutagenesis QuikChange®.⁹⁰

La piccola quantità di DNA plasmidico iniziale, l'alta fedeltà della DNA polimerasi *PfuTurbo*® e il basso numero di cicli termici permettono di ottenere un'alta efficienza di mutazione e una bassa probabilità di avere mutazioni casuali durante la reazione.

E' stato effettuato il sequenziamento del vettore pQE12rMOG_{EDN}(31)C(His)₆ per verificare se aveva effettivamente avuto luogo la sostituzione delle basi nucleotidiche.

⁸⁹ M. Nelson, M. McClelland, Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes, *Methods Enzymol*, **1992**, 216, 279–303.

⁹⁰ <http://www.stratagene.com/manuals/200518.pdf>.

Il metodo di “sequenziamento enzimatico” di *Sanger* è di gran lunga quello più usato. La reazione di sequenziamento avviene tramite la sintesi di DNA usando uno o più nucleotidi marcati ed un solo *primer* complementare ad una porzione del frammento di DNA da sequenziare. Oltre ai normali precursori deossinucleotidici (dNTP) la sintesi del DNA avviene anche in presenza di dideossinucleotidi base-specifici (ddNTP) che mancano di un gruppo ossidrile al 3' e al 2'. I ddNTP vengono incorporati senza problemi nella catena nascente di DNA ma ne arrestano un ulteriore allungamento. Il materiale viene suddiviso in quattro aliquote e vengono effettuate quattro reazioni diverse. In ognuna di queste è ovviamente presente un ddNTP diverso; di conseguenza in ognuna delle quattro aliquote la sintesi viene arrestata dopo una specifica base.

Il metodo di *Sanger* si presta all'automazione; infatti esistono oggi macchine automatiche in grado determinare le sequenze di frammenti di DNA a doppia o singolo filamento o di frammenti di PCR sfruttando la fluorescenza. Queste procedure usano *primer* (marcatura del DNA in 5') o ddNTP (marcatura del DNA in 3') legati a fluorofori diversi che emettono fluorescenza quando sono sottoposti ad una certa lunghezza d'onda. Il risultato di questa reazione produce dei frammenti di DNA nei quali le diverse basi sono identificate da quattro colori diversi ed ogni colorante reagisce alla luce emettendo una propria fluorescenza, permettendo di effettuare le quattro reazioni in una provetta unica ed il caricamento di un unico pozzetto. Durante l'elettroforesi il campione viene colpito da una sorgente luminosa (laser) ed emette una fluorescenza che viene rilevata da un sensore; il segnale elaborato da un opportuno software mostra in forma grafica a quattro colori la sequenza del DNA.

Dall'analisi dei risultati del sequenziamento è stato evidenziato che il DNA analizzato corrisponde al vettore con la tripletta modificata; quindi la mutagenesi sito specifica è avvenuta (Fig. 45).

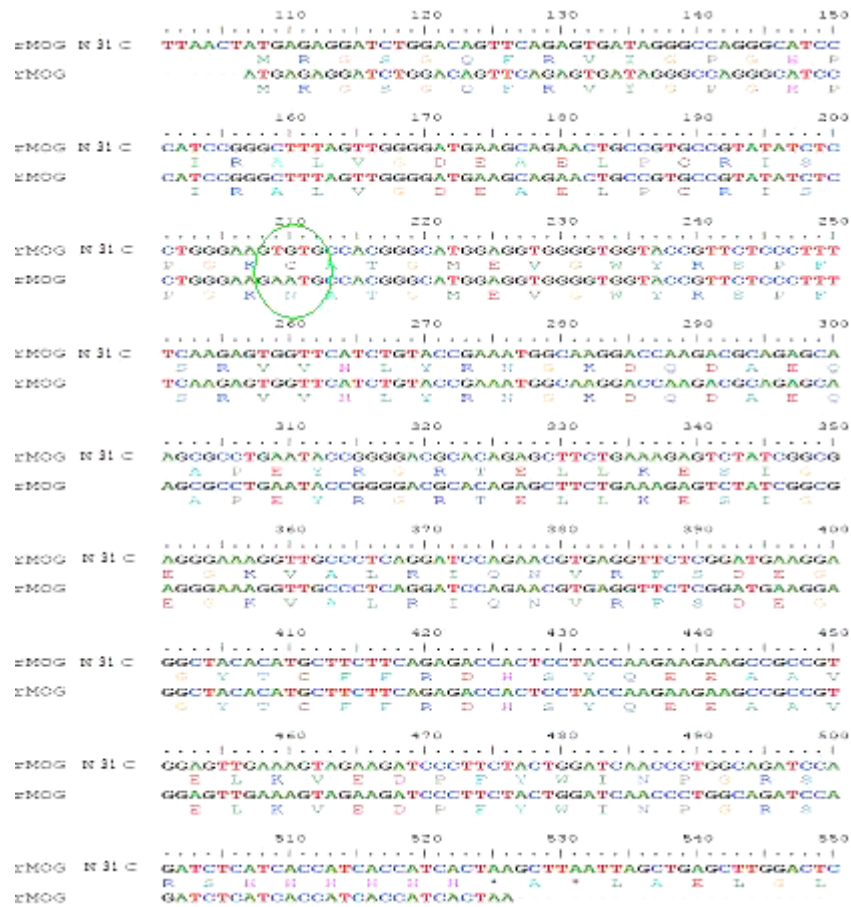


Figura 45. Allineamento tra $rMOG_{ED}(His)_6$ e $rMOG_{ED}N(31)C(His)_6$.

4.6 Espressione e purificazione di $rMOG_{ED}N(31)C(His)_6$

Cellule elettrocompetenti di *E. coli* appartenenti al ceppo ER2566 sono state trasformate con i plasmidi pQE12 $rMOG_{ED}N(31)C(His)_6$ e pREP4, entrambi con concentrazione 0,120 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La trasformazione è stata effettuata mediante elettroporazione. Una volta che è stata ottenuta la trasformazione, le cellule sono state piastrare su terreno LB Agar contenente ampicillina e kanamicina e incubate a 37 °C per tutta la notte.

E' stata utilizzata una singola colonia derivante dalla trasformazione per inoculare 10 ml di terreno LB contenente ampicillina e kanamicina; la coltura è stata incubata a 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

Un'aliquota di 1 ml della precoltura così ottenuta è stata quindi usata per inoculare 1 litro di LB contenente ampicillina e kanamicina. I batteri sono stati fatti crescere sotto agitazione a 37 °C fino a quando la densità ottica misurata a 600 nm non ha raggiunto un valore compreso tra 0,5 e 0,8. Successivamente è stata indotta l'espressione di rMOG_{EDN}(31)C(His)₆ tramite aggiunta di IPTG in concentrazione finale 1 mM e incubando a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

rMOG_{EDN}(31)C(His)₆ è stata espressa nei corpi inclusi e il suo *refolding* è stato ottenuto sfruttando la necessità di purificare la proteina tramite cromatografia di affinità; è stata usata la resina *Chelating Sepharose Fast Flow* con lo ione Ni²⁺ immobilizzato su di essa.

La purificazione è stata eseguita a temperatura ambiente e ha previsto il passaggio da condizioni altamente denaturanti (guanidinio HCl 6 M) a condizioni non denaturanti, per ottenere il corretto ripiegamento di rMOG_{EDN}(31)C(His)₆, e l'eliminazione degli agenti riducenti per permettere la formazione del ponte disolfuro. L'eluizione della proteina è stata effettuata utilizzando un tampone contenente imidazolo 0,5 M che, avendo un'affinità maggiore per lo ione Ni²⁺ rispetto alla coda di sei His della proteina ricombinante, ne ha permesso il distacco.

Il controllo dell'espressione e della purificazione è stato effettuato tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% dove è possibile vedere principalmente le macchie dovute alla proteina, indice della sua purezza. Dal gel è possibile constatare, a causa delle diverse intensità del *Blu di Coomassie*, come durante la purificazione si perdano notevoli quantità di proteina (Fig. 46).

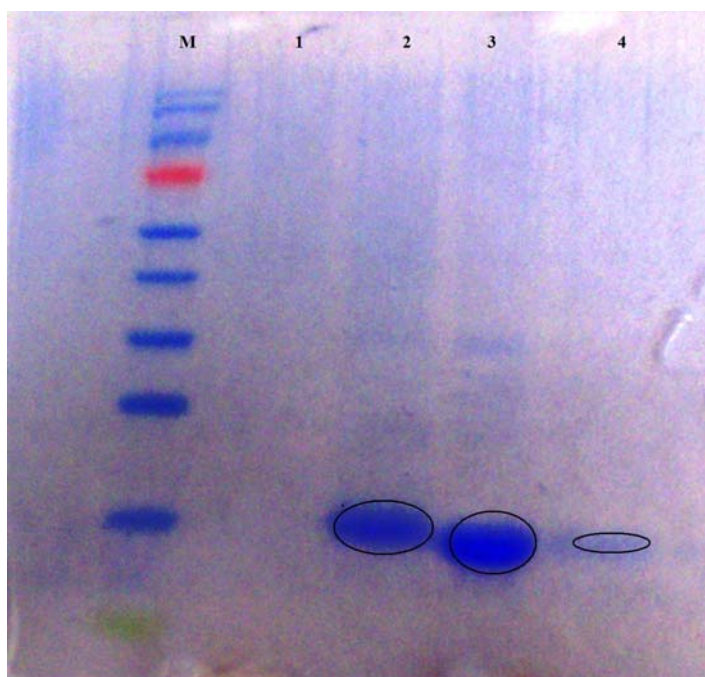


Figura 46. SDS-PAGE 12. M: marker, 1: campione da LB non indotto, 2: campione da LB indotto, 3: corpi inclusi, 4: campione eluito.

Sono stati registrati spettri di massa di rMOG_{EDN(31)C(His)₆} purificata tramite cromatografia di affinità utilizzando lo spettrometro ESI Q-TOF Micromass (Waters).

Il peso molecolare trovato sperimentalmente (15885 Da) conferma il peso molecolare calcolato teoricamente, convalidando l'identità della proteina (Figg. 47, 48).

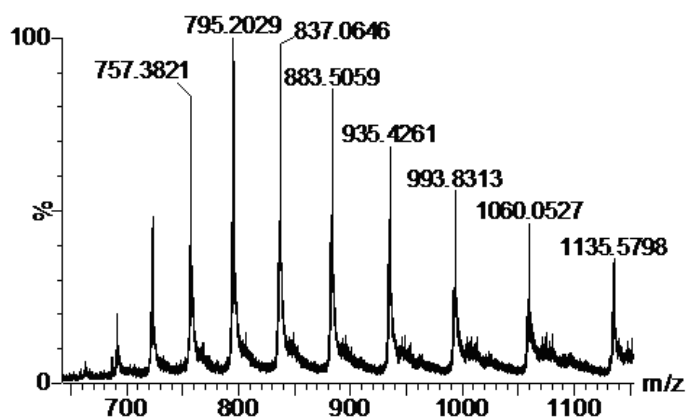


Figura 47. Spettro di massa di *rMOGEDN(31)C(His)*₆.

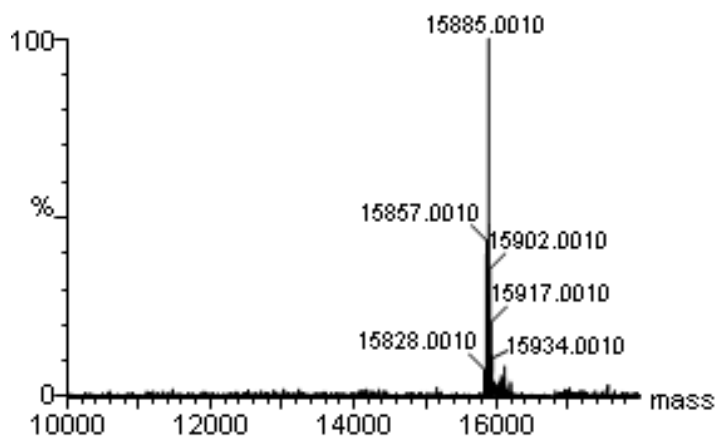


Figura 48. Deconvoluto di *rMOGEDN(31)C(His)*₆.

4.7 Valutazione dei gruppi solfidrici liberi tramite il reagente di Ellman

Il reagente di Ellman, il 5,5'-ditiobis(acido 2-nitrobenzoico) o DTNB, è un reagente chimico utilizzato per determinare i gruppi solfidrici liberi.⁹¹

La procedura si basa sulla reazione del tiolo con DTNB a dare la miscela del disolfuro e dell'acido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), che ionizzando a TNB²⁻ in

⁹¹ G. L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 82, 70–77.

acqua a pH neutro e basico colora di giallo la soluzione. I gruppi solfidrici liberi vengono quantificati misurando l'assorbanza del dianione a 412 nm.

E' stata preparata una soluzione madre di L-cisteina cloridrata monoidrata e da questa sono state fatte una serie di diluizioni per ottenere le soluzioni standard contenenti una quantità di L-cisteina cloridrata monoidrata compresa tra 0,4-0,04 mg/ml.

In ogni cuvetta sono stati messi 50 μ l di soluzione standard, sono stati aggiunti 100 μ l di acqua, 750 μ l di DNTB *Buffer* e il reagente DNTB (1mg/1ml). Le cuvette sono state agitate ed è stata misurata quindi l'assorbanza a 412 nm.

E' stato riportato in grafico in ascissa la concentrazione misurata in mg/ml e in ordinata il valore dell'assorbanza ottenendo così una retta, la cui equazione, dopo aver misurato le assorbanze di campioni incogniti, ha permesso di calcolare la concentrazione delle cisteine libere.

La quantità di zucchero occorrente per la reazione di glicosilazione è stata così calcolata non in base alla concentrazione presente in soluzione della proteina ma in funzione della quantità effettiva di gruppi solfidrici liberi.

4.8 Reazione di glicosilazione tra rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ e 1-N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio

Attraverso la *site-directed mutagenesis* è stato possibile introdurre con successo una singola mutazione (Asn→Cys) a livello del sito nativo per il legame N-glicosidico.

Il nuovo residuo di Cys è stato fatto reagire con lo iodo-acetammido derivato del glucosio con lo scopo di ottenere una nuova proteina aberrantemente glicosilata.

Nei laboratori di PeptLab del Dipartimento di Chimica Organica è stata fatta una prima prova di reazione sul peptide [(Cys)⁷]CSF114 seguendo le

condizioni di Flitsch e coll., secondo cui la presenza di imidazolo nel tampone di reazione è in grado di favorire la glicosilazione selettiva sulla cisteina.⁸⁴

Il peptide è stato sciolto in *EluBuffer* e, dopo aver portato il pH ad 8, è stato aggiunto 1-N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio. La reazione è stata controllata tramite UPLC-ESIMS dopo 48 ore ottenendo una bassa resa del prodotto.

È stata effettuata una seconda prova di reazione in H₂O che ha condotto a rese migliori (45%).

Le stesse procedure di reazione sono state applicate alla proteina. In un primo tempo rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ è stata fatta reagire nel tampone di eluizione (*EluBuffer* pH 8) con un eccesso di 500X di zucchero; tuttavia dopo 48 ore, all'analisi effettuata tramite ESI Q-TOF Micromass, non è stata evidenziata nessuna variazione della massa iniziale di rMOG_{ED}N(31)C(His)₆.

Successivamente è stata effettuata un'ulteriore prova in un tampone diverso, tenendo presente che a pH 7 rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ precipita irreversibilmente avendo un punto isoelettrico di 7.4. È stato scelto il tampone fosfato 20 mM a pH 8 in quanto, dopo prove di stabilità, rMOG_{ED}(His)₆ è risultata stabile in questa soluzione.

Dopo aver effettuato la dialisi di rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ eluita nel tampone fosfato 20 mM a pH 8, la reazione è stata ripetuta utilizzando un eccesso 500X di N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio.

Sono stati effettuati controlli tramite spettrometria di massa ESI Q-TOF al fine di verificare l'andamento della reazione e dopo 48 ore è stata rilevata la comparsa di un picco di massa corrispondente al prodotto di reazione. L'estrema complessità dello spettro ottenuto ha suggerito tuttavia la presenza di una miscela di prodotti da cui l'addotto dovrà essere purificato (Fig. 49).

Ulteriori tentativi di reazione dovranno pertanto essere effettuati per ottenere il prodotto puro e con rese migliori.

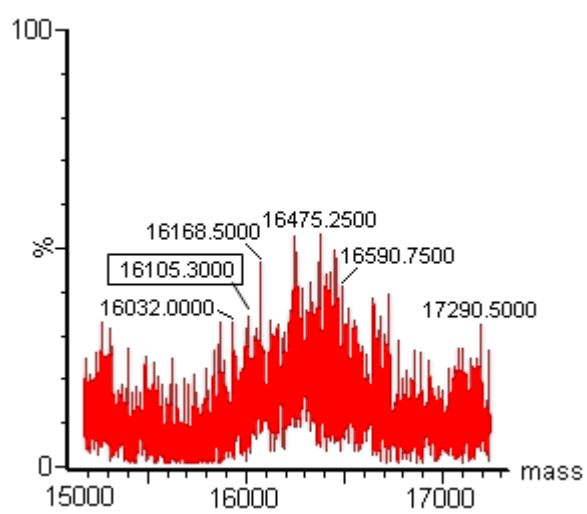


Figura 49. Zoom del deconvoluto nel range di massa di interesse.

4.9 *Native Chemical Ligation*

Metodi per la modificazione di proteine tramite l'introduzione di nuove funzionalità chimiche e per la preparazione di campioni omogenei di proteine contenenti modificazioni post-traduzionali sono fondamentali per determinare le relazioni struttura-funzione delle proteine e le interazioni proteina/proteina.

La *Native Chemical Ligation* (NCL) è una reazione chemoselettiva che unisce frammenti peptidici tramite un legame ammidico nativo permettendo di ottenere proteine modificate in quantità sufficienti per effettuare studi biofisici e biochimici. La NCL è stata utilizzata per la prima volta nel 1994 con la sintesi di una catena polipeptidica di 72 residui.⁹²

Questa reazione può essere condotta tra frammenti peptidici completamente deprotetti in soluzione acquosa permettendo al frammento modificato di essere incorporato nella proteina desiderata. I requisiti per la reazione sono un frammento N-terminale contenente un α -tioestere C-terminale e un frammento C-terminale con un residuo di Cys in N-terminale.

Il primo passaggio della NCL prevede una transtioesterificazione reversibile, ovvero una reazione chemoselettiva che avviene a pH fisiologico tra il peptide contenente Cys in N-terminale e il peptide contenente un gruppo α -tioestere. Questa reazione iniziale è seguita da uno spontaneo *shift* intramolecolare di un acile da un atomo di zolfo ad uno di azoto che genera un legame ammidico nel punto di unione tra i due frammenti (Fig. 50).

⁹² P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, **1994**, 266, 776–777.

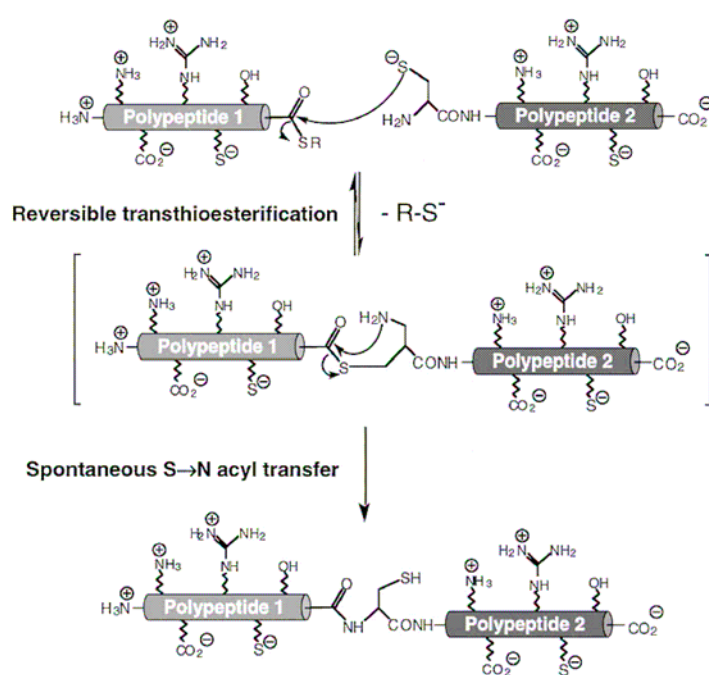


Figura 50. Schema della NCL.

