

**Alma Mater Studiorum - Università di Bologna**

---

**SCUOLA DI SCIENZE**

**Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”**

Corso di Laurea Magistrale in

**Chimica Industriale**

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**ESPRESSIONE ETEROLOGA E  
PURIFICAZIONE DELLA ISTONE  
DEACETILASI UMANA 1 (HDAC1)**

Tesi di Laurea Sperimentale

**CANDIDATO**

Laura Magri

**RELATORE**

**Dott.ssa** Alessandra Stefan

**CORRELATORE**

**Prof.** Alejandro Hochkoepler

Sessione II

---

**Anno Accademico 2013-2014**

---

## Abstract

La proteina umana HDAC1 fa parte della famiglia delle HDAC (Istone Deacetilasi); questi enzimi