La formazione dell'intermedio di reazione non è mai stata osservata, quindi è stato supposto che il passaggio limitante la cinetica della reazione sia proprio la transthioesterificazione. Per questa ragione normalmente la reazione viene condotta in presenza di additivi tiolici che impediscono l'ossidazione della Cys e catalizzano la reazione generando tioesteri più reattivi.⁹³

Un'altra caratteristica importante della NCL è la sua compatibilità con la presenza di residui di Cys interni alla sequenza e deprotetti in entrambi i frammenti peptidici. Infatti lo scambio tioestereo è completamente reversibile e lo *shift* S \rightarrow N dell'acile avviene solo con la Cys terminale dando un prodotto stabile termodinamicamente e mostrando la natura chemoselettiva della reazione.

L'aggiunta di agenti solubilizzanti, come urea o guanidinio HCl, non influenza la reazione di *ligation* e può essere sfruttata per aumentare la

⁹³ P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4325-4329.

concentrazione dei frammenti peptidici in soluzione e condurre così a rese più elevate.

Particolare attenzione nel disegno dei frammenti per la NCL è da porre nella scelta di un sito di legame, cioè Xaa-Cys. Poiché tramite sintesi peptidica in fase solida (SPPS) non è possibile sintetizzare peptidi contenenti più di 40-60 residui per difficoltà intrinseche a questa metodologia, i punti di legame devono cadere all'interno di queste dimensioni dall'N o dal C-terminale della proteina di interesse. In molti casi i residui di Cys sono presenti naturalmente nella posizione giusta; tuttavia, in assenza di questi è possibile introdurli al posto di un residuo non indispensabile, che può essere selezionato basandosi sulla conoscenza della struttura o della funzione della proteina.

Un altro fattore da considerare è l'effetto del residuo C-terminale del frammento contenente l' α -tioestere, cioè di Xaa-SR, sulla reazione di legazione. E' riportato che tutti i 20 amminoacidi naturali sono compatibili con essa, ma le cinetiche di reazione differiscono drammaticamente in base alle proprietà dei residui.⁹⁴ Val, Ile e Pro reagiscono lentamente, mentre Asp e Glu come residui C-terminali sono meno favorevoli a causa della formazione di prodotti secondari.⁹⁵

Il passaggio limitante nella NCL è la generazione del tioestere. Sono stati sviluppati molti metodi che utilizzano la SPPS, alcuni dei quali sfruttano la strategia Boc/Bzl poiché il tioestere non è stabile alle condizioni basiche impiegate nel passaggio di deprotezione durante la strategia Fmoc/*t*Bu. Tuttavia sono stati effettuati molti tentativi per permettere di ottenere il peptide con il tioestere senza utilizzare le dure condizioni della Boc/Bzl. L'uso di condizioni più deboli è particolarmente importante per la sintesi di glicopeptidi e fosfopeptidi tioesterei in quanto i legami glicosidici e fosforilici sono instabili all'HF anidro richiesto per il *cleavage* del peptide nella Boc-SPPS.

⁹⁴ T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 10068–10073.

⁹⁵ M. Villain, H. Gaertner, P. Botti, Native chemical ligation with aspartic and glutamic acids as C-terminal residues: scope and limitations, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 17, 3267–3272.

4.10 *Expressed Protein Ligation*

La NCL è limitata ad utilizzare frammenti peptidici non più lunghi di 50 amminoacidi, rivelandosi utile solo per la sintesi di piccole proteine e domini proteici, ma non è mai stata estesa fino alla sintesi di proteine oltre i 15 KDa. Un modo per superare tale limitazione è quello di legare chimicamente piccole sequenze sintetiche a più grandi frammenti proteici ricombinanti.

Nel 1998 è stata introdotta l'*Expressed Protein Ligation* (EPL), un approccio di ingegneria proteica che permette a polipeptidi ricombinanti e sintetici di essere uniti in maniera chemoselettiva e regioselettiva.^{96,97}

L'EPL si basa sul *protein splicing*, un processo post-traduzionale in cui una proteina precursore subisce una serie di riarrangiamenti intramolecolari con l'obiettivo di rimuovere il frammento interno, inteina, e legare i due frammenti esterni, esteina.

Lo *splicing* non necessita di sequenze particolari in entrambe le esteine contrariamente alle inteine che, invece, sono caratterizzate da alcuni residui chiave che permettono di catalizzare il riarrangiamento intramolecolare che determina la loro eliminazione. La prima inteina è stata scoperta nel 1987 e fino ad oggi più di 100 inteine sono state identificate e classificate.^{98,99}

Le inteine contengono un residuo di Cys o Ser in posizione N-terminale (posizione 1), un residuo di Asn alla posizione C-terminale e un residuo di Cys, Ser o Thr nella prima posizione della C-esteina (posizione +1) (Fig. 51).

⁹⁶ K. Severinov, T. W. Muir, Expressed Protein Ligation, a novel method for studying protein-protein interactions in transcription, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 16205–16209.

⁹⁷ T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, Expressed protein ligation: a general method for protein engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1998**, 95, 6705–6710.

⁹⁸ www.neb.com/neb/inteins.html

⁹⁹ F. B. Perler, InBase, the Intein Database, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 383-384.

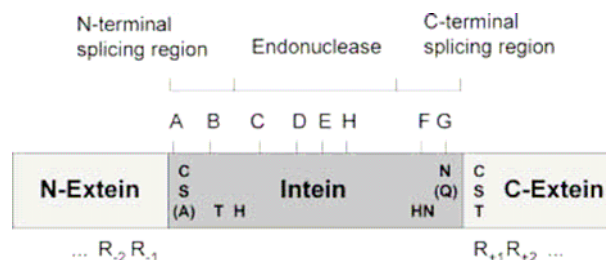


Figura 51. Struttura di una inteina.

Il primo passaggio del *protein splicing* prevede un trasferimento di un acile dall'atomo di N a quello di S attraverso il quale la N-esteina è trasferita al gruppo SH della Cys in posizione 1. Sebbene questo passaggio sia sfavorito termodinamicamente, la struttura dell'intaina lo catalizza distorcendo il legame ammidico mobile in una conformazione a energia maggiore e quindi facendo in modo da spingere l'equilibrio verso il (tio)estere.

Successivamente la N-esteina è trasferita ad un residuo in posizione +1 attraverso un processo di transtioesterificazione che permette di avere il legame tra le due esteine. L'intermedio che ne risulta subisce una reazione di ciclizzazione che coinvolge il residuo di Asn al C-terminale dell'intaina, che viene così eliminata come succinimide.

Nel passaggio finale avviene la formazione del legame ammidico tra le due esteine come risultato di uno spostamento S→N di un acile (Fig. 52).

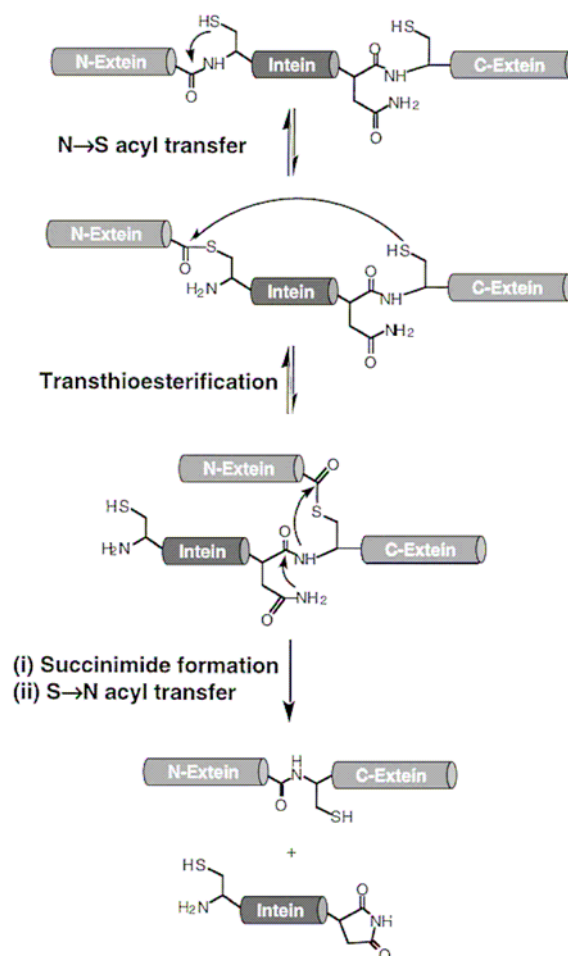


Figura 52. Meccanismo del protein splicing.

Sebbene il ruolo biologico del *protein splicing* non sia ancora ben noto, questo processo è stato sfruttato ampiamente per ottenere frammenti tioesterei ricombinanti. Infatti le inteine sono state modificate introducendo al posto di Asn un residuo di alanina (Ala) che permette di ottenere un legame tioestereo nel passaggio iniziale riguardante lo spostamento N→S ma impedisce la successiva formazione della succinimide: l'aggiunta di tioli esogeni porta al rilascio della N-esteina come il corrispondente tioestere C-terminale.¹⁰⁰

¹⁰⁰ S. Chong, Y. Shao, H. Paulus, J. Benner, F. B. Perler, M. Q. Xu, Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions

Le inteine modificate sono ottenute dai geni di *Mycobacterium xenopi* (Mxe GyrA), *Saccharomyces cerevisiae* (Sce VMA), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth RIR1) e *Synechocystis sp.PCC6803* (Ssp DnaB).

Il sistema di purificazione IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag), commercializzato da New England Biolabs (NEB), permette l'isolamento tramite un'unica colonna dei tioesteri di proteine sfruttando l'attività di *self-cleavage*, indotta da un tiolo, di varie inteine (Fig. 53).¹⁰¹

In questo sistema il gene di interesse viene clonato in un vettore di espressione immediatamente all'N-terminale del gene dell'intaina modificata comportandosi così come una N-esteina. Un dominio di legame della chitina (*chitin binding domain*, CBD) da *Bacillus circulans* è clonato al C-terminale dell'intaina funzionando a sua volta come C-esteina e permette l'immobilizzazione del costrutto finale su una resina di chitina e la purificazione per affinità. Perciò la struttura data da proteina-intaina-CBD viene espressa e isolata dalle altre proteine cellulari attraverso il legame alla resina e, dopo induzione del *self-cleavage* con un eccesso di tiolo ed incubazione, la proteina di interesse può essere eluita come tioestere C-terminale dalla resina di chitina.

leading to protein cleavage, and establishment of an *in vitro* splicing system, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 22159–22168.

¹⁰¹ S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element, *Gene*, **1997**, 192, 271–281.

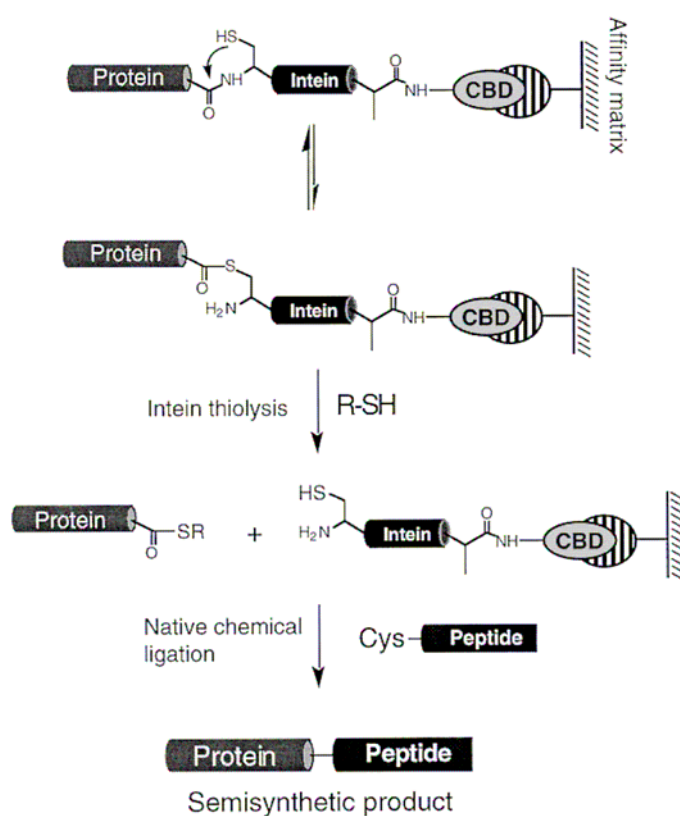


Figura 53. Sistema di purificazione IMPACT™.

Per ottenere la tiolisi delle proteine fuse all'inteine sono stati indagati numerosi tioli. La scelta di un particolare tipo di tiolo dipende dall'accessibilità della tasca catalitica del dominio di *splicing* e dalle proprietà della proteina di interesse. In generale i tioli dovrebbero essere piccole molecole nucleofile che possano entrare nella tasca catalitica in modo da attaccare il legame tioestereo che connette l'esteina all'intaina. Inoltre deve essere tenuto in considerazione che il frammento tioestereo ottenuto deve essere stabile all'idrolisi per essere isolato e reattivo nell'EPL. I tioesteri alchilici sono abbastanza stabili all'idrolisi ma non sono molto reattivi; miscele di alchiltioli e tiofenolo o l'acido 2-mercaptoetansulfonico (MESNA) aumentano la reattività. Se non c'è la necessità di isolare il tioestere, possono essere usati MESNA o tiofenolo direttamente per l'induzione del distacco e per la successiva reazione.

Il frammento ricombinante α -tioestere può successivamente reagire con il peptide contenente Cys in N-terminale *via* NCL dando il prodotto semisintetico.

La sintesi dei peptidi contenenti un residuo di Cys in N-terminale è piuttosto semplice tramite SPPS e non richiede ulteriori manipolazioni. Per ottenere frammenti più lunghi il cDNA delle proteine può essere clonato in vettori di espressione commerciali che permettono il distacco della α -Cys-proteina cambiando il pH o la temperatura. Lo svantaggio nell'uso di questo metodo è il possibile distacco spontaneo dell'intaina.

Pertanto l'EPL è la versione semisintetica della NCL in cui uno o entrambi i reagenti sono proteine ricombinanti; questo metodo unisce i vantaggi dell'ingegneria genetica e della sintesi chimica e permette l'introduzione sito specifica di amminoacidi non naturali o dotati di modificazioni post-traduzionali e di sonde chimiche o biofisiche in grandi proteine.

L'EPL può essere effettuata direttamente sulla resina di chitina e la tiolisi e la ligazione possono avvenire simultaneamente; tuttavia è svantaggioso se sono necessari agenti solubilizzanti per la ligazione, come urea e guanidinio HCl, perché denaturano il CBD a concentrazioni maggiori di 2 M. Alternativamente, il tioestere può essere eluito e la ligazione può essere effettuata in un secondo passaggio; in questo caso detergenti, urea o guanidinio HCl possono essere usati in concentrazioni elevate per aumentare la solubilità dei peptidi portando a più alte rese di reazione.

Nel caso in cui debbano essere modificati più amminoacidi all'interno di una sequenza proteica, questa può essere suddivisa in tre o più frammenti effettuando due o più passaggi di ligazione.

Sulla base di ciò è stato pensato di ottenere il frammento ricombinante rMOG_{ED}(1-97) come tioestere C-terminale utilizzando il sistema IMPACT™ e di sintetizzare il frammento rMOG_{ED}(98-117) sostituendo His¹⁰³ con Gly e Ser¹⁰⁴ con Asn(Glc) introducendo, in questo modo, una modificazione post-traduzionale. La scelta di inserire un sito di glucosilazione nella sequenza 98-

117 di rMOG_{ED} è stata dettata dal fatto che gli studi sulla sua struttura ai Raggi X hanno mostrato che proprio in questa zona la proteina assume una conformazione a *β-hairpin* simile a quella del glicopeptide CSF114(Glc) in soluzione.⁴¹ Da qui la necessità di ottenere una proteina aberrantemente glucosilata in posizione 104 da poter essere testata in saggi ELISA.

4.11 Ottenimento del plasmide pTXB1rMOG_{ED}(1-97)

Al fine di ottenere il frammento ricombinante rMOG_{ED}(1-97) come tioestere C-terminale è stato necessario inserire la sua sequenza nucleotidica all'interno di un particolare vettore, acquistato da NEB.

Il plasmide pTXB1 è costituito da 6,706 paia di basi ed è disegnato per permettere l'espressione, la purificazione e la ligazione di proteine ricombinanti utilizzando il sistema IMPACT™ (Fig. 54). Esso contiene:

- un sito di clonaggio multiplo (*multiple cloning site*, MCS) posizionato in modo tale da permettere la fusione traduzionale dell'intaina *Mxe GyrA* al C-terminale del proteina clonata;
- il CBD, legato al C-terminale dell'intaina;
- le origini di replicazione pMB1, da pBR322, e M13 (ori);
- il promotore T7, che controlla la trascrizione del gene legato;
- il gene lacI che codifica per la proteina repressore dell'operone lattosio;
- il gene per la resistenza all'ampicillina (Ap);
- siti di taglio unici per particolari enzimi di restrizione.

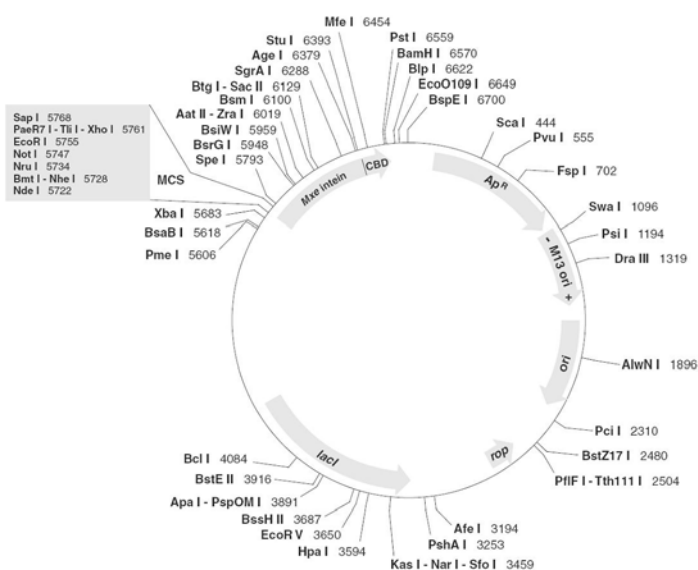


Figura 54. Plasmide pTXB1.

Desiderando ottenere una traduzione della proteina corrispondente alla porzione 1-97 di rMOG_{ED}, è stato necessario amplificare questo frammento utilizzando la tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e il plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆.

La *Polymerase Chain Reaction* è una tecnica che prevede l'amplificazione di una sequenza di DNA di cui si conoscono le sequenze agli estremi del frammento.¹⁰² Per realizzarla si ha bisogno di:

- una sequenza da amplificare;
- i deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), come dATP, dCTP, dGTP, dTTP;
- due sequenze oligonucleotidiche complementari agli estremi del cDNA da amplificare;
- una DNA polimerasi estratta da un termofilo, in grado di non denaturarsi ad alte temperature;

¹⁰² K. B. Mullis, F. A. Faloona, S. J. Scharf, S. K. Saiki, G. T. Horn, H. A. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **1986**, 51, 263-273.

- dei tamponi opportuni;
- la presenza dello ione Mg^{2+} per il corretto funzionamento dell'enzima.

La PCR avviene in una serie di cicli composti da tre fasi (Fig. 55):

- una prima fase di denaturazione, che avviene ad alte temperature (*denaturation*), in cui si ha la separazione dei frammenti. Questa fase è regolata dalla temperatura di *melting*;
- una fase di *annealing* o appaiamento, in cui i *primer* si appaiano ai filamenti. Anche in questo caso la temperatura gioca un ruolo fondamentale, infatti le sequenze dei *primer* devono essere scelte in modo tale che l'*annealing* avvenga solo con le sequenze d'interesse del DNA stampo, evitando l'adesione a sequenze simili, con la conseguente perdita di specificità;
- una fase finale di estensione (*extension*), in cui la polimerasi, sfruttando l'-OH libero fornito dai *primer*, polimerizza in direzione 5'-3' usando come stampo la sequenza specifica.

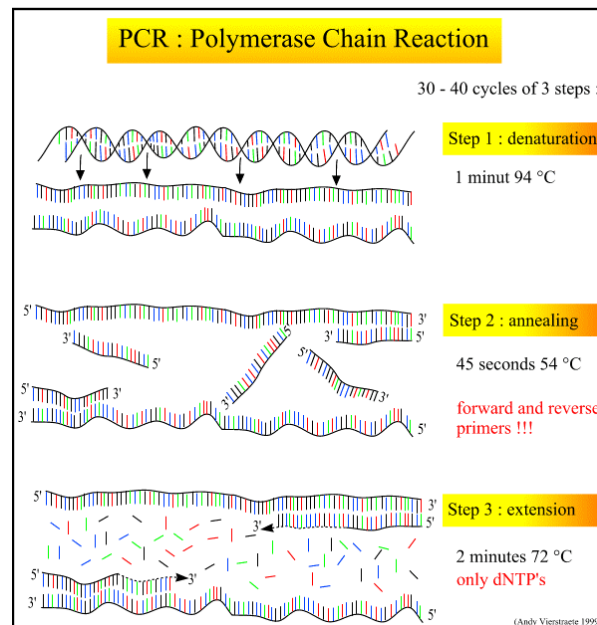


Figura 55. Schema dei cicli eseguiti durante PCR.

Nel primo ciclo si ha una duplicazione dal *primer* fino alla fine del frammento, nei cicli successivi si ha l'amplificazione della sola sequenza compresa tra i due *primer*. La PCR in realtà prevede numerose varianti, che ad esempio permettono, attraverso una progettazione adeguata dei *primer*, di aggiungere delle sequenze che prima non esistevano alle estremità del frammento da amplificare oppure di amplificare solo una parte della sequenza codificante la proteina.

Sono stati costruiti dei *primer*, in modo tale da amplificare solo la parte corrispondente al frammento desiderato ed inserire nella sequenza i siti di taglio per gli enzimi di restrizione, necessari per tagliare il plasmide pTXB1 ed il frammento amplificato tramite PCR.

Il *primer forward* è stato costruito in modo da avere le sequenze omologhe all'estremità 3' del cDNA della proteina rMOG_{ED} ed inserire i siti di taglio per l'enzima di restrizione NdeI, mentre il *primer reverse* è stato costruito in modo da avere le sequenze omologhe alla fine della sequenza del cDNA del frammento 1-97 della proteina ed inserire il sito di taglio per l'enzima di restrizione SapI.

Clonando tra i siti di restrizione NdeI e SapI è possibile ottenere la fusione dell'intaina al C-terminale di rMOG_{ED}(1-97) senza avere amminoacidi aggiuntivi sulla proteina dopo il distacco dell'intaina. Il sito SapI deve essere usato per clonare l'estremità 3' di un inserto.

Le sequenze nucleotidiche dei *primer* utilizzati sono le seguenti:

- rMOG_{ED}(1-97) forward

5'-GCCGCCCATATGGGACAGTTCAGAGTGATAGG-3'

- rMOG_{ED}(1-97) reverse

5'-GCCGCCGCTCTTCGCATGTGTAGCCTCCTTCATCC-3'

dove:

- in nero sono indicate le basi prima dei siti di taglio per gli enzimi di restrizione che permettono di ai *primer* di legarsi al DNA: è preferito usare C e G perché formano tre legami a idrogeno con la loro base complementare favorendo il legame con il DNA;

- in rosso sono indicati le basi nucleotidiche necessarie all'enzima di restrizione di riconoscere il sito di taglio;
- in blu sono indicate le basi nucleotidiche del cDNA della proteina.

Una volta terminata la PCR, è stata purificata la soluzione di reazione utilizzando il kit *Wizard® PCR Preps DNA Purification System* (Promega) che ha permesso di ottenere il doppio filamento del frammento amplificato del cDNA di rMOG_{ED}(1-97) purificato da contaminanti.

Il frammento amplificato ed il plasmide pTXB1 sono stati tagliati con gli enzimi di restrizione LguI, l'isoschizomero di SapI, e Nde I generando da due a quattro nucleotidi non appaiati all'estremità di ciascuna catena. Queste sequenze non appaiate sono denominate estremità coesive o appiccicose, perché possono appaiarsi fra loro o con le estremità coesive complementari di altri frammenti di DNA.

Il frammento digerito del cDNA di rMOG_{ED}(1-97) è stato nuovamente purificato con il kit *Wizard® PCR Preps DNA Purification System* (Promega), mentre il plasmide digerito è stato trattato con fosfatasi alcalina, in modo tale da defosforilare le estremità 3' e non permettere l'attacco delle sue estremità portando alla formazione del plasmide circolare senza l'inserimento del frammento amplificato; successivamente è stato purificato usando il kit di Promega.

Infine il frammento amplificato e il plasmide digerito sono stati sottoposti a reazione di ligazione tramite l'utilizzo di T4 DNA ligasi, un enzima del fago Lamba che permette l'attacco delle estremità libere di DNA. Sono state effettuate delle prove di ligazione per determinare le migliori condizioni, utilizzando sia rapporti diversi tra il vettore e il cDNA (1:3, 1:5 e 1:10) sia temperature diverse (18 °C, 4 °C).

E' stata trasformata una coltura di cellule DH5 α con il prodotto della ligazione e sono state piastrate le cellule trasformate su terreno LB Agar contenente ampicillina. Su alcune colonie provenienti da ogni piastra è stata effettuata una *colony PCR* per verificare se le ligazioni erano avvenute e per

individuare le colonie contenenti il nuovo plasmide per poi utilizzarle per ricavare, tramite protocollo *Miniprep*, il vettore da sequenziare.

Dal gel d'agarosio all'1% è stato possibile verificare la presenza della sequenza nucleotidica di rMOG_{ED}(1-97) inserita in pTXB1 nelle colonie provenienti dalle trasformazioni delle DH5 α con i prodotti di ligazione ottenuti dalle reazioni condotte a 18 °C utilizzando i tre diversi rapporti di quantità (Fig. 56).

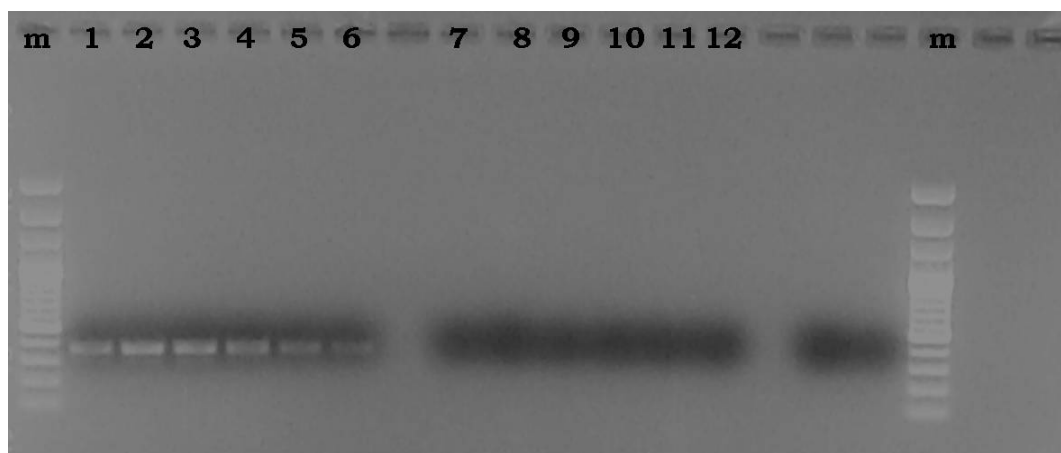


Figura 56. Gel d'agarosio all'1% della colony PCR. M: marker, 1-12: colonie.

E' stato quindi effettuato il *sequencing* su vari campioni di pTXB1rMOG_{ED}(1-97) per individuare il migliore clone da utilizzare per l'espressione del frammento rMOG_{ED}(1-97).

l'espressione di rMOG_{ED}(1-97)-inteina-CBD tramite aggiunta di IPTG in concentrazione finale 1 mM ed incubando a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Dopo aver effettuato la lisi cellulare, è stato necessario solubilizzare i corpi inclusi in cui è stata espressa rMOG_{ED}(1-97)-inteina-CBD: per fare questo è stato utilizzato un tampone con un'alta concentrazione di urea (8 M).

Il CBD ha un'alta affinità per la resina di chitina che permette un facile ed efficiente recupero della proteina dall'estratto cellulare. In aggiunta possono essere impiegate rigide condizioni di lavaggio, date da alte concentrazioni di sali e l'uso di detergenti non ionici, per ridurre legami non specifici di altre proteine presenti in *E. coli* aumentando così la purezza. I detergenti non ionici devono essere usati solo se non inattivano la proteina.

Pertanto i corpi inclusi solubilizzati sono stati caricati in colonna e, dopo aver effettuato un lavaggio per purificare la proteina desiderata dalle altre proteine cellulari, è stato indotto il *cleavage*, le cui condizioni dipendono dall'inteina presente e dal prodotto desiderato, usando il tampone adatto; infine la proteina è stata eluita dalla colonna e sono state raccolte frazioni di circa 1/3 del volume morto della colonna.

In particolare, desiderando ottenere una proteina contenente un tioestere in C-terminale è stato indotto il *cleavage* in colonna tramite aggiunta di un tampone contenente un tiolo, l'acido 2-mercaptoetansulfonico (MESNA) 0,2 M, e lasciando la resina a 4 °C per 48-62 ore. Successivamente rMOG_{ED}(1-97)-MESNA è stata eluita, utilizzando lo stesso tampone di *cleavage*, ed è stata caratterizzata tramite spettrometria di massa utilizzando lo spettrometro MALDI-TOF UltraFlexIII (Bruker) (Fig. 58).

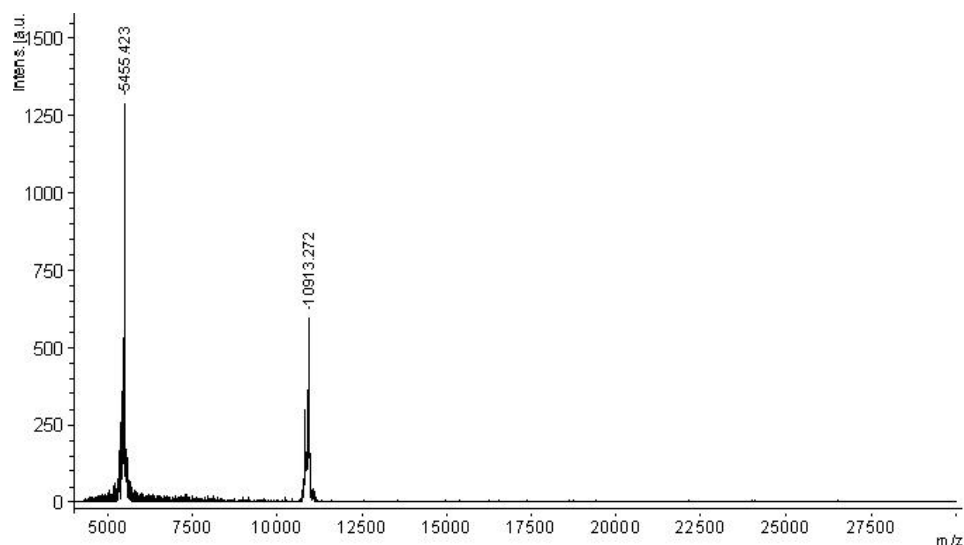


Figura 58. Spettro di massa di rMOGED(1-97)-MESNA.

La misura della concentrazione della proteina rMOGED(1-97)-MESNA eluita è stata stabilita attraverso il saggio di Bradford.

4.13 Sintesi del frammento peptidico C-terminale

Le modificazioni post-traduzionali prevedono la formazione di legami covalenti che coinvolgono gruppi amminici o carbossilici terminali della catena peptidica oppure gruppi funzionali presenti nelle catene laterali dei residui amminoacidici.

La sintesi di peptidi modificati in fase solida presenta maggiori difficoltà rispetto a quella dei peptidi semplici.

Ci sono due metodologie sintetiche per la sintesi di peptidi modificati:

1. approccio del *building block*: prevede prima la sintesi dell'amminoacido modificato che poi viene introdotto nella corretta posizione all'interno della catena peptidica durante le fasi della sintesi peptidica;¹⁰³
2. approccio convergente: viene sintetizzata la catena peptidica e, una volta terminata, viene fatta la reazione di accoppiamento come ultimo *step* del processo sintetico.¹⁰⁴

Nell'approccio convergente le reazioni di accoppiamento risultano essere più lente e difficili rispetto a quelle che avvengono sul singolo amminoacido, probabilmente a causa di impedimenti sterici, prodotti dalle protezioni presenti sulle catene laterali dei residui amminoacidici della catena peptidica.

Questa strategia sintetica necessita di un terzo livello di ortogonalità, in quanto il gruppo funzionale in catena laterale che deve essere modificato, deve risultare stabile nelle fasi di elongazione della catena peptidica e deve essere selettivamente rimosso, mantenendo le protezioni sulle altre catene, per evitare la formazione di prodotti secondari.

L'utilizzo di *building block* preformati, invece, è una metodologia molto versatile e efficiente, che non presenta problemi di selettività.^{105,106}

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS) permette di far accrescere la catena peptidica in direzione C-terminale → N-terminale, con il primo amminoacido ancorato ad una matrice solida insolubile, mediante formazione di un legame covalente con il gruppo carbossilico.¹⁰⁷

L'utilizzo di questa strategia sintetica prevede che le varie fasi della sintesi peptidica siano condotte in fase eterogenea e presenta il notevole vantaggio, rispetto alla sintesi in soluzione, di poter rimuovere eventuali prodotti secondari e reagenti in eccesso, senza isolare i singoli intermedi della sintesi.

¹⁰³ M. Meldal, Y. C. Lee, R. T. Lee, *Neoglycoconjugates: Preparation and Application*, Academic Press, Orlando, **1994**, 145-198.

¹⁰⁴ B. G. Davis, Synthesis of Glycoproteins, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 579-601.

¹⁰⁵ M. Meldal, Recent developments in glycopeptide and oligosaccharide synthesis, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1994**, 4, 710-718.

¹⁰⁶ M. Meldal, K. Bock, A general approach to the synthesis of *O*- and *N*-linked glycopeptides, *Glycoconjugate*, **1994**, 11, 59-63.

¹⁰⁷ R. Merrifield, Solid phase synthesis, *Science*, **1986**, 232, 341-347.

Le resine più comunemente usate per la sintesi di peptidi con la funzione carbossilica libera all'estremità C-terminale, utilizzando la strategia Fmoc/*t*Bu, sono quelle aventi come *handle* il 4-idrossi-benzil alcol, note come resine Wang (Fig. 59).¹⁰⁸

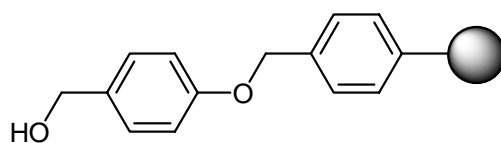


Figura 59. Struttura della resina Wang.

Questo tipo di resine sono costituite da un supporto clorometilpolistirenico, modificato con il 4-idrossi-benzil alcol, che permette la formazione di un benzil estere tra la resina e il primo amminoacido C-terminale della catena peptidica, che presenta un sostituito alcossi elettron-donatore in posizione *para*. La conseguenza di ciò è la possibilità di effettuare il *cleavage* dalla resina in condizioni acide moderate.

Il legame tra l'amminoacido e la resina risulta in questo modo stabile alle condizioni basiche di deprotezione dei gruppi α -NH₂, previste nell'approccio Fmoc/*t*Bu, evitando *cleavage* prematuri dalla resina.

Gli amminoacidi, per essere utilizzati nella sintesi peptidica, devono presentare:

- protezioni temporanee sulle funzioni α -NH₂;
- protezioni semipermanenti dei gruppi funzionali presenti sulle catene laterali dei vari amminoacidi.

Questi due tipi di protezioni devono essere ortogonali tra loro, in modo tale da evitare la formazione di prodotti secondari.

I gruppi protettori delle catene laterali devono essere stabili alle condizioni di elongazione della catena peptidica e, in modo particolare, devono

¹⁰⁸ S. S. Wang, *p*-alkoxybenzyl alcohol resin and *p*-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 1328-1333.

essere stabili nelle condizioni di deprotezione delle funzioni α -NH₂, ed essere rimossi solo nelle condizioni di distacco del peptide dal supporto solido.

Gli amminoacidi utilizzati nella strategia Fmoc/*t*Bu presentano il gruppo amminico protetto come 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc), il quale viene rimosso per trattamento con una soluzione di piperidina al 20% in dimetilformammide (DMF).

Gli amminoacidi come: Ala, Phe, Leu, Ile, Gly, Met, Pro e Val vengono utilizzati senza protezioni in quanto le catene laterali non presentano gruppi funzionali reattivi nelle condizioni di reazioni adottate nelle varie fasi della sintesi peptidica. Gli amminoacidi che devono essere utilizzati con gruppi protettori sono quelli che hanno gruppi ossidrilici, amminici, carbossilici e ammidici nelle catene laterali.

L'amminoacido ancorato alla resina viene fatto reagire con un amminoacido protetto sia sulla funzione amminica che sulla catena laterale in presenza di reagenti di accoppiamento per la formazione *in situ* dell'estere attivo.

Ciascun ciclo di accoppiamento effettuato per ogni amminoacido della sequenza prevede quattro passaggi:

- deprotezione dello Fmoc con una soluzione di piperidina al 20% in DMF;
- lavaggio della resina con DMF;
- accoppiamento con Fmoc-amminoacidi in presenza di attivanti e N-metil-morfolina (NMM);
- lavaggio della resina con DMF.

Mediante SPPS sono stati sintetizzati i frammenti peptidici [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴]MOG_{ED}(98-117) e [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴(Glc)]MOG_{ED}(98-117) utilizzando la metodologia *building block* secondo la strategia Fmoc/*t*-Bu.

La strategia di sintesi utilizzata per ottenere il peptide [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴(Glc)]MOG_{ED}(98-117), in cui la porzione glicosilica è legata tramite legame *N*-glicosilico al residuo di Asn¹⁰⁴, ha richiesto l'uso di amminoacidi glicosilati sotto forma di *building-block* pentafluorofenil esteri completamente protetti ed attivati. I gruppi ossidrilici della molecola

dell'ammino-zucchero, protetta sulla posizione amminica come Fmoc, sono stati protetti come acetil-derivati.

Le sequenze peptidiche sono state sintetizzate *in batch* su sintetizzatore automatico Syro II (MultiSynTech) a partire dalla resina Fmoc-Asp(*t*Bu)-Wang, con grado di sostituzione 0,5 mmol/g. Le reazioni di accoppiamento sono state condotte trattando la resina con una soluzione dell'amminoacido Fmoc-protetto (10 eq) e di 1-idrossibenzotriazolo (HOBt, 10 eq) in DMF ed una soluzione di N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA, 10 eq) in N-metilpirrolidone (NMP). E' stata aggiunta DMF per garantire un opportuno volume di rigonfiamento della resina durante la reazione di accoppiamento.

La deprotezione del gruppo α -amminico dell'ultimo amminoacido legato è stata effettuata trattando la resina con una soluzione di piperidina al 40% in DMF.

L'amminoacido Fmoc-Asn[Glc(OAc)₄]-OH (1.5 eq) è stato invece fatto reagire su sintetizzatore manuale PLS 4x4 (Advanced ChemTech) con doppio accoppiamento e in presenza di HOBt (1.5 eq), (1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio TBTU (1.5 eq) e NMM (3 eq). Al termine della sintesi, l'ultimo amminoacido è stato quindi deprotetto con una soluzione di piperidina al 40% in DMF e la resina è stata lavata più volte con DCM e seccata sotto flusso di azoto.

Il distacco dei peptidi dalla resina con la conseguente deprotezione delle catene laterali è stato eseguito in ambiente di TFA, usando opportuni *scavenger* come tioanisolo ed etanditiolo, necessari per bloccare i carbocationi reattivi che si formano dall'acidolisi dei gruppi protettori presenti sulle catene laterali degli amminoacidi.

La deacetilazione dei gruppi ossidrilici del residuo glicosilico legato al residuo Asn è stata ottenuta per trattamento del peptide con una soluzione di metossido di sodio in metanolo anidro per 2 ore a temperatura ambiente.

I peptidi sintetizzati sono stati analizzati tramite HPLC analitica usando un gradiente 10-60% di MeCN + 0.1% di TFA in 20 minuti e tramite spettri di massa MALDI.

4.14 Tentativi di NCL

Sono state effettuate varie prove di ligazione tra il frammento ricombinante rMOG_{ED}(1-97)-MESNA e il peptide grezzo [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴]MOG_{ED}(98-117).

Ciò che è fondamentale per la reazione di NCL è che il pH di reazione sia maggiore o uguale a 7 affinché il passaggio di transtioesterificazione vada avanti essendo questo reversibile.

Le prime prove sono state condotte nel tampone di eluizione della proteina con urea 3 M, anziché 1 M, e aggiungendo un riducente opportuno affinché il residuo di Cys in posizione N-terminale nel frammento peptidico non si ossidi. Il reagente usato è stato il tris(2-carbossietil)fosfina idrocloruro (TCEP) che è più stabile e più efficace rispetto al ditiotreitolo (DTT). Le condizioni variate sono state la temperatura e gli equivalenti del peptide.

Ogni reazione è stata controllata tramite spettrometria di massa MALDI a intervalli di 12 ore per verificare l'andamento della reazione; tuttavia non sono state notate variazioni della massa iniziale di rMOG_{ED}(1-97)-MESNA e del peptide (Fig. 60).

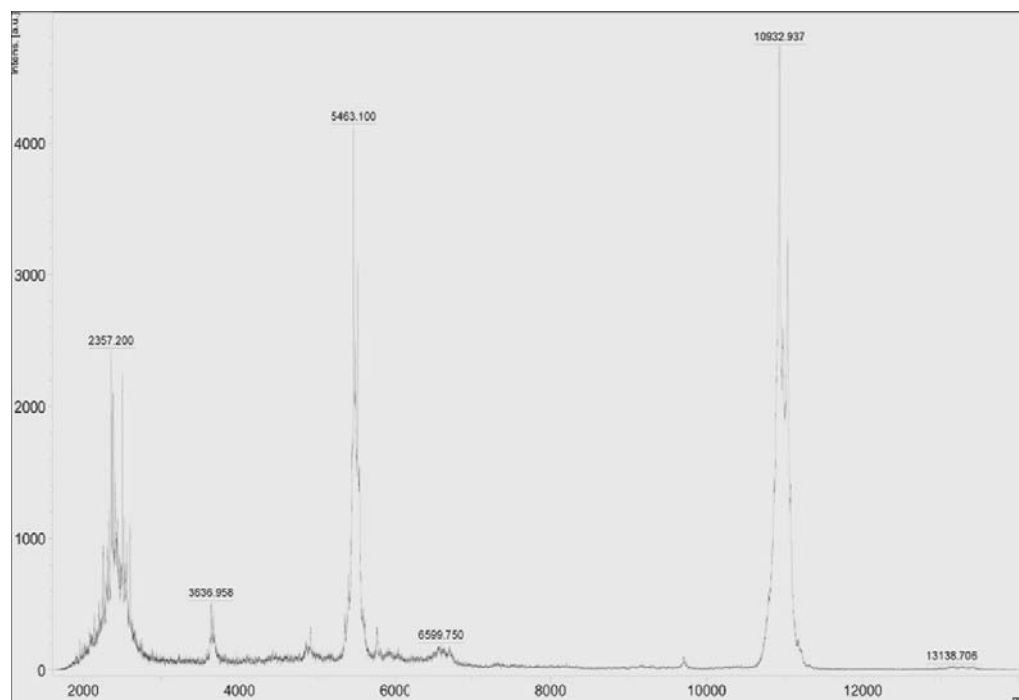


Figura 60. Spettro della reazione di ligation dopo 48 h: 10932=PM di $rMOG_{ED}(1-97)$ -MESNA, 2357=PM di $[Gly^{103}, Asn^{104}]MOG_{ED}(98-117)$.

Successivamente è stata effettuata una prova cambiando il tampone di reazione; è stato utilizzato un tampone contenente guanidinio HCl 6 M in modo da avere la certezza che i due frammenti fossero effettivamente in soluzione. La reazione è stata condotta in presenza di TCEP e a temperatura ambiente per 48 ore; per verificarne l'andamento è stata controllata tramite spettroscopia di massa MALDI, ma anche in questo caso non sono stati ottenuti risultati positivi.

Infine è stata condotta una reazione utilizzando il tampone contenente guanidinio HCl e aumentando la quantità di TCEP; inoltre è stato aggiunto MESNA in modo da riequilibrare il tioestere sul frammento proteico. La reazione è stata effettuata a temperatura ambiente per 48 ore sotto agitazione. I controlli effettuati tramite spettroscopia di massa MALDI non hanno dato gli esiti sperati

In futuro dovranno essere effettuate altre prove di *ligation* tra rMOG_{ED}(1-97)-MESNA e [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴]MOG_{ED}(98-117) utilizzando nuove condizioni di reazione presenti in letteratura.

4.15 Discussione e sviluppi futuri

Questa parte del lavoro di tesi è stata dedicata allo sviluppo di nuove metodologie biologiche e chimiche che permettano di ottenere proteine selettivamente e specificamente modificate al fine di indagare l'influenza della porzione glicosidica nel riconoscimento autoanticorpale.

Studi condotti presso PeptLab hanno evidenziato che l'attività immunologica del peptide glicosilato CSF114(Glc) è strettamente legata alla presenza dello zucchero; pertanto è stato deciso di ottenere il dominio extracellulare di rMOG opportunamente glicosilato, sfruttando particolari strategie semisintetiche: la *Cys-Ligation* e l'*Expressed Protein Ligation*.

La *Cys-Ligation* permette l'accoppiamento selettivo tra uno iodo-acetoammido derivato del glucosio ed il residuo SH libero di una Cys presente in una molecola proteica. Attraverso una mutagenesi sito-specifica sul plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆ è stato possibile introdurre con successo una singola mutazione Asn→Cys a livello del sito nativo per il legame N-glicosidico. Sono stati effettuati vari tentativi di reazione tra rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ e N-[1-(2-iodo)acetil]-β-D-glucopiranosio che hanno evidenziato l'ottenimento del nuovo prodotto.

In futuro dovrà essere messa a punto la reazione per ottenere la neoglicoproteina in quantità maggiori e, una volta purificata, dovrà essere sottoposta a digestione triptica per verificare che il legame sia effettivamente avvenuto con il residuo di Cys in posizione 31.

In secondo luogo si è cercato di introdurre una modificazione post-traduzionale in posizione 104 del dominio extracellulare di rMOG utilizzando la metodologia EPL; a tale scopo è stato progettato di ottenere il frammento

ricombinante rMOG_{ED}(1-97) come tioestere C-terminale utilizzando il sistema IMPACTTM-TWIN e di sintetizzare il frammento rMOG_{ED}(98-117) sostituendo His¹⁰³ con Gly e Ser¹⁰⁴ con Asn(Glc).

L'espressione e la purificazione del frammento ricombinante sono state ottenute con successo grazie a metodi messi a punto presso i laboratori della Prof. Annette Beck-Sickinger, dell'Institut für Biochemie (Universität Leipzig, Germany).

Sono state effettuate varie prove di unione della sequenza ricombinante rMOG(1-97)-MESNA ed il frammento peptidico [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴]MOG_{ED}(98-117) senza tuttavia ottenere risultati.

Pertanto in futuro sarà necessario sperimentare nuove condizioni di reazione per ottenere la proteina semisintetica da sottoporre poi a *refolding* in modo da ottenerla nella giusta conformazione allo scopo di essere utilizzata come antigene in test immunoenzimatici di tipo ELISA.

5 PARTE SPERIMENTALE

5.1 Materiali e metodi

I prodotti utilizzati sono stati acquistati presso: Sigma-Aldrich, Roche, Fermentas, Qiagen, Riedel-de Haën, Carlo Erba, J.T. Baker, Bio-Rad, Promega e NEB e sono stati impiegati senza ricorrere a ulteriore purificazione.

L'elettroporazione è stata eseguita mediante BTX ECM 399 (BTX Harvard Apparatus) con cuvette di spessore 1 mm (Electroporation cuvettes plus, 1mm Gap cuvettes, BTX Harvard Apparatus).

Gli incubatori usati per l'ottenimento delle colture batteriche, sia in piccola che in larga scala, e per l'induzione dell'espressione sono stati: thermomixer Orbital mixing (Torrey Pines Scientific Inc.), C24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific), Orbital Incubator S150 (Stuart) e Micra 18 (ISCO).

La sonicazione è stata effettuata mediante sonicatore Sonoplus Bandelin utilizzando sonda 529 M573 Mikrospritze Ø 3 mm (Bandelin); tutte le operazioni di centrifugazione sono state condotte tramite l'impiego di tre diverse centrifughe: Megafuge 1.0R Haerus (rotore Haerus 7570E Ch 004063), Allegra 64R Beckman (rotore F0630 Beckman) Coulter TM e Mikro 22R Hettich (rotore 1157 Hettich).

Le proteine sono state purificate mediante cromatografia di affinità su cromatografo ÄKTA (GE Healthcare) su colonna Precision Column Holder XK16 (GE Healthcare) impaccata con resina su resina Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). La purificazione tramite *gel filtration* è stata effettuata su cromatografo ÄKTA (GE Healthcare) utilizzando la colonna Tricorn Superdex™ 75 10/300 GL Columns (GE Healthcare).

La dialisi è stata effettuata utilizzando membrane T3 (porosità 12000-14000 Da) e membrane T2 (porosità 6000-8000 Da) CelluSep (Membrane filtration Products Inc.); la concentrazione è stata eseguita tramite Amicon

Ultra-15 centrifugal devices (Millipore) e la filtrazione mediante filtri 0,22 μm Millex GP (Millipore).

L'elettroforesi è stata realizzata su celle elettroforetiche verticali Mini Protean II, alimentate da Power Pac Basic (Bio-Rad).

Gli spettri di assorbimento UV sono stati registrati su spettrofotometro UV 1601 PC UV-Visibile (Shimadzu Corporation); gli spettri di Dicroismo Circolare sono stati acquisiti con Spectropolarimeter JASCO J-180. Gli spettri NMR sono stati acquisiti con lo strumento Bruker DRX 600 MHz Cryoprobe NMR (Bruker), utilizzando tubi per NMR tube 5MM-600 MHZ 7" (KONTES GLASS COMPANY).

Gli spettri di massa sono stati ottenuti con ESI Q-TOF Micromass (Waters), sfruttando il programma Mass Lynx (Waters), e con MALDI-TOF UltraFlexIII (Bruker).

Per l'effettuazione dei test ELISA sono state utilizzate piastre di polistirene con 96 pozzetti (Nunc-ImmunoMaxisorp).

L'amplificazione di frammenti di DNA è stata effettuata utilizzando il termociclatore PCR iCycler Thermal Cycler (Biorad).

La purificazione ed eluizione del frammento ricombinante contenente il tioestere in C-terminale sono state ottenute utilizzando una colonna Econo Column (Biorad) impaccata manualmente con una resina di chitina acquistata da NEB.

La sintesi peptidica in fase solida è stata realizzata con sintetizzatore automatico Syro II (MultiSynTech).

5.2 Terreni di coltura

Per le colture batteriche sono stati utilizzati i seguenti terreni, sterilizzati in autoclave a 120 °C per 20 minuti prima dell'uso:

Tabella 4: Luria-Bertani Medium (LB)

Tryptone	10 g
NaCl	10 g
<i>Yeast extract</i>	5 g
H ₂ O	1 L

Tabella 5: Luria-Bertani Medium Agar

Tryptone	4 g
<i>Yeast extract</i>	2 g
NaCl	4 g
Agar	6 g
H ₂ O	400 ml

Tabella 6: SOC Medium

Tryptone	20 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	250 mM
Glucosio	1 M

Per la preparazione di terreni, solidi o liquidi, contenenti uno o più antibiotici, il terreno è stato sterilizzato e lasciato raffreddare fino a 45 °C prima di aggiungere l'antibiotico.

Tabella 7: M9 Medium

M9 medium 10X	100 ml
Soluzione elementi in tracce	10 ml
Glucosio 20%	20 ml
MgSO ₄ 1M	1 ml
CaCl ₂ 1M	0,3 ml
Biotina (1 mg/ml)	1 ml
Tiamina (1 mg/ml)	1 ml
Ampicillina	1 ml
Kanamicina	1 ml
H ₂ O	a 1 L

Tabella 8: M9 medium 10X

Na ₂ PO ₄	60 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
¹⁵ NH ₄ Cl	5 g
H ₂ O	a 1 L

Tabella 9: Soluzione elementi in tracce

EDTA	5 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,83 g
ZnCl ₂	84 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	13 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	13 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
MnCl ₂ ·6H ₂ O	1,6 mg

Tabella 10: New Minimal Medium (NMM)

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	50 mM
KH_2PO_4	22 mM
NaCl	8,5 mM
$^{15}NH_4Cl$	7,5 mM
$MgSO_4$	1 mM
Glucosio	20 mM
Ca^{2+}	1 $\mu g/ml$
Fe^{2+}	1 $\mu g/ml$
Elementi in tracce (Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; Mn^{2+} ; MoO_4^{2-})	0.001 $\mu g/ml$
Tiamina	10 $\mu g/ml$
Biotina	10 $\mu g/ml$
Ampicillina	1 mM
Kanamicina	1 mM
H_2O	a 1 L

5.3 Tamponi

Tabella 11: Soni Buffer pH 8

Tris	50 mM
NaCl	500 mM

Tabella 12: Buffer A pH 8

NaH_2PO_4	100 mM
Tris	10 mM
Guanidinio HCl	6 M

Tabella 13: Buffer A con Mercaptoetanolo pH 8

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris	10 mM
Guanidinio HCl	6 M
Mercaptoetanolo	1 mM/ 40 mM

Tabella 14: Buffer B pH 8

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris	10 mM

Tabella 15: Buffer B con GSH pH 8

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris	10 mM
GSH	3 mM

Tabella 16: EluBuffer pH 8

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris	10 mM
Imidazolo	0,5 M
NaCl	0,2 M

Tabella 17: Buffer S75 pH 7.5

NaCl	100 mM
Tris	20 mM

Tabella 18: PBS 10X pH 8

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	26,8 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g

Tabella 19: Coating Buffer pH 9.6

Na ₂ CO ₃	1,59 gr
NaHCO ₃	2,93 gr
H ₂ O	1 L

Tabella 20: Saline Buffer

NaCl	18 gr
Tween 20	1 ml
H ₂ O	2 L

Tabella 21: FBS Buffer

FBS	10%
<i>Saline buffer</i>	90%

Tabella 22: Column Buffer pH 8

NaCl	500 mM
Tris	20 mM
EDTA	1 mM

Tabella 23: Washing Buffer pH 8

NaCl	500 mM
Tris	20 mM
Urea	1 M
Tween 20	1%

Tabella 24: Column Buffer con Urea pH 8

NaCl	500 mM
Tris	20 mM
Urea	1 M/1,5 M/8 M

Tabella 25: Cleavage Buffer pH 8

NaCl	500 mM
Tris	20 mM
Urea	1 M
MESNA	200 mM

5.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide è una tecnica che consente di avere una conferma del grado di purezza e una valutazione qualitativa del campione in esame; per ottenere questi risultati viene usato il metodo di

Laemmli, che prevede la denaturazione delle proteine in catene polipeptidiche lineari, minimizzando l'aggregazione.¹⁰⁹

I monomeri di acrilammide vengono polimerizzati in catene tramite una reazione iniziata da radicali liberi con l'aggiunta di APS (persolfato d'ammonio), avente la funzione di iniziatore della reazione radicalica, e di TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiammina), che opera invece da catalizzatore: in presenza di N,N'-metilene-bis-acrilammide queste catene si legano fra loro a formare un gel, la cui porosità dipende dalla lunghezza fra le catene e dalle loro interconnessioni.

La concentrazione di acrilammide varia in funzione del *range* di separazione desiderato (Tabella 26).

Concentrazione Acrilammide (%)	Range di separazione lineare (kDa)*
22	5-10
15	10-43
12	12-60
10	20-80
7.5	36-94
5	57-212

Tabella 26: variazione della concentrazione di Acrilammide in funzione del range di separazione.

*la grandezza dei pori diminuisce all'aumentare del rapporto bis-acrilammide/acrilammide ed è stato trovato empiricamente che un rapporto di 1:29 è ottimale per la formazione di pori che si adattano alle dimensioni di una catena proteica denaturata.

I campioni da caricare sul gel vengono preparati tramite aggiunta di *loading buffer*, ovvero una soluzione contenente SDS (sodio dodecilsolfato) che, agendo da forte detergente anionico, si lega alle catene polipeptidiche denaturate, conferendo una carica negativa al complesso risultante.

¹⁰⁹ U. K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **1970**, 227, 680-685.

Poiché il numero di legami che si formano risulta essere proporzionale al peso molecolare del polipeptide, indipendentemente dalla sua sequenza, i complessi SDS-polipeptide migrano attraverso il gel in funzione della dimensione del polipeptide: risulta così possibile stimare il peso molecolare di una catena proteica utilizzando opportuni *marker* a peso molecolare noto.

Dopo aver aggiunto il *loading buffer*, i campioni vengono scaldati a 100 °C in modo da denaturare le proteine contenute in essi e vengono poi caricati nel gel. I complessi SDS-polipeptide, dopo aver migrato attraverso una zona ad alta porosità (*running gel*), formano bande molto sottili ma apprezzabili a occhio nudo tramite l'uso di *Brilliant Blue Coomassie*, un colorante a base di amminotriarilmetano in grado di formare legami con le catene polipeptidiche ma non con il gel. La risoluzione delle bande proteiche viene incrementata se si applicano i campioni su un breve tratto di gel impaccatore (*stacking gel*) posto sopra il *running gel*. La diversa composizione e il diverso pH esistenti tra questi due gel fanno in modo che il campione si concentri in una stretta banda, prima di venir risolto durante la migrazione nel gel principale.

Dopo questa operazione il colorante viene eliminato e il gel viene lavato con *destaining solution*, una soluzione decolorante che permette di evidenziare solamente le bande presenti.

Tabella 27: Running gel 12%

Acrilammide/Bisacrilammide 40%	1,5 ml
Tris 2M pH 8.8	1,3 ml
H ₂ O	2,1 ml
SDS 10%	50 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	2 µl

Tabella 28: Stacking gel 4%

Acrilammide/Bisacrilammide 40%	0,67 ml
--------------------------------	---------

Tris 1M pH 6.8	0,5 ml
H ₂ O	2,7 ml
SDS 10%	40 µl
APS 10%	40 µl
TEMED	4 µl

Tabella 29: Running Buffer pH 8.3

Tris 25 mM, glicerina 192 mM,	100 ml
SDS 10%	
H ₂ O	900 ml

Tabella 30: Staining Solution

Etanolo	40%
Acido acetico	10%
<i>Coomassie Brilliant Blue R250</i>	0,1%

Tabella 31: Destaining Solution

Etanolo	40%
Acido acetico	10%

5.5 Parte Sperimentale: Parte A

5.5.1 Preparazione di cellule elettrocompetenti

5 ml di precoltura in LB di ceppi di *E. coli* (DH5 α , ER2566 e BL21) sono stati fatti crescere per tutta la notte a 37 °C sotto agitazione. 500 ml di LB sono stati inoculati con 2 ml di precoltura e lasciati crescere a 37 °C, sotto agitazione, fino a che non è stato raggiunto il valore di OD₆₀₀=0,5-0,8. La coltura è stata centrifugata a 4000 rpm per 20 minuti alla temperatura di 4 °C; il *pellet* è stato risospeso in circa 250 ml di una soluzione sterile pre-raffreddata di glicerolo al 10%, mantenendo il tutto in bagno di ghiaccio. L'operazione è stata ripetuta ed, infine, il *pellet* è stato risospeso nella quantità minima di glicerolo al 10%. La sospensione così ottenuta è stata aliquotata (70 μ l) in eppendorf sterili e conservata a -80 °C.

5.5.2 Trasformazione di DH5 α con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ ed isolamento del plasmide

70 μ l di sospensione in glicerolo del ceppo di *E. coli* DH5 α [*F'* *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(*r_K m_K⁺*), λ -] elettrocompetenti sono stati trasformati con 0,120 μ g di plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆. In una cuvetta da elettroporazione di 1 mm di spessore, precedentemente raffreddata, sono stati inseriti il plasmide e la sospensione cellulare; successivamente è stata effettuata l'elettroporazione per 5 ms a 2000 V. Il contenuto della cuvetta è stato immediatamente risospeso in 300 μ l di terreno di coltura SOC e mantenuto a 37 °C sotto agitazione per un'ora. 100 e 50 μ l della sospensione delle cellule trasformate sono stati piastrati su piastre Petri contenenti LB Agar con ampicillina (100 μ g/ml), per la selezione, ed incubate in stufa a 37 °C per tutta la notte.*

Singole colonie sono state utilizzate per inoculare 5 ml di LB contenente 5 µl di ampicillina (100 µg/ml) e sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Sono stati trasferiti 3 ml di coltura in tubi da centrifuga e centrifugati a 6000 rpm per 10 minuti.

La purificazione del DNA plasmidico è stata effettuata utilizzando un kit commercializzato da Qiagen (*Miniprep Qiagen*), seguendo il protocollo del manuale allegato. Questo metodo si basa su tre passaggi consecutivi: la lisi alcalina delle cellule batteriche, l'adsorbimento selettivo del DNA plasmidico superavvolto su di una membrana ed infine l'eluizione con un tampone a bassa forza ionica. Questo kit rappresenta un mezzo efficace e veloce che consente anche di ottenere un DNA sufficientemente puro per il clonaggio ed il sequenziamento.

Dopo il processo di purificazione, è stata determinata la concentrazione del DNA plasmidico mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm.

Il campione infine è stato conservato a -20 °C

5.5.3 Trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e pREP4

70 µl di sospensione in glicerolo del ceppo di *E. coli* ER2566 [*F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]*] elettrocompetenti sono stati trasformati con 1 µl di plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆ (0,120 µg/µl) e con 1 µl di plasmide pREP4 (0,120 µg/µl); la sospensione e i plasmidi sono stati introdotti in una cuvetta da elettroporazione di 1 mm di spessore, precedentemente raffreddata, e sottoposti ad elettroporazione a 2000 V per 5 ms. Le cellule trasformate sono state risospese in 300 µl di SOC e trasferite in eppendorf per essere incubate a 37 °C, sotto agitazione, per un'ora. 100 e 50 µl di coltura sono stati piastrati su capsule di Petri con LB Agar contenenti

ampicillina (100 µg/ml) e kanamicina (70 µg/ml); le piastre sono state incubate in stufa a 37 °C per tutta la notte.

5.5.4 Test di espressione di rMOG_{ED}(His)₆ in terreno LB

Singole colonie, derivanti dalla trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e con pREP4, sono state utilizzate per inoculare 5 ml di LB, a cui sono stati aggiunti 5 µl di ampicillina (100 µg/ml) e 5 µl di kanamicina (70 µg/ml); sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Cinque beute da fermentazione sono state preparate con 100 ml di LB, 100 µl di ampicillina (100 µg/ml), 100 µl di kanamicina (70 µg/ml) e inoculate con 100 µl di precoltura: sono state quindi incubate a 37 °C, sotto agitazione, fino a che non è stato raggiunto il valore di OD₆₀₀=0,5-0,8. L'induzione dell'espressione è stata effettuata aggiungendo alla coltura 100 µl di IPTG (1 mM) e incubando a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Aliquote di 500 µl sono state prelevate da ogni coltura prima e dopo l'induzione e sono state centrifugate a 17000 rpm per 10 minuti a 4 °C; è stato gettato il surnatante e ogni campione è stato preparato mediante aggiunta di *loading buffer*, riscaldato a 100 °C per 10 minuti e caricato (20 µl) nel gel di poliacrilammide al 12%.

I campioni caricati sono stati fatti correre applicando un voltaggio di 90 V. Il gel è stato staccato dalle apposite piastre, è stato colorato con *Blu Coomassie* per alcune ore e infine decolorato con *destaining solution*.

5.5.5 Espressione in larga scala di rMOG_{ED}(His)₆ in terreno LB

Una colonia, derivante dalla trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e con pREP4, è stata utilizzata per inoculare 5 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e kanamicina (70 µg/ml). Le cellule sono state incubate a 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

1 ml di precoltura è stato inoculato in una beuta da fermentazione, preparata con 1 litro di LB, a cui sono stati aggiunti 1 ml di ampicillina (100 µg/ml) ed 1 ml di kanamicina (70 µg/ml): la coltura è stata incubata a 37 °C sotto agitazione fino ad OD₆₀₀=0,5-0,8. E' stato aggiunto 1 ml di IPTG (1 mM) e la coltura è stata incubata a 37 °C, mantenendo l'agitazione, per tutta la notte.

5.5.6 Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi

La coltura è stata centrifugata a 4000 rpm per 30 minuti a 4 °C e il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 10 ml di *Soni Buffer* pH 8; sono stati aggiunti 400 µl di una soluzione 25X di inibitori delle proteasi e successivamente la sospensione è stata congelata a -20 °C per un giorno.

Alla sospensione scongelata è stata aggiunta una punta di spatola di lisozima ed è stata messa sotto agitazione, a temperatura ambiente, per 30 minuti. Successivamente è stato aggiunto LDAO 0,5% (0,83 ml ogni 50 ml di cellule) ed è stata effettuata la sonicazione, eseguendo 10 cicli da 30 secondi ed applicando una potenza del 60%.

Il lisato è stato centrifugato a 17000 rpm per 30 minuti a 4 °C ed il *pellet* ottenuto è stato omogeneizzato in "Potter" con 10 ml di una soluzione di *Soni Buffer* e LDAO 0,5%; la sospensione è stata centrifugata a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta tre volte.

Successivamente il *pellet* è stato omogeneizzato in "Potter" aggiungendo 10 ml di *Soni Buffer* e centrifugato a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta due volte.

I corpi inclusi così ottenuti sono stati solubilizzati aggiungendo 0,5 ml di *Soni Buffer* e 5 ml di *Buffer A* con Mercaptoetanolo 40 mM e lasciando agitare

per 2 ore a temperatura ambiente. I corpi inclusi così solubilizzati, se non utilizzati subito, sono stati conservati congelati a -20 °C.

5.5.7 Purificazione e *refolding* di rMOG_{ED}(His)₆

La purificazione su resina *Chelating Sepharose Fast Flow* è stata effettuata a temperatura ambiente.

La colonna Precision Column Holder XK16 è stata impaccata con resina *Chelating Sepharose Fast Flow* e collegata al cromatografo ÄKTA. La resina è stata lavata con H₂O, poiché è conservata in una soluzione al 20% di EtOH, quindi è stata rimossa dallo strumento, addizionata di NiSO₄ e posta ad agitare per 30 minuti al fine di permettere il legame tra il Ni²⁺ ed il gruppo acido iminodiacetico presente sulla resina.

Al termine dell'operazione la colonna è stata nuovamente collegata allo strumento e lavata con acqua per eliminare l'eccesso di ioni metallici; successivamente è stata equilibrata con *Buffer A* con Mercaptoetanololo 1 mM, con flusso di 1 ml/min.

Alla proteina derivante dalla solubilizzazione dei corpi inclusi è stato aggiunto *Buffer A*, in modo tale da poter ottenere una concentrazione finale di mercaptoetanololo di circa 2-3 mM; poi il campione è stato caricato in colonna (*loading* della resina: 5 mg/ml) e lasciato legare alla resina sotto agitazione per circa due ore.

La colonna è stata impaccata per gravità e collegata al cromatografo ÄKTA; il *refolding* della proteina è stato effettuato in colonna tramite applicazione di un gradiente dal 100% di *Buffer A* al 100% di *Buffer B* con glutatione in 10 ore a flusso 1 ml/min. E' stato poi applicato un altro gradiente dal 100% di *Buffer B* con glutatione al 100% di *Buffer B* in due ore, con flusso 1 ml/min, in modo da permettere la formazione del ponte disolfuro all'interno della proteina. L'eluizione della proteina è stata effettuata con 100% *EluBuffer*, flusso 1 ml/min, raccogliendo frazioni di 1 ml.

La concentrazione molare della proteina eluita è stata determinata tramite l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.8 *Gel filtration*

Le varie frazioni di proteina correttamente ripiegata, ottenute dall'eluizione per cromatografia di affinità, sono state raccolte e sottoposte a concentrazione per centrifugazione utilizzando una Amicon Ultra-15, 5000 NMWL (Millipore).

La colonna per la *gel filtration* (Superdex75) è stata collegata al cromatografo. La colonna è conservata in una soluzione al 20% di EtOH, perciò è stata lavata con H₂O per 90 minuti a flusso 0,8 ml/min. Successivamente la colonna è stata condizionata con *Buffer S75* a flusso 0,8 ml/min. Il campione proteico è stato caricato in colonna tramite iniezione manuale ed è stato eluito con *Buffer S75*, flusso 0,8 ml/min, raccogliendo frazioni di 1 ml.

Dallo spettro UV (280 nm) dell'eluizione è stato possibile individuare le frazioni contenenti la proteina correttamente ripiegata; queste sono state raccolte e sottoposte a concentrazione per centrifugazione (Amicon Ultra-15, 5000 NMWL, Millipore) (Fig. 61).

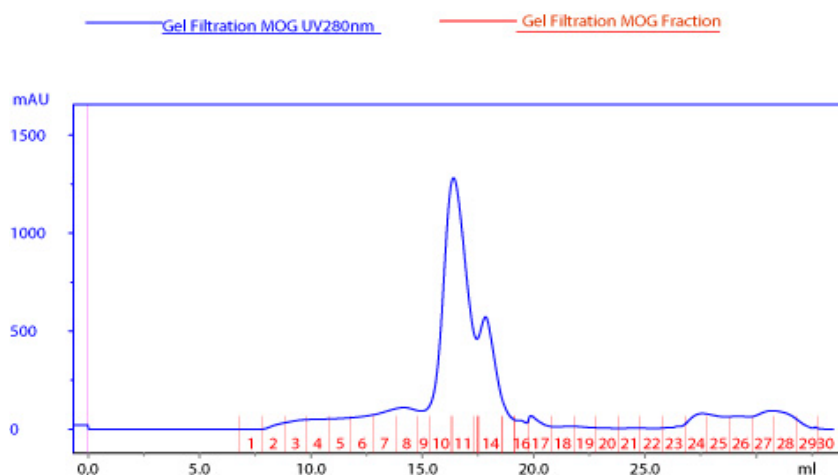


Figura 61. Cromatogramma della Gel Filtration.

5.5.9 Dialisi di rMOG_{ED}(His)₆ in PBS pH 8

E' stata fatta reidrattare la membrana T2 (porosità 6000-8000 Da; 1,99 ml/1 cm) in acqua *milliQ* per 30 minuti. E' stata caricata la membrana con il campione eluito e quindi immersa in 500 ml di PBS a pH 8 mantenendo costante l'agitazione tutta la notte. La concentrazione molare della proteina è stata determinata tramite l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.10 Test ELISA

Per il test ELISA sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti (Nunc-Immuno Maxisorp).

- *Coating*: adsorbimento dell'antigene sul fondo delle piastre in *coating Buffer* pH 9.6 alla concentrazione di 1 µg/100 µl; incubazione a 4 °C tutta la notte.
- Le piastre sono state lavate 5 volte con la soluzione di lavaggio *Saline Buffer* contenente 0,15 M di NaCl e 0,05% di Tween 20 (poliossietilene sorbitan monolaurato), pH 7.4.
- *Blocking*: saturazione dei siti liberi sulla superficie con una proteina non reattiva, cioè con 100 µl di una soluzione al 10% di FBS in *Saline Buffer*, per 1 ora a temperatura ambiente.
- Lavaggio delle piastre una volta con la soluzione *Saline Buffer*.
- Applicazione del siero: sono state fatte 3 diluizioni nella soluzione di lavaggio 1:100, 1:1000, 1:10000; sono stati messi 100 µl per pozzetto e sono stati incubati a 4 °C tutta la notte.
- Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione *Saline Buffer*

- Aggiunta antisiero: ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di anticorpo secondario anti IgG umano coniugato con fosfatasi alcalina, diluito 1:8000 in FBS e *Saline Buffer*, e anti IgM, diluito 1:200. Le piastre sono state incubate per 3 ore a temperatura ambiente.
- Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione *Saline Buffer*.
- Applicazione del substrato: sono stati aggiunti 100 μ l per pozzetto di substrato p-NPP (*p*-nitrofenilfosfato, 1 mg/ml) in soluzione tampone (10% dietanoloamina, 0,1% di MgCl₂, pH 9.8). Si tratta di un cromogeno, cioè di un substrato non colorato sul quale agisce la fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo secondario, il cui prodotto di reazione è colorato. L'intensità della colorazione di ogni singolo pozzetto dipende dalla quantità di enzima presente e quindi dalla concentrazione di IgG/IgM nel campione da testare.
- Blocco della reazione: dopo 30 minuti, a temperatura ambiente, è stata bloccata la reazione colorimetrica aggiungendo una soluzione di NaOH 1 M (50 μ l per pozzetto).
- Lettura: l'assorbanza è stata letta con uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm.

5.5.11 Modifiche test ELISA

Al protocollo generale del test ELISA sono state apportate, in esperimenti diversi, le seguenti modifiche:

- Aggiunta antisiero: 100 μ l di anticorpo secondario anti IgG diluito 1:16000 (2X) e 1:32000 (4X); 100 μ l di anticorpo secondario anti IgM diluito 1:400 (2X) e 1:800 (4X).
- *Coating*: adsorbimento dell'antigene sulle piastre in tampone PBS 1X pH 8.
- Soluzione di lavaggio: PBS 1X pH 8 e 1% Tween 20.

- *Blocking*: saturazione dei siti liberi con 100 µl di FBS 2,5% in soluzione salina.
- Piastre: utilizzo di piastre *Biomat High Binding*.
- Test ELISA della durata di 2 giorni:
 - *Coating*: adsorbimento dell'antigene sul fondo delle piastre in *coating Buffer* pH 9.6 alla concentrazione di 1 µg/100 µl; incubazione a 4 °C tutta la notte.
 - Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione *Saline Buffer*.
 - *Blocking*: sono stati saturati i siti liberi sulla superficie con 100 µl FBS 10% in *Saline Buffer*; incubazione di un'ora a temperatura ambiente.
 - Lavaggio delle piastre una volta con la soluzione *Saline Buffer*.
 - Applicazione siero: sono state utilizzate 3 diluizioni 1:100, 1:1000, 1:10000; sono stati messi 100 µl per pozzetto e sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente.
 - Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione *Saline Buffer*.
 - Aggiunta antisiero: ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo secondario anti IgG umano coniugato con fosfatasi alcalina; diluito 1:8000 in FBS e *Saline Buffer*, e anti IgM, diluito 1:200. Le piastre sono state incubate per 3 ore a temperatura ambiente.
 - Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione *Saline Buffer*.
 - Applicazione del substrato: sono stati aggiunti 100 µl per pozzetto di substrato p-NPP (1 mg/ml) in soluzione tampone (10% dietanoloamina, 0.1% di MgCl₂, pH 9.8).
 - Blocco della reazione: dopo 30 minuti, a temperatura ambiente, è stata bloccata la reazione colorimetrica aggiungendo una soluzione di NaOH 1 M (50 µl per pozzetto).
 - Lettura: è stata effettuata tramite uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm.
- Test ELISA con BSA:

- *Coating*: adsorbimento dell'antigene sul fondo delle piastre in tampone PBS 1X pH 8 alla concentrazione 1 µg/100 µl; incubazione a 4 °C tutta la notte.
- Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione PBS 1X e 0,05% Tween 20.
- *Blocking*: sono stati saturati i siti liberi con una soluzione al 3% di BSA sciolta nella soluzione di lavaggio. Incubazione di un'ora.
- Lavaggio delle piastre una volta con la soluzione PBS 1X e 0,05% Tween 20.
- Applicazione siero: le diluizioni dei sieri (1:100, 1:1000, 1:10000) sono state fatte in una soluzione all'1% di BSA in PBS 1X e 0,05% Tween 20; sono stati messi 100 µl per pozzetto e sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente.
- Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione PBS 1X e 0,05% Tween 20.
- Aggiunta antisiero: gli anticorpi secondari anti IgG (1:8000) e anti IgM (1:200) sono stati diluiti in una soluzione all'1% di BSA in PBS 1X e 0,05% Tween 20. Incubazione di un'ora.
- Lavaggio delle piastre 5 volte con la soluzione PBS 1X e 0,05% Tween 20.
- Applicazione substrato: sono stati applicati 100 µl per pozzetto di substrato p-NPP (1 mg/ml) in soluzione tampone (10% dietanoloamina, 0.1% di MgCl₂, pH 9.8).
- Blocco della reazione: dopo 30 minuti, a temperatura ambiente, è stata bloccata la reazione colorimetrica aggiungendo una soluzione di NaOH 1 M (50 µl per pozzetto).
- Lettura: è stata effettuata tramite uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm.

5.5.12 Spettri di dicroismo circolare di rMOG_{ED}(His)₆

I campioni, di concentrazione 0,2 mg/ml ($1,2 \times 10^{-5}$ mol/L), sono stati inseriti in cuvette di quarzo dello spessore di 0,1 mm. Gli spettri sono stati registrati tra 200 nm e 250 nm a 25 °C in tampone PBS pH 8, con passo di 1 nm, larghezza di banda di 1 nm, velocità di scansione 50. Lo spettro è il risultato della media di 5 scansioni.

5.5.13 Test di espressione di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ in terreno NMM

Singole colonie, derivanti dalla trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e con pREP4, sono state utilizzate per inoculare 5 ml di NMM, contenente ampicillina e kanamicina; sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Cinque beute da fermentazione sono state preparate con 100 ml di NMM e sono state inoculate con 100 µl di precoltura: sono state quindi incubate a 37 °C, sotto agitazione, fino a che non è stato raggiunto il valore di OD₆₀₀=0,5-0,8. L'induzione dell'espressione è stata effettuata aggiungendo alla coltura 100 µl di IPTG (1 mM) e incubando a 30 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Aliquote di 500 µl sono state prelevate da ogni coltura prima e dopo l'induzione e sono state centrifugate a 17000 rpm per 10 minuti a 4 °C; è stato gettato il surnatante e ogni campione è stato preparato mediante aggiunta di *loading buffer*, riscaldato a 100 °C per 10 minuti e caricato (20 µl) nel gel di poliacrilammide al 12%.

I campioni caricati sono stati fatti correre applicando un voltaggio di 90 V. Il gel è stato staccato dalle apposite piastre, è stato colorato con *Blu Coomassie* per alcune ore e infine decolorato con *destaining solution*.

5.5.14 Test di espressione di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ in terreno M9

Singole colonie, derivanti dalla trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e con pREP4, sono state utilizzate per inoculare 5 ml di M9, contenente ampicillina e kanamicina; sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Cinque beute da fermentazione sono state preparate con 100 ml di M9 e sono state inoculate con 100 µl di precultura: sono state quindi incubate a 37 °C, sotto agitazione, fino a che non è stato raggiunto il valore di OD₆₀₀=0,5-0,8. L'induzione dell'espressione è stata effettuata aggiungendo alla coltura 100 µl di IPTG (1 mM) e incubando a 30 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Aliquote di 500 µl sono state prelevate da ogni coltura prima e dopo l'induzione e sono state centrifugate a 17000 rpm per 10 minuti a 4 °C; è stato gettato il surnatante e ogni campione è stato preparato mediante aggiunta di *loading buffer*, riscaldato a 100 °C per 10 minuti e caricato (20 µl) nel gel di poliacrilammide al 12%.

I campioni caricati sono stati fatti correre applicando un voltaggio di 90 V. Il gel è stato staccato dalle apposite piastre, è stato colorato con *Blu Coomassie* per alcune ore e infine decolorato con *destaining solution*.

5.5.15 Espressione in larga scala di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ in terreno M9

Una colonia, derivante dalla trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e con pREP4, è stata utilizzata per inoculare 5 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e kanamicina (70 µg/ml). Le cellule sono state incubate a 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

1 ml di precultura è stato inoculato in una beuta da fermentazione, preparata con 1 litro di M9: la coltura è stata incubata a 37 °C sotto agitazione

fino ad $OD_{600}=0,5-0,8$. E' stato aggiunto 1 ml di IPTG (1 mM) e la coltura è stata incubata alla temperatura di 30 °C, mantenendo l'agitazione, per tutta la notte.

5.5.16 Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi

La coltura è stata centrifugata a 4000 rpm per 30 minuti a 4 °C e il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 10 ml di *Soni Buffer* pH 8; sono stati aggiunti 400 µl di una soluzione 25X di inibitori delle proteasi e successivamente la sospensione è stata congelata a -20 °C per un giorno.

Alla sospensione scongelata è stata aggiunta una punta di spatola di lisozima ed è stata messa sotto agitazione, a temperatura ambiente, per 30 minuti. Successivamente è stato aggiunto LDAO 0,5% (0,83 ml ogni 50 ml di cellule) ed è stata effettuata la sonicazione, eseguendo 10 cicli da 30 secondi ed applicando una potenza del 60%.

Il lisato è stato centrifugato a 17000 rpm per 30 minuti a 4 °C ed il *pellet* ottenuto è stato omogeneizzato in "Potter" con 10 ml di una soluzione di *Soni Buffer* e LDAO 0,5%; la sospensione è stata centrifugata a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta tre volte.

Successivamente il *pellet* è stato omogeneizzato in "Potter" aggiungendo 10 ml di *Soni Buffer* e centrifugato a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta due volte.

I corpi inclusi così ottenuti sono stati solubilizzati aggiungendo 0,5 ml di *Soni Buffer* e 5 ml di *Buffer A* con Mercaptoetanolo 40 mM e lasciando agitare per 2 ore a temperatura ambiente. I corpi inclusi così solubilizzati, se non utilizzati subito, sono stati conservati congelati a -20 °C.

5.5.17 Purificazione e *refolding* di rMOG_{ED}^{15N}(His)₆

La purificazione su resina *Chelating Sepharose Fast Flow* è stata effettuata a temperatura ambiente.

La colonna Precision Column Holder XK16 è stata impaccata con resina *Chelating Sepharose Fast Flow* e collegata al cromatografo ÄKTA. La resina è stata lavata con H₂O, poiché è conservata in una soluzione al 20% di EtOH, quindi è stata rimossa dallo strumento, addizionata di NiSO₄ e posta ad agitare per 30 minuti al fine di permettere il legame tra il Ni²⁺ ed il gruppo acido iminodiacetico presente sulla resina.

Al termine dell'operazione la colonna è stata nuovamente collegata allo strumento e lavata con acqua per eliminare l'eccesso di ioni metallici; successivamente è stata equilibrata con *Buffer A* con Mercaptoetanololo 1 mM, con flusso di 1 ml/min.

Alla proteina derivante dalla solubilizzazione dei corpi inclusi è stato aggiunto *Buffer A*, in modo tale da poter ottenere una concentrazione finale di mercaptoetanololo di circa 2-3 mM; poi il campione è stato caricato in colonna (*loading* della resina: 5 mg/ml) e lasciato legare alla resina sotto agitazione per circa due ore.

La colonna è stata impaccata per gravità e collegata al cromatografo ÄKTA; il *refolding* della proteina è stato effettuato in colonna tramite applicazione di un gradiente dal 100% di *Buffer A* al 100% di *Buffer B* con glutatione in 10 ore a flusso 1 ml/min. E' stato poi applicato un altro gradiente dal 100% di *Buffer B* con glutatione al 100% di *Buffer B* in due ore, con flusso 1 ml/min, in modo da permettere la formazione del ponte disolfuro all'interno della proteina. L'eluizione della proteina è stata effettuata con 100% *EluBuffer*, flusso 1 ml/min, raccogliendo frazioni di 1 ml.

La concentrazione della proteina viene determinata tramite l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza dei campioni a 280 nm.

5.5.18 Dialisi di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆ in CH₃COONa pH 4.5

6 cm di membrana T3 (porosità 12000-14000 Da) sono stati fatti reidratare in acqua MilliQ per 30 minuti e sono stati caricati con 3 ml di eluato; la membrana è stata immersa in 500 ml di CH_3COONa 100 mM pH 4.5, mantenendo il tampone in agitazione per 2 ore e 30 minuti. La soluzione proteica è stata recuperata e filtrata con filtri 0,22 μm . La soluzione è stata concentrata in centricon (5000 NMWL), centrifugando a 4000 rpm per 5 minuti a 16 °C. La concentrazione della proteina dopo dialisi è stata determinata tramite la legge di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.19 Dialisi di $\text{rMOG}_{\text{ED}}^{15}\text{N}(\text{His})_6$ in NaH_2PO_4 pH 4.6

6 cm di membrana T3 (porosità 12000-14000 Da) sono stati fatti reidratare in acqua MilliQ per 30 minuti e caricati con 3 ml di eluato; la membrana è stata immersa in 500 ml di NaH_2PO_4 20 mM pH 4.6, portato a pH mediante aggiunta di H_3PO_4 , mantenendo il tampone in agitazione, per 24 ore. La soluzione proteica è stata recuperata e filtrata con filtri 0,22 μm . La soluzione è stata concentrata in centricon (5000 NMWL), centrifugando a 4000 rpm per 5 minuti a 16 °C. La concentrazione della proteina dopo dialisi è stata determinata tramite la legge di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.20 Spettri di dicroismo circolare di $\text{rMOG}_{\text{ED}}^{15}\text{N}(\text{His})_6$

I campioni, di concentrazione 0,3 mg/ml ($1,9 \times 10^{-5}$ mol/L), sono stati inseriti in cuvette di quarzo dello spessore di 0,1 mm. Gli spettri sono stati registrati tra 200 nm e 250 nm a differenti temperature (4 °C, 20 °C, 40 °C, 60 °C, 80 °C) e in differenti tamponi, con passo di 1 nm, larghezza di banda di 1 nm, velocità di scansione 50. Lo spettro è il risultato della media di 5 scansioni.

5.5.21 Spettri NMR di rMOG_{ED}¹⁵N(His)₆

Le analisi NMR sono state effettuate dalla Prof.ssa Anna Maria D'Ursi presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Salerno. I campioni per l'analisi NMR sono stati preparati aggiungendo a 500 µl di proteina concentrata (12,92 mg/ml) 20 µl di D₂O. Per l'analisi sono stati utilizzati tubi per NMR da 5 mm (NMR tube 5MM-600 MHZ 7", KONTES GLASS COMPANY). Gli spettri 2D NMR sono stati condotti a 600 MHz con lo strumento Bruker DRX 600 MHz Cryoprobe.

5.5.22 Trasformazione di ER2566 con pET22MOG_{ED}(1-117)(His)₆

70 µl di sospensione in glicerolo del ceppo di *E. coli* ER2566 [*F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]*] elettrocompetenti sono stati trasformati con 1 µl di plasmide pET22MOG_{ED}(1-117)(His)₆ (0,120 µg/µl). La sospensione cellulare e il plasmide sono stati introdotti in una cuvetta da elettroporazione di 1 mm di spessore, precedentemente raffreddata, e sottoposti ad elettroporazione a 2000 V per 5 ms. Le cellule trasformate sono state risospese in 300 µl di terreno SOC e trasferite in eppendorf per essere incubate a 37 °C, sotto agitazione, per un'ora. 50 e 100 µl di coltura sono stati piastrati su capsule Petri con LB Agar contenente ampicillina (100 µg/ml). Le piastre sono state incubate in stufa a 37°C per tutta la notte.

5.5.23 Test di espressione di rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ in terreno LB

Singole colonie, derivanti dalla trasformazione di ER2566 con pET22MOG_{ED}(1-117)(His)₆, sono state utilizzate per inoculare 5 ml di LB con

ampicillina (100 µg/ml); sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Cinque beute da fermentazione sono state preparate con 100 ml di LB con ampicillina (100 µg/ml) e sono state inoculate con 100 µl di precoltura: sono state quindi incubate a 37 °C, sotto agitazione, fino a che non è stato raggiunto il valore di $OD_{600}=0,5-0,8$. L'induzione dell'espressione è stata effettuata aggiungendo alla coltura 100 µl di IPTG (1 mM) e incubando a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Aliquote di 500 µl sono state prelevate da ogni coltura prima e dopo l'induzione e sono state centrifugate a 17000 rpm per 10 minuti a 4 °C; è stato gettato il surnatante e ogni campione è stato preparato mediante aggiunta di *loading buffer*, riscaldato a 100 °C per 10 minuti e caricato (20 µl) nel gel di poliacrilammide al 12%. I campioni caricati sono stati fatti correre applicando un voltaggio di 90 V. Il gel è stato staccato dalle apposite piastre, è stato colorato con *Blu Coomassie* per alcune ore e infine decolorato con *destaining solution*.

5.5.24 Espressione in larga scala di rMOG_{ED}(1-117)(His)₆ in terreno M9

Una colonia, derivante dalla trasformazione di ER2566 con pET22MOG_{ED}(1-117)(His)₆, è stata utilizzata per inoculare 5 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml). Le cellule sono state incubate a 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

Un'aliquota di 100 µl di precoltura è stata inoculata in una beuta da fermentazione preparata con 100 ml di LB contenente 100 µl di ampicillina; la coltura è stata incubata a 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

Successivamente la coltura è stata suddivisa in due falcon da 50 ml e centrifugata a 4000 rpm per 30 minuti a 4 °C; una parte del *pellet* ottenuto è stato risospeso in 15 ml di terreno M9. Ad 1 litro di M9, posto in una beuta da fermentazione, sono stati aggiunti tanti ml della sospensione cellulare fino a

raggiungere un valore di OD₆₀₀ pari a 0,1. La beuta è stata incubata a 37 °C sotto agitazione fino ad OD₆₀₀=0,5-0,8. E' stato aggiunto 1 ml di IPTG (1 mM) e la coltura è stata incubata alla temperatura di 30 °C, mantenendo l'agitazione, per tutta la notte.

5.5.25 Lisi cellulare e solubilizzazione dei corpi inclusi

La coltura è stata centrifugata a 4000 rpm per 30 minuti a 4 °C e il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 10 ml di *Soni Buffer* pH 8; sono stati aggiunti 400 µl di una soluzione 25X di inibitori delle proteasi e successivamente la sospensione è stata congelata a -20 °C per un giorno.

Alla sospensione scongelata è stata aggiunta una punta di spatola di lisozima ed è stata messa sotto agitazione, a temperatura ambiente, per 30 minuti. Successivamente è stato aggiunto LDAO 0,5% (0,83 ml ogni 50 ml di cellule) ed è stata effettuata la sonicazione, eseguendo 10 cicli da 30 secondi ed applicando una potenza del 60%.

Il lisato è stato centrifugato a 17000 rpm per 30 minuti a 4 °C ed il *pellet* ottenuto è stato omogeneizzato in "Potter" con 10 ml di una soluzione di *Soni Buffer* e LDAO 0,5%; la sospensione è stata centrifugata a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta tre volte.

Successivamente il *pellet* è stato omogeneizzato in "Potter" aggiungendo 10 ml di *Soni Buffer* e centrifugato a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta due volte.

I corpi inclusi così ottenuti sono stati solubilizzati aggiungendo 0,5 ml di *Soni Buffer* e 5 ml di *Buffer A* con Mercaptoetanolo 40 mM e lasciando agitare per 2 ore a temperatura ambiente. I corpi inclusi così solubilizzati, se non utilizzati subito, sono stati conservati congelati a -20°C.

5.5.26 Purificazione e *refolding* di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N (His)₆

La purificazione su resina *Chelating Sepharose Fast Flow* è stata effettuata a temperatura ambiente.

La colonna Precision Column Holder XK16 è stata impaccata con resina *Chelating Sepharose Fast Flow* e collegata al cromatografo ÄKTA. La resina è stata lavata con H₂O, poiché è conservata in una soluzione al 20% di EtOH, quindi è stata rimossa dallo strumento, addizionata di NiSO₄ e posta ad agitare per 30 minuti al fine di permettere il legame tra il Ni²⁺ ed il gruppo acido iminodiacetico presente sulla resina.

Al termine dell'operazione la colonna è stata nuovamente collegata allo strumento e lavata con acqua per eliminare l'eccesso di ioni metallici; successivamente è stata equilibrata con *Buffer A* con Mercaptoetanolo 1 mM, con flusso di 1 ml/min.

Alla proteina derivante dalla solubilizzazione dei corpi inclusi è stato aggiunto *Buffer A*, in modo tale da poter ottenere una concentrazione finale di mercaptoetanolo di circa 2-3 mM; poi il campione è stato caricato in colonna (*loading* della resina: 5 mg/ml) e lasciato legare alla resina sotto agitazione per circa due ore.

La colonna è stata impaccata per gravità e collegata al cromatografo ÄKTA; il *refolding* della proteina è stato effettuato in colonna tramite applicazione di un gradiente dal 100% di *Buffer A* al 100% di *Buffer B* con glutatione in 10 ore a flusso 1 ml/min. E' stato poi applicato un altro gradiente dal 100% di *Buffer B* con glutatione al 100% di *Buffer B* in due ore, con flusso 1 ml/min, in modo da permettere la formazione del ponte disolfuro all'interno della proteina. L'eluizione della proteina è stata effettuata con 100% *EluBuffer*, flusso 1 ml/min, raccogliendo frazioni di 1 ml.

La concentrazione della proteina eluita è stata determinata tramite l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.27 Dialisi di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆ in tampone fosfato 20 mM pH 4.7

Circa 6 cm di membrana T2 (porosità 6000-8000 Da; 1,99 ml/1 cm) sono stati fatti reidrattare in acqua MilliQ per 20 minuti e sono stati caricati con 2 ml di eluato; la membrana è stata immersa in 500 ml di tampone fosfato 20 mM pH 4.7, mantenendo il tampone in agitazione per tutta la notte. La soluzione proteica è stata recuperata e centrifugata per eliminare eventuali precipitati, quindi è stata determinata la concentrazione del campione utilizzando l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.28 Dialisi di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆ in tampone fosfato 20 mM pH 6

Circa 6 cm di membrana T2 (porosità 6000-8000 Da; 1,99 ml/1 cm) sono stati fatti reidrattare in acqua MilliQ per 20 minuti e sono stati caricati con 2 ml di eluato; la membrana è stata immersa in 500 ml di tampone fosfato 20 mM pH 6, mantenendo il tampone in agitazione per tutta la notte. La soluzione proteica è stata recuperata e centrifugata per eliminare eventuali precipitati, quindi è stata misurata la concentrazione del campione utilizzando l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.29 Dialisi di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆ in tampone fosfato 20 mM a pH 8

Circa 6 cm di membrana T2 (porosità 6000-8000 Da; 1,99 ml/1 cm) sono stati fatti reidrattare in acqua MilliQ per 20 minuti e sono stati caricati con 2 ml di eluato; la membrana è stata immersa in 500 ml di tampone fosfato 20 mM pH 8, mantenendo il tampone in agitazione per tutta la notte. La

soluzione proteica è stata recuperata e centrifugata per eliminare eventuali precipitati, quindi è stata misurata la concentrazione del campione utilizzando l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.5.30 Spettri di dicroismo circolare di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆

400 µl dei campioni della soluzione proteica in tampone fosfato a diverso pH sono stati inseriti in cuvette di quarzo dello spessore di 0,1 mm. La concentrazione del campione deve essere compresa tra 10⁻⁶ e 10⁻⁵ M.

Gli spettri sono stati registrati tra 200 nm e 250 nm a differenti temperature (4 °C, 20 °C, 40 °C, 60 °C, 80 °C e quindi nuovamente a 4 °C), con passo di 1 nm, larghezza di banda di 1 nm, velocità di scansione 50. Lo spettro ottenuto è il risultato della media di 5 scansioni.

Gli spettri sono stati registrati con cadenza settimanale per un mese e hanno consentito di valutare la bontà dei diversi tamponi utilizzati tramite l'osservazione delle alterazioni subite dalla struttura secondaria della proteina.

5.5.31 Spettrometria di massa di rMOG_{ED}(1-117)¹⁵N(His)₆

8 µl del campione proteico sia in EluBuffer (0,59 mg/ml) che in tampone fosfato 20 mM a pH 8 (0,48 mg/ml) sono stati iniettati nello spettrometro ESI Q-TOF Micromass (Waters) abbinato a Cap-LC al fine di determinare l'assenza di contaminazioni e la percentuale di isotopo ¹⁵N effettivamente incorporato.

5.6 Parte Sperimentale: Parte B

5.6.1 Mutagenesi sito-specifica sul plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆

La mutagenesi sito-specifica è stata condotta seguendo il protocollo QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Le sequenze nucleotidiche dei *primer* mutagenici che sostituiscono Asn³¹ (ATT) con Cys³¹ (TGT) nel plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆ sono le seguenti:

- rMOG_{ED}N31C forward:
5'-CTCCTGGGAAGTGTGCCACGGGCATG-3';
- rMOG_{ED}N31C reverse:
5'-CATGCCCGTGGCACACTTCCCAGGAG-3'.

Il vettore utilizzato è stato pQE12rMOG_{ED}(His)₆ e le quantità per una reazione sono riportate di seguito:

DNA plasmidico (50, 25 e 10 ng)	1 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
Pfor (125 ng)	1 µl
Prev (125 ng)	1 µl
<i>PfuTurbo</i> ® polimerasi (2,5 U/µl)	1 µl
tampone di reazione 10X	5 µl
H ₂ O sterile	40 µl

La DNA polimerasi è stata aggiunta alla fine, poco prima di iniziare procedere la reazione.

Lo schema di reazione è stato il seguente (Fig. 62):

- 1 ciclo: 95°C per 30 secondi
- 16 cicli: 95°C per 30 secondi (denaturazione del DNA stampo), 55°C per 1 minuto (appaiamento degli inneschi), 68 °C per 4 minuti (estensione della polimerasi).

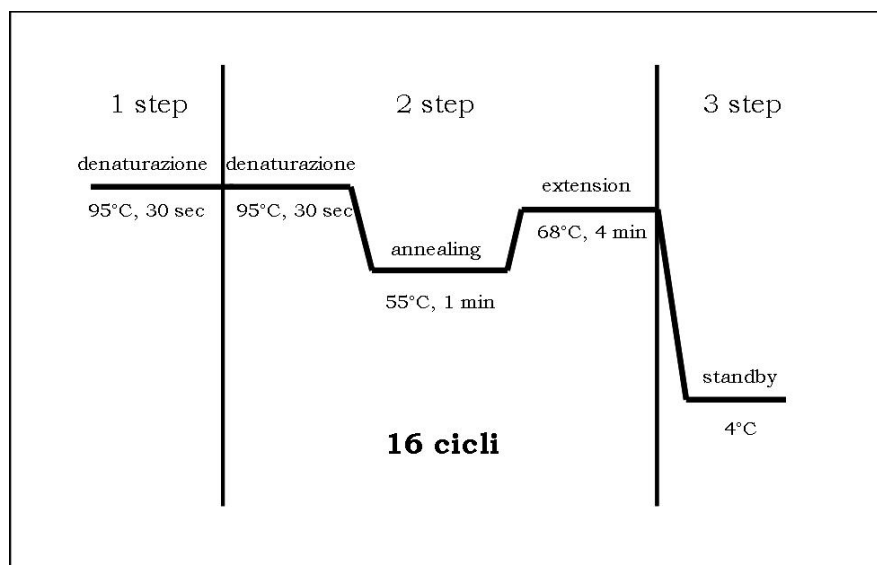


Figura 62. Ciclo per la mutagenesi sito specifica.

Alla fine di questo processo, al campione è stato aggiunto 1 μ l di *DpnI* (10 U/ μ l) e la reazione è stata incubata a 37 °C per un'ora per permettere la digestione del DNA parenterale.

50 μ l di cellule elettrocompetenti del ceppo *E. coli* DH5 α sono state trasformate con 1 μ l della soluzione di reazione. La sospensione cellulare e la soluzione sono stati introdotti in una cuvetta da elettroporazione di 1 mm di spessore, precedentemente raffreddata, e sottoposti ad elettroporazione a 1650 V per 5 ms. Le cellule trasformate sono state risospese in 1 ml di terreno LB e trasferite in eppendorf per essere incubate a 37 °C, sotto agitazione, per un'ora. 250 μ l di coltura sono stati piastrati su capsule Petri con LB Agar contenente ampicillina (100 μ g/ml). Le piastre sono state incubate in stufa a 37 °C per tutta la notte.

Successivamente singole colonie sono state utilizzate per inoculare 5 ml di LB con ampicillina (100 μ g/ml); sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Il plasmide pQE12rMOG_{ED}N31C(His)₆ è stato estratto dalle singole colonie utilizzando un kit commercializzato da Qiagen (*Miniprep Qiagen*), seguendo il protocollo del manuale allegato.

Dopo il processo di purificazione, è stata determinata la concentrazione del DNA plasmidico mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm.

Il campione infine è stato conservato a -20 °C.

5.6.2 Sequenziamento del DNA plasmidico

Il passaggio successivo ha previsto il controllo dell'inserto mutato mediante sequenziamento al fine di verificare che sia stata introdotta la mutazione giusta e non altre.

Le quantità per una reazione sono riportate di seguito:

DNA plasmidico (500 ng)	5 µl
Big Dye V3.1	2 µl
<i>primer</i> (3,3 pmol)	1 µl
betaina 5 M	2 µl
tampone di reazione	2 µl

Lo schema di reazione è stato il seguente (Fig. 63):

- 1 ciclo: 95°C per 1 minuto;
- 50 cicli: 95°C per 15 secondi, 58°C per 4 minuti.

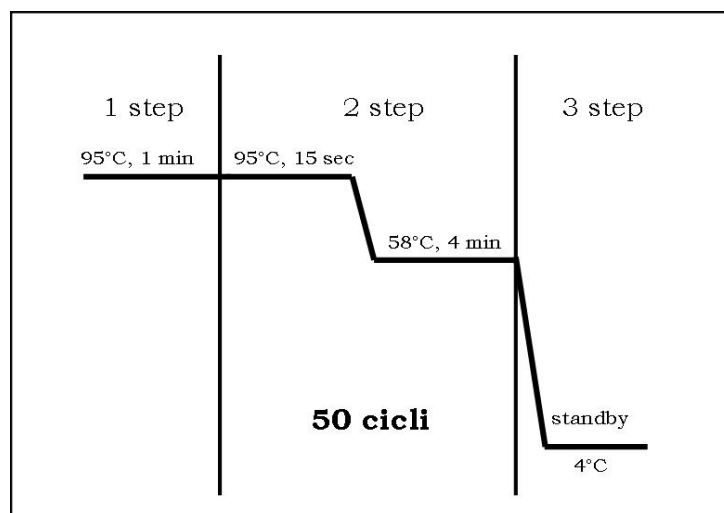


Figura 63. Ciclo per il sequenziamento del DNA plasmidico.

Finita la reazione sono stati aggiunti 10 μ l di H₂O ad ogni campione. La miscela di reazione è stata caricata su colonna g-50 ed è stata centrifugata a 2000 rpm per 1 minuto. L'eluato è stato seccato e sequenziato.

5.6.3 Trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}N31C(His)₆ e pREP4

70 μ l di sospensione in glicerolo del ceppo di *E. coli* ER2566 [*F*- λ -*fhuA2* [*lon*] *ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11* Δ (*mcrC-mrr*)114::*IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]*] elettrocompetenti sono stati trasformati con 1 μ l di plasmide pQE12rMOG_{ED}N31C(His)₆ (0,120 μ g/ μ l) e con 1 μ l di plasmide pREP4 (0,120 μ g/ μ l); la sospensione e i plasmidi sono stati introdotti in una cuvetta da elettroporazione di 1 mm di spessore, precedentemente raffreddata, e sottoposti ad elettroporazione a 2000 V per 5 ms. Le cellule trasformate sono state risospese in 300 μ l di SOC e trasferite in eppendorf per essere incubate a 37 °C, sotto agitazione, per un'ora. 100 e 50 μ l di coltura sono stati piastrati su capsule di Petri con LB Agar contenenti

ampicillina (100 µg/ml) e kanamicina (70 µg/ml); le piastre sono state incubate in stufa a 37 °C per tutta la notte.

5.6.4 Test di espressione di rMOG_{ED}N31C(His)₆ in terreno LB

Singole colonie, derivanti dalla trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}N31C(His)₆ e con pREP4, sono state utilizzate per inoculare 5 ml di LB, a cui sono stati aggiunti 5 µl di ampicillina (100 µg/ml) e 5 µl di kanamicina (70 µg/ml); sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Cinque beute da fermentazione sono state preparate con 100 ml di LB, 100 µl di ampicillina (100 µg/ml), 100 µl di kanamicina (70 µg/ml) e inoculate con 100 µl di precoltura: sono state quindi incubate a 37 °C, sotto agitazione, fino a che non è stato raggiunto il valore di OD₆₀₀=0,5-0,8. L'induzione dell'espressione è stata effettuata aggiungendo alla coltura 100 µl di IPTG (1 mM) e incubando a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

Aliquote di 500 µl sono state prelevate da ogni coltura prima e dopo l'induzione e sono state centrifugate a 17000 rpm per 10 minuti a 4 °C; è stato gettato il surnatante e ogni campione è stato preparato mediante aggiunta di *loading buffer*, riscaldato a 100 °C per 10 minuti e caricato (20 µl) nel gel di poliacrilammide al 12%.

I campioni caricati sono stati fatti correre applicando un voltaggio di 90 V. Il gel è stato staccato dalle apposite piastre, è stato colorato con *Blu Coomassie* per alcune ore e infine decolorato con *destaining solution*.

5.6.5 Espressione in larga scala di rMOG_{ED}N31C(His)₆ in LB

Una colonia, derivante dalla trasformazione di ER2566 con pQE12rMOG_{ED}N31C(His)₆ e con pREP4, è stata utilizzata per inoculare 5 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e kanamicina (70 µg/ml). Le cellule sono state incubate a 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

1 ml di precultura è stato inoculato in una beuta da fermentazione, preparata con 1 litro di LB, a cui sono stati aggiunti 1 ml di ampicillina (100 µg/ml) ed 1 ml di kanamicina (70 µg/ml): la coltura è stata incubata a 37 °C sotto agitazione fino ad OD₆₀₀=0,5-0,8. E' stato aggiunto 1 ml di IPTG (1 mM) e la coltura è stata incubata a 37 °C, mantenendo l'agitazione, per tutta la notte.

5.6.6 Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi

La coltura è stata centrifugata a 4000 rpm per 30 minuti a 4 °C e il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 10 ml di *Soni Buffer* pH 8; sono stati aggiunti 400 µl di una soluzione 25X di inibitori delle proteasi e successivamente la sospensione è stata congelata a -20 °C per un giorno.

Alla sospensione scongelata è stata aggiunta una punta di spatola di lisozima ed è stata messa sotto agitazione, a temperatura ambiente, per 30 minuti. Successivamente è stato aggiunto LDAO 0,5% (0,83 ml ogni 50 ml di cellule) ed è stata effettuata la sonicazione, eseguendo 10 cicli da 30 secondi ed applicando una potenza del 60%.

Il lisato è stato centrifugato a 17000 rpm per 30 minuti a 4 °C ed il *pellet* ottenuto è stato omogeneizzato in "Potter" con 10 ml di una soluzione di *Soni Buffer* e LDAO 0,5%; la sospensione è stata centrifugata a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta tre volte.

Successivamente il *pellet* è stato omogeneizzato in "Potter" aggiungendo 10 ml di *Soni Buffer* e centrifugato a 17000 rpm per 20 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta due volte.

I corpi inclusi così ottenuti sono stati solubilizzati aggiungendo 0,5 ml di *Soni Buffer* e 5 ml di *Buffer A* con Mercaptoetanolo 40 mM e lasciando agitare

per 2 ore a temperatura ambiente. I corpi inclusi così solubilizzati, se non utilizzati subito, sono stati conservati congelati a -20°C .

5.6.7 Purificazione e *refolding* di rMOG_{ED}N31C(His)₆

La purificazione su resina *Chelating Sepharose Fast Flow* è stata effettuata a temperatura ambiente.

La colonna Precision Column Holder XK16 è stata impaccata con resina *Chelating Sepharose Fast Flow* e collegata al cromatografo ÄKTA. La resina è stata lavata con H₂O, poiché è conservata in una soluzione al 20% di EtOH, quindi è stata rimossa dallo strumento, addizionata di NiSO₄ e posta ad agitare per 30 minuti al fine di permettere il legame tra il Ni²⁺ ed il gruppo acido iminodiacetico presente sulla resina.

Al termine dell'operazione la colonna è stata nuovamente collegata allo strumento e lavata con acqua per eliminare l'eccesso di ioni metallici; successivamente è stata equilibrata con *Buffer A* con Mercaptoetanololo 1 mM, con flusso di 1 ml/min.

Alla proteina derivante dalla solubilizzazione dei corpi inclusi è stato aggiunto *Buffer A*, in modo tale da poter ottenere una concentrazione finale di mercaptoetanololo di circa 2-3 mM; poi il campione è stato caricato in colonna (*loading* della resina: 5 mg/ml) e lasciato legare alla resina sotto agitazione per circa due ore.

La colonna è stata impaccata per gravità e collegata al cromatografo ÄKTA; il *refolding* della proteina è stato effettuato in colonna tramite applicazione di un gradiente dal 100% di *Buffer A* al 100% di *Buffer B* con glutatione in 10 ore a flusso 1 ml/min. E' stato poi applicato un altro gradiente dal 100% di *Buffer B* con glutatione al 100% di *Buffer B* in due ore, con flusso 1 ml/min, in modo da permettere la formazione del ponte disolfuro all'interno della proteina. L'eluizione della proteina è stata effettuata con 100% *EluBuffer*, flusso 1 ml/min, raccogliendo frazioni di 1 ml.

La concentrazione della proteina eluita è stata determinata tramite l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm.

5.6.8 Dialisi di rMOG_{EDN}(31)C(His)₆ in tampone fosfato 20 mM pH 8

È stata fatta reidrattare la membrana T2 (porosità 6000-8000 Da; 1,99 ml/1 cm) in acqua *milliQ* per 30 minuti. La membrana è stata caricata con il campione eluito ed è stata immersa in 500 ml di tampone fosfato 20 mM a pH 8 mantenendo costante l'agitazione tutta la notte. La concentrazione molare della proteina è stata determinata tramite l'equazione di Lambert-Beer misurando l'assorbanza a 280 nm. L'assorbanza viene poi moltiplicata per il fattore di conversione ($PM_{mog}/\epsilon_{mog} = 0,83$) per ottenere la concentrazione in mg/ml.

5.6.9 Spettri di massa di rMOG_{EDN}(31)C(His)₆

Sono stati registrati spettri di massa della frazione purificata tramite resina Ni-IDA di rMOG_{EDN}(31)C(His)₆: è stato preparato un campione di 50 μ l di volume (concentrazione 0,45 mg/ml).

È stato utilizzato lo spettrofotometro ESI Q-TOF (*Electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometer*) e la deconvoluzione tramite *software* Mass Lynk.

5.6.10 Curva di taratura per il saggio delle cisteine libere

Sono stati disciolti 5 mg di DNTB in 5 ml di DNTB *Buffer* (fosfato di sodio 0,1 M pH 8). E' stata preparata una soluzione madre di L-cisteina cloridrata monoidrata (32 mg) in 1 ml di acqua. Sono state fatte una serie di diluizioni della soluzione per ottenere delle soluzioni standard contenenti L-cisteina cloridrata monoidrata con concentrazione compresa tra 0,4 e 0,04 mg/ml.

Sono state preparate tante cuvette quanti sono gli standards per la cisteina, in una è stata messa acqua per il bianco.

In ogni cuvetta sono stati messi 50 µl di soluzione standard, a cui sono stati aggiunti 100 µl di acqua, 750 µl di DNTB *Buffer* e immediatamente il reagente DNTB (1 mg/1 ml) ottenendo il volume finale di 1 ml.

Le cuvette sono state mescolate ed infine è stata misurata l'assorbanza a 412 nm.

Utilizzando i valori dell'assorbanza e della concentrazione è stata costruita una retta di taratura dalla quale si calcola il coefficiente di correlazione lineare tra le due variabili (Fig. 64).

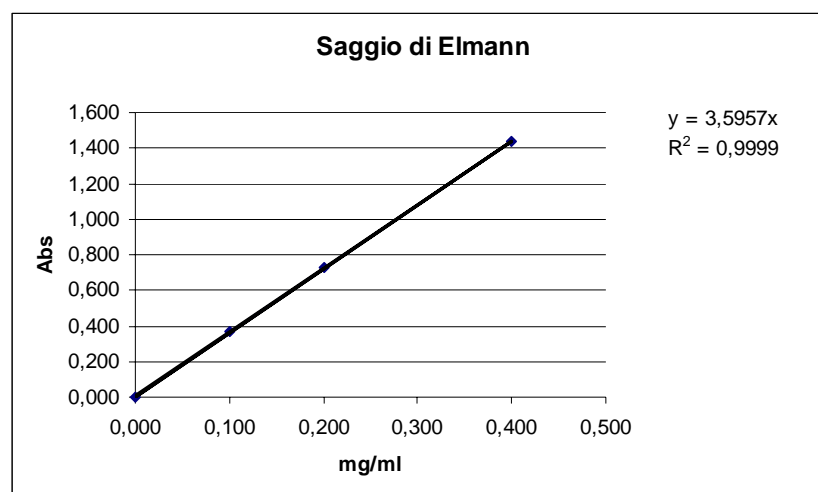


Figura 64. Retta di taratura del saggio di Elmann.

Campioni a concentrazione ignota sono stati trattati con il reagente di Elmann per determinare la concentrazione delle cisteine libere. Letta

l'assorbanza, per interpolazione con la retta di taratura, è stata ricavata la concentrazione.

5.6.11 Glicosilazione di rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ in *EluBuffer* pH 8

La proteina in tampone *EluBuffer* pH 8 è stata trattata con 1-N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio ad una concentrazione di 10 mM (eccesso di 500X). Sono stati prelevati 50 μ l di campione per fare un'analisi allo spettrometro ESI Q-TOF al tempo 0. La reazione è stata poi lasciata andare per 24 h sotto agitazione con esclusione della luce.

Sono stati effettuati nuovi prelievi di 50 μ l dopo 24 e 48 ore per analizzare l'andamento della reazione allo spettrometro ESI Q-TOF.

5.6.12 Glicosilazione di rMOG_{ED}N(31)C(His)₆ in tampone fosfato 20 mM pH 8

Alla proteina in tampone fosfato 20 mM pH 8 è stato aggiunto 1-N-[1-(2-iodo)acetil]- β -D-glucopiranosio ad una concentrazione di 10 mM (eccesso di 500X). Sono stati prelevati 50 μ l di campione per fare un'analisi allo spettrometro ESI Q-TOF al tempo 0. La reazione è stata lasciata andare per 24 h sotto agitazione, avendo cura di non esporre alla luce la soluzione.

Sono stati effettuati prelievi di 50 μ l dopo 24 e 48 ore per analizzare l'andamento della reazione allo spettrometro ESI Q-TOF.

5.6.13 Trasformazione di DH5 α con pQE12rMOG_{ED}(His)₆ ed isolamento del plasmide

70 μ l del ceppo di *E. coli* DH5 α [*F*⁺ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(*r_K m_K*⁺), λ -] chemocompetenti (glicerina 15 %, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, MOPS 10 mM) sono stati trasformati con 0,120 μ g di plasmide pQE12rMOG_{ED}(His)₆. Le cellule sono state incubate in ghiaccio per 30 minuti per permettere al DNA di entrare, poi a 42 °C per 2 minuti e di nuovo in ghiaccio per 2 minuti. Dopo che il DNA è penetrato all'interno dei batteri, è necessario aspettare che il gene per la resistenza all'antibiotico si esprima. Molti ricercatori ritengono benefico introdurre a questo punto un rapido shock termico (1 minuto a 42°C, seguito da 1 minuto in ghiaccio), poiché è noto che questo trattamento promuove la sintesi proteica cellulare.*

Alla sospensione cellulare sono stati aggiunti 200 μ l di terreno LB e, successivamente, è stata tenuta a 37 °C sotto agitazione per un'ora. 100 della sospensione delle cellule trasformate sono stati piastrati su piastre Petri contenenti LB Agar con ampicillina (100 μ g/ml), per la selezione, ed incubate in stufa a 37 °C per tutta la notte.

Singole colonie sono state utilizzate per inoculare 5 ml di LB contenente 5 μ l di ampicillina (100 μ g/ml) e sono state incubate a 37 °C, sotto agitazione, per tutta la notte.

La purificazione del DNA plasmidico è stata effettuata utilizzando il kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* commercializzato dalla Promega, seguendo il protocollo del manuale allegato. Questo metodo si basa su tre passaggi consecutivi: una lisi alcalina delle cellule batteriche, l'adsorbimento selettivo del DNA plasmidico superavvolto su di una membrana ed infine l'eluizione con un tampone a bassa forza ionica. Questo kit rappresenta un mezzo facile e veloce che consente anche di ottenere un DNA sufficientemente puro per il clonaggio ed il sequenziamento.

Dopo il processo di purificazione, è stata determinata la concentrazione del DNA plasmidico mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm.

Il campione infine è stato conservato a -20 °C

5.6.14 Amplificazione tramite PCR del frammento rMOG_{ED}(1-97)

Il DNA plasmidico pQE12rMOG_{ED}(His)₆ (104,2 ng/μl) isolato dalle colonie di *E. coli* DH5α tramite protocollo *MiniPrep* e' stato utilizzato per amplificare il cDNA.

Prima di effettuare la PCR è stata condotta una *gradient* PCR per determinare quale sia la temperatura migliore per la fase di *annealing*; l'intervallo di temperatura considerato è stato 50-66 °C deciso in base alla temperatura di *melting* dei *primer*.

Le quantità per una reazione sono riportate di seguito:

DNA plasmidico (10 ng)	1 μl
dNTPs 10 mM	1 μl
Pfor (100 ng)	1 μl
Prev (100 ng)	1 μl
Pfu DNA polimerasi	0,5 μl
Pfu <i>Buffer</i> 10× (POLYMED)	2,5 μl
H ₂ O sterile	18 μl

E' stato deciso di effettuare la *gradient* PCR su 8 campioni contenenti il plasmide più un controllo negativo (senza plasmide). Ogni campione è stato sottoposto ad una diversa temperatura di *annealing*.

Gli oligonucleotidi usati sono stati:

- rMOG_{ED}(1-97) forward:

5'-GCCGCCATATGGGACAGTTCAGAGTGATAGG-3'

- rMOG_{ED}(1-97) reverse:

5'-GCCGCCGCTCTCCGCATGTGTAGCCTCCTTCATCC-3'

Lo schema di reazione è stato quello riportato in Figura 65.

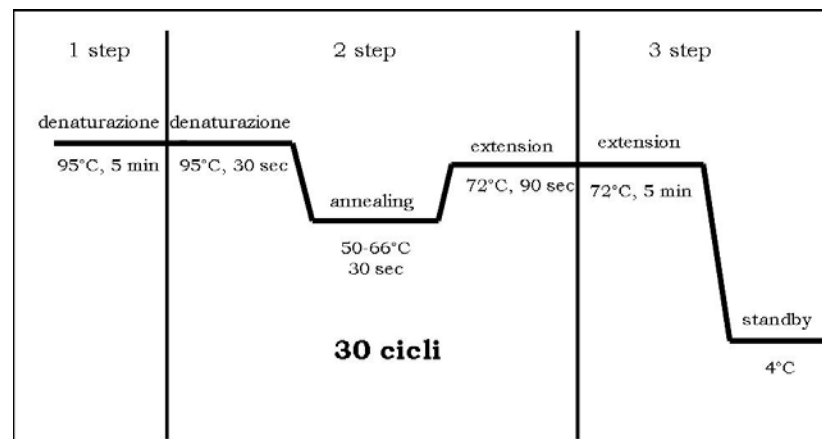


Figura 65. Ciclo per la gradient PCR.

Il primo *step* è stato eseguito solo al primo ciclo, l'ultimo *step* è stato eseguito solo alla fine mentre gli altri sono stati ripetuti per 30 cicli.

Per capire se il frammento è stato amplificato è stata effettuata un'elettroforesi su gel di agarosio all'1% caricando su di esso i prodotti della PCR e il *marker* MassRuler™ DNA Ladders Low Range (Fermentas) ed applicando una tensione di 80 V.

Elettroforesi DNA su gel di agarosio è una tecnica con principi molto simili all'elettroforesi di proteine; infatti è possibile separare frammenti di acido nucleico in base al peso molecolare.

I frammenti di DNA, carichi negativamente per i residui di fosfato, in un campo elettrico tendono ad andare verso il polo positivo. Usando una griglia molecolare costituita da agarosio (zucchero estratto da un'alga marina) lasciato polimerizzare a temperatura ambiente, i frammenti passano attraverso di essa. Il *range* di separazione dell'elettroforesi varia in base alla percentuale di agarosio utilizzato.

Il gel viene fatto polimerizzare insieme al bromuro di etidio che intercalandosi fra le catene del DNA permette di visualizzare la corsa dei frammenti osservando la fluorescenza all'UV del bromuro di etidio. Dopo aver fatto polimerizzare il gel ed averlo caricato sul supporto, si caricano i campioni e l'opportuno *marker* il quale ci permette di poter capire la lunghezza del

frammento analizzato grazie alla corrispondenza della banda del *marker* con la banda del campione.

I vari stadi operativi della preparazione del gel all' 1% in TAE e del caricamento dei campioni vengono di seguito elencati:

- riscaldamento della soluzione all'1% di agarosio in TAE;
- raffreddamento della soluzione ormai diventata limpida;
- aggiunta del bromuro di etidio;
- posizionamento del gel liquido nell'apposita vasca per elettroforesi;
- inserimento del pettine e raffreddamento del gel per la polimerizzazione;
- riempimento della vasca con TAE;
- caricamento dei campioni negli appositi pozzetti, creati con l'ausilio del pettine;
- applicazione di una tensione di 80 V.

Tabella 32: gel agarosio 1% (70 ml)

Agarosio	0,7 g
TAE	70 ml
Bromuro di etidio	1 ul

Tabella 33: TAE 10X pH 8.3

Tris	400 mM
EDTA	1 mM

Finita la corsa il gel è stato analizzato all'UV così da poter evidenziare la fluorescenza del bromuro di etidio intercalato fra le basi del DNA.

E' stato deciso di utilizzare la temperatura di *annealing* di 65 °C.

A questo punto è stato possibile effettuare la PCR per amplificare il frammento rMOG_{ED}(1-97) con inseriti i siti di restrizione. Sono state utilizzate

quantità doppie rispetto a quelle usate nella gradient PCR in modo tale da avere più campione per effettuare i passaggi successivi.

Il programma della PCR è stato come quello riportato in Figura 66.

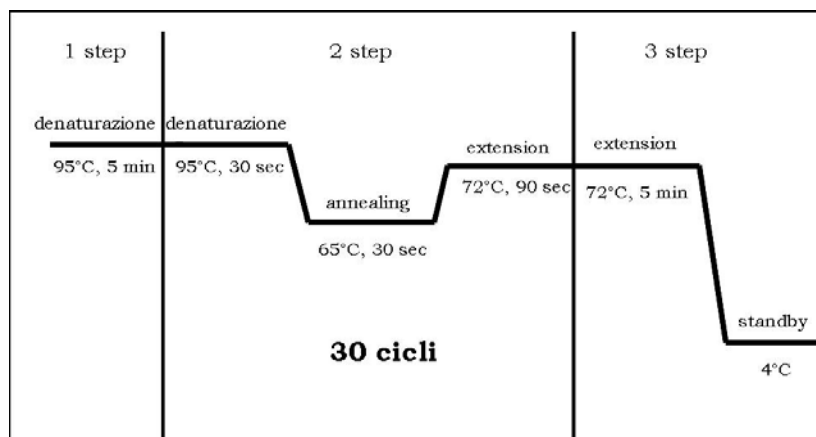


Figura 66. Ciclo per l'amplificazione del frammento rMOG_{ED}(1-97).

Il primo *step* è stato eseguito solo al primo ciclo, l'ultimo *step* è stato eseguito solo alla fine mentre gli altri sono stati ripetuti per 30 cicli.

Una volta terminata è stata purificata la soluzione di reazione utilizzando il kit *Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System* (Promega) ottenendo così il cDNA del frammento amplificato di rMOG_{ED}(1-97).

La misura della concentrazione del frammento è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm. Il campione infine è stato conservato a -20 °C.

5.6.15 *Double digestion* del plasmide pTXB1

Sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione NdeI e LguI (isoschizomero di SapI) acquistati da Fermentas. Questi enzimi hanno attività nello stesso tampone ma con una concentrazione diverse; quindi è stata condotta prima la digestione con LguI usando una quantità di Tango *Buffer* 10X (Fermentas) tale che la concentrazione finale sia 1X, poi con l'enzima NdeI aggiungendo Tango *Buffer* 10X in modo tale che la concentrazione finale sia 2X.

Pertanto le quantità per la digestione di pTXB1 con il primo enzima di restrizione sono state:

- 50 µl pTXB1 (100 ng/µl)
- 6 µl Tango *Buffer* 10X
- 1 µl LguI
- 5 µl H₂O sterile.

La soluzione di reazione è stata tenuta a 37 °C per 3 ore sotto agitazione.

Successivamente l'enzima LguI è stata inattivato tenendo la soluzione a 65 °C per 20 minuti.

Per effettuare la digestione con l'enzima NdeI, alla soluzione sono stati aggiunti:

- 1 µl NdeI
- 7 µl Tango *Buffer* 10X
- 2 µl H₂O sterile.

La soluzione di reazione è stata tenuta a 37 °C per 3 ore sotto agitazione e l'enzima è stato poi inattivato a 65 °C per 20 minuti.

La soluzione contenente il plasmide pTXB1 digerito è stata purificata tramite il kit *Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System* (Promega).

Successivamente il plasmide è stato defosforilato alle sue estremità 5' in modo tale che non ricircularizzi. Come fosfatasi è stata usata la *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP).

Le quantità per la reazione di desforilazione sono state:

- 30 µl pTXB1 digerito
- 4 µl Buffer SAP 10X

- 1 μ l SAP
- 5 μ l H₂O sterile.

La reazione è stata condotta a 18 °C per 12 ore.

Il plasmide pTXB1 è stato nuovamente purificato tramite il kit *Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System* (Promega) misurando la sua concentrazione (32,8 ng/ μ l) a 260 nm.

5.6.16 *Double digestion* del frammento amplificato

Sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione NdeI e LguI (isoschizomero di SapI) acquistati da Fermentas.

Le quantità per la digestione del con l'enzima di restrizione LguI sono state:

- 70 μ l cDNA rMOG_{ED}(1-97) (83,6 ng/ μ l)
- 8 μ l Tango Buffer 10X
- 2 μ l LguI.

La soluzione di reazione è stata tenuta a 37 °C per 3 ore sotto agitazione.

Successivamente l'enzima LguI è stata inattivato tenendo la soluzione a 65 °C per 20 minuti.

Per effettuare la digestione con l'enzima NdeI, alla soluzione sono stati aggiunti:

- 10 μ l Tango Buffer 10X
- 2 μ l NdeI
- 8 μ l H₂O sterile.

La soluzione di reazione è stata tenuta a 37 °C per 3 ore sotto agitazione e l'enzima è stato poi inattivato a 65 °C per 20 minuti.

La soluzione contenente il cDNA digerito è stata purificata tramite il kit *Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System* (Promega) misurando la sua concentrazione (51,2 ng/ μ l) a 260 nm.

5.6.17 *Ligation* tra il frammento amplificato e il vettore pTXB1

Sono state condotte delle prove di ligazione tra il cDNA e il vettore pTXB1 considerando rapporti di massa (o di paia di basi) diversi e temperature diverse.

I rapporti vettore/cDNA utilizzati sono stati 1:3, 1:5 e 1:10 prendendo per ognuno 50 ng; quindi la quantità di vettore da utilizzare è stata sempre la stessa (1,36 µl) mentre è variata la quantità di cDNA (0,13 µl, 0,22 µl, 0,44 µl).

Queste quantità sono state aggiunte a miscele di reazioni date da:

- 1 µl T4 DNA ligasi Buffer 10X
- 1 µl T4 DNA ligasi
- 6,5 µl H₂O sterile.

Le temperature di reazione sono state 4 °C e 18 °C; le reazioni sono durate 18 ore.

Per stabilire se la ligazione è avvenuta è stata condotta una *colony* PCR, cioè è stata effettuata la PCR sulle colonie presenti sul terreno LB Agar determinando così i cloni che hanno il vettore giusto e da questi, effettuando una miniprep, è possibile ottenere il vettore in maggiore quantità.

Pertanto cellule chemocompetenti del ceppo DH5α di *E. coli* sono state trasformate con le soluzioni della reazione di ligazione. Le cellule sono state incubate in ghiaccio per 30 minuti per permettere al DNA di entrare, poi a 42 °C per 2 minuti e di nuovo in ghiaccio per 2 minuti.

Alla sospensione cellulare sono stati aggiunti 200 µl di terreno LB e, successivamente, è stata tenuta a 37 °C sotto agitazione per un'ora.

100 della sospensione delle cellule trasformate sono stati piastrati su piastre Petri contenenti LB Agar con ampicillina (100 µg/ml), per la selezione, ed incubate in stufa a 37 °C per tutta la notte.

Le quantità per quattro reazioni sono riportate di seguito:

- 10 µl Buffer + (NH₄)₂SO₄10X

- 8 μ l MgCl₂ 25 mM
- 1 μ l Pfor (10 μ M)
- 1 μ l Prev (10 μ M)
- 2 μ l dNTPs 10 mM
- 2 μ l Taq DNA polimerasi 1 U/ μ l
- 76 μ l H₂O sterile.

Il *primer reverse* utilizzato è stato *Mxe Intein Reverse Primer* (NEB), che è esterno all'inserto in modo tale da non creare falsi positivi.

Il programma della PCR è stato come quello riportato in Figura 67.

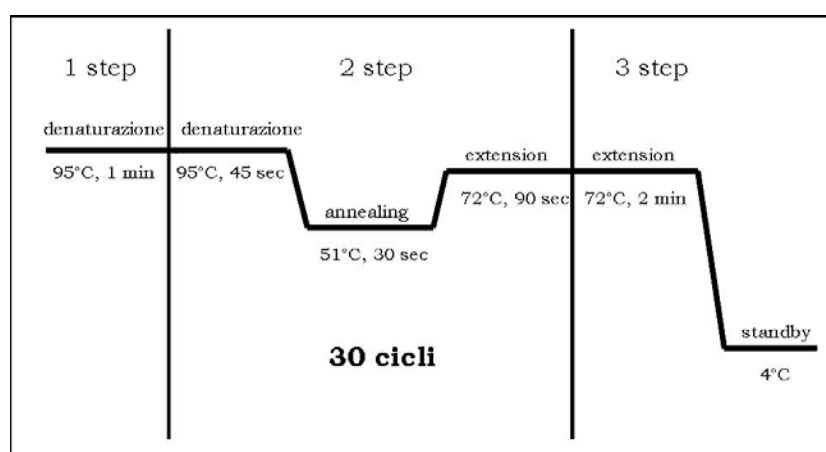


Figura 67. Ciclo per la colony PCR.

Il primo *step* è stato eseguito solo al primo ciclo, l'ultimo *step* è stato eseguito solo alla fine mentre gli altri sono stati ripetuti per 30 cicli.

E' stata effettuata un'elettroforesi su gel di agarosio all'1% caricando su di esso i prodotti della PCR (15 μ l) e il *marker* MassRuler™ DNA Ladders Low Range (Fermentas) ed applicando una tensione di 80 V.

Dal gel d'agarosio all'1% è stato possibile verificare la presenza della sequenza nucleotidica di rMOG_{ED}(1-97) inserita in pTXB1 nelle colonie provenienti dalle trasformazioni delle DH5 α con i prodotti di ligazione ottenuti dalle reazioni condotte a 18 °C utilizzando i tre diversi rapporti di quantità.

E' stato effettuato il *sequencing* su vari campioni di pTXB1rMOG_{ED}(1-97) per individuare il migliore clone da utilizzare per l'espressione del frammento rMOG_{ED}(1-97).

5.6.18 Trasformazione di ER2566 con pTXB1rMOG_{ED}(1-97)

70 µl del ceppo di *E. coli* ER2566 [*F*- λ -*fhuA2* [*lon*] *ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11* Δ (*mcrC-mrr*)114::*IS10* *R(mcr-73::miniTn10-TetS)2* *R(zgb-210::Tn10)(TetS)* *endA1 [dcm]*] chemocompetenti sono stati trasformati con 0,148 µg di plasmide pTXB1MOG_{ED}(1-97). Le cellule sono state incubate in ghiaccio per 30 minuti per permettere al DNA di entrare, poi a 42 °C per 2 minuti e di nuovo in ghiaccio per 2 minuti.

Alla sospensione cellulare sono stati aggiunti 200 µl di terreno LB e, successivamente, è stata tenuta a 37 °C sotto agitazione per un'ora.

100 della sospensione delle cellule trasformate sono stati piastrati su piastre Petri contenenti LB Agar con ampicillina (100 µg/ml), per la selezione, ed incubate in stufa a 37 °C per tutta la notte.

5.6.19 Espressione in larga scala di rMOG_{ED}(1-97)-inteina-CBD in terreno LB

Una colonia, derivante dalla trasformazione di ER2566 con pTXB1MOG_{ED}(1-97), è stata utilizzata per inoculare 5 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml). Le cellule sono state incubate a 37 °C sotto agitazione per tutta la notte.

1 ml di precoltura è stato inoculato in una beuta da fermentazione, preparata con 1 litro di LB, a cui sono stati aggiunti 1 ml di ampicillina (100 µg/ml): la coltura è stata incubata a 37 °C sotto agitazione fino ad OD₆₀₀ = 0,5-

0,8. E' stato aggiunto 1 ml di IPTG (1 mM) e la coltura è stata incubata a 37 °C, mantenendo l'agitazione, per tutta la notte.

5.6.20 Lisi cellulare e solubilizzazione corpi inclusi

La coltura è stata centrifugata a 4000 rpm per 30 minuti a 4 °C e il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 30 ml di *Column Buffer*, sono stati aggiunti 1,2 ml di una soluzione 25X di inibitori delle proteasi e successivamente la sospensione è stata congelata a -20 °C per un giorno.

Alla sospensione scongelata sono stati aggiunti 300 µl di TWEEN 20 ed è stata effettuata la sonicazione, eseguendo 10 cicli da 30 secondi ed applicando una potenza del 60%.

Il lisato è stato centrifugato ed il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 10 ml di una soluzione di *Washing Buffer*, la sospensione è stata centrifugata a 17000 rpm per 30 minuti a 4 °C; l'operazione è stata ripetuta per due volte.

I corpi inclusi così ottenuti sono stati solubilizzati aggiungendo 10 ml di *Column Buffer* con urea 8 M e lasciando agitare per 2 ore a temperatura ambiente. I corpi inclusi così solubilizzati sono stati centrifugati a 17000 rpm per 30 minuti a 4 °C ed il surnatante, se non utilizzato subito, è stato congelato a -20 °C.

5.6.21 Purificazione di rMOG_{ED}(1-97)-MESNA

La purificazione ed eluizione di rMOG_{ED}(1-97)-MESNA sono state effettuate impaccando la colonna Econo Column con resina di chitina (NEB).

Poiché la resina era conservata in una soluzione al 20% di EtOH, è stata lavata con 100 ml di H₂O; successivamente la resina è stata condizionata con 100 ml di *Column Buffer* con urea 1,5 M.

I corpi inclusi solubilizzati (10 ml) sono stati diluiti con 40 ml di *Column Buffer* in modo tale che la concentrazione finale di urea nella soluzione fosse 1,5 M. Il campione è stato caricato in colonna e lasciato legare alla resina sotto

agitazione per circa 24 ore; successivamente è stato eluito quello che non si è legato alla resina.

La resina è stata lavata con 100 ml di *Column Buffer* con urea 1,5 M e poi con *Column Buffer* con urea 1 M.

Successivamente è stato eluito il *Cleavage Buffer* avendo cura di mantenerne un certo volume in colonna. La resina con la proteina legata è stata incubata a 4 °C per 3 giorni.

L'eluizione della proteina è stata effettuata utilizzando il *Cleavage Buffer* e raccogliendo 10 frazioni da 3 ml.

5.6.22 Saggio di Bradford

Il saggio di Bradford sfrutta la capacità del colorante Coomassie Blu di legare le proteine in corrispondenza dei residui basici. Il reagente di Bradford è costituito da un cromoforo che assume colorazioni brune in condizioni native e vira sul blu quando è legato alle proteine, proporzionalmente alla concentrazione proteica.

Il saggio si effettua costruendo una retta di taratura basata sulla misura dell'assorbanza a 595 nm di una serie di campioni proteici a concentrazione nota. Campioni proteici a concentrazione ignota possono essere trattati con il reagente di Bradford e sottoposti a lettura spettrofotometrica a 595 nm; dai valori di assorbanza, per interpolazione con la retta di taratura, si risale alla concentrazione proteica del campione in esame.

Perciò è stata costruita una retta di taratura per misurare la concentrazione di rMOG_{ED}(1-97)-MESNA eluita.

E' stata preparata una soluzione madre di BSA (albumina di siero bovino) in *Cleavage Buffer* con concentrazione di 2 mg/ml; da questa sono state preparate altre 5 soluzioni con concentrazioni diverse.

I campioni per la misura all'UV sono stati preparati con 1,5 ml del reagente di Bradford (Biorad) e 50 μ l di ogni soluzione a concentrazione nota. Dopo 30 minuti è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 595 nm.

La retta di taratura ottenuta è riportata in Figura 68.

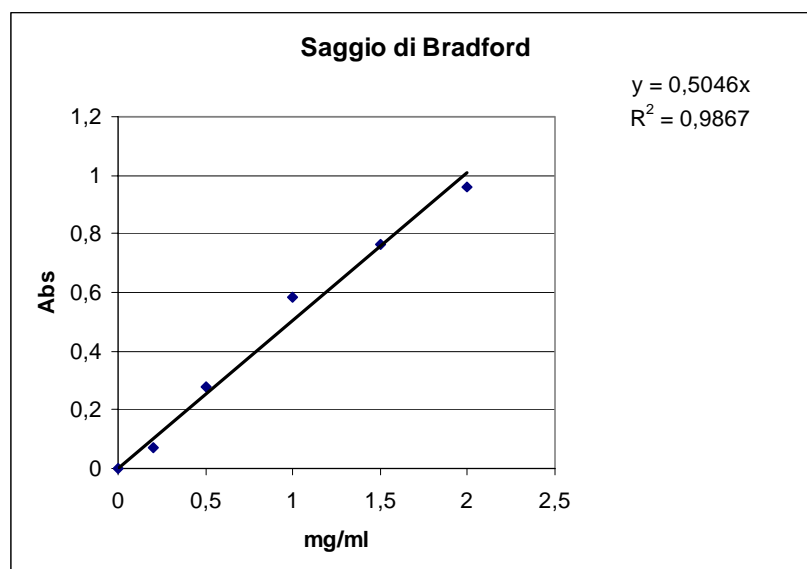


Figura 68. Retta di taratura del Saggio di Bradford.

E' stata effettuata la misura della concentrazione di rMOG_{ED}(1-97)-MESNA di ogni frazione eluita applicando l'equazione ricavata dalla retta di taratura.

5.6.23 Sintesi peptidica in fase solida

Le sequenze peptidiche [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴]MOG_{ED}(98-117) e [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴(Glc)]MOG_{ED}(98-117) sono state sintetizzate con apparecchio automatico (Syro II), partendo dalla resina Fmoc-Asp(*t*Bu)-Wang (30 mg, grado di sostituzione 0,5 mmol/g), seguendo la strategia SPPS Fmoc/*t*Bu. Sono state effettuate le seguenti operazioni:

- *swelling* della resina con DMF (1 mL/100 mg resina) per 20 minuti;
- deprotezione dello Fmoc con due lavaggi (1 per 5 min, 1 per 30 min) con una soluzione di piperidina al 40% in DMF;
- lavaggi della resina con DMF;
- reazioni di accoppiamento condotte trattando la resina con una soluzione dell'amminoacido Fmoc-protetto (10 eq) e HOBt (10 eq.) in DMF ed una soluzione di DIPEA in NMP (10 eq.) (rispetto al grado di sostituzione della resina); le reazioni sono durate 30 min;
- lavaggio ed essiccamento della resina: tre lavaggi con DMF (5 min x 1 ml di DMF per ogni 100 mg di resina), due lavaggi con DCM (5 min x 1 ml di DMF per ogni 100 mg di resina). Infine la resina è stata essiccata.

L'accoppiamento dell'amminoacido Fmoc-Asn[Glc(OAc)₄]-OH è stato effettuato su sintetizzatore manuale PLS 4x4. E' stata preparata una soluzione di amminoacido (1,5 eq), HOBt (1,5 eq) e TBTU (1,5 eq) in DMF ed aggiunta alla resina insieme a NMM (3 eq).

La reazione di accoppiamento è stata ripetuta due volte per una durata ciascuna di un'ora; successivamente la resina è stata lavata con DMF e DCM e poi seccata.

5.6.24 *Cleavage* del peptide dalla resina

Dopo aver terminato le sequenze peptidiche è stato effettuato il *cleavage* di entrambe utilizzando una miscela costituita da 900 µl di TFA e 100 µl di tioanisolo/EDT 7:3 al fine di deproteggere le catene laterali dei vari amminoacidi e di staccare il peptide dalla resina.

Le sospensioni sono state mantenute, per 3 ore, sotto agitazione a temperatura ambiente. Le miscele sono state poi filtrate, effettuando un lavaggio con 200 µL di TFA.

I peptide sono state precipitate per aggiunta di etere etilico raffreddato (10 mL) e mantenendoli in ghiaccio; sono stati poi centrifugati a 4000 rpm per

5 minuti a 4 °C. I precipitati sono stati lavati e centrifugati (4000 rpm, 4 °C, 2 minuti) per altre 5 volte con etere etilico freddo (5 mL).

Dopo aver eliminato le soluzioni surnatanti e aver seccato la parte solida, i peptidi sono stati sciolti in H₂O e liofilizzati.

5.6.25 Reazione di deacetilazione del glicopeptide [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴(Glc)]MOG_{ED}(98-117)

La deacetilazione delle funzioni ossidriliche dello zucchero presente nel glicopeptide [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴(Glc)]MOG_{ED}(98-117) è stata effettuata trattando il grezzo con una soluzione di NaOMe 0.1 M in MeOH fino a pH 11, in atmosfera di N₂. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione, in atmosfera di N₂, per circa 2 ore. Dopo evaporazione del solvente il peptide è stato sciolto in H₂O e, dopo neutralizzazione con HCl 37%, liofilizzato.

5.6.26 Tentativi di NCL

Sono state effettuate varie prove di ligazione tra il frammento ricombinante rMOG_{ED}(1-97)-MESNA e il peptide grezzo [Gly¹⁰³,Asn¹⁰⁴]MOG_{ED}(98-117).

Le prime prove sono state condotte nel tampone di eluizione della proteina con urea 3 M, anziché 1 M, aggiungendo un riducente opportuno TCEP 10 mM e 2 equivalenti di peptide. Il pH finale della soluzione è stato portato a 8. Sono state condotte reazioni a varie temperature (37 °C, 4 °C e temperatura ambiente), tenendo sotto agitazione per 48 ore.

Ogni reazione è stata controllata tramite spettrometria di massa MALDI a intervalli di 12 ore senza notare variazioni della massa iniziale del campione.

Successivamente è stato cambiato il tampone di reazione, mantenendo uguali le altre condizioni (TCEP 10 mM e peptide 2 eq.). E' stato utilizzato un tampone contenente guanidinio HCl 6 M, Tris 20 mM e NaCl 500 mM. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 48 ore sotto agitazione.

La reazione è stata controllata tramite spettrometria di massa MALDI a intervalli di 12 ore senza notare variazioni della massa del campione.

Infine è stata effettuata la reazione utilizzando il tampone guanidinio HCl 6 M, Tris 20 mM e NaCl 500 mM, mentre è stata aumentata la quantità di TCEP (20 mM) ed è stato aggiunto MESNA (200 mM). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 48 ore sotto agitazione.

La reazione è stata controllata tramite spettrometria di massa MALDI a intervalli di 12 ore senza notare variazioni della massa del campione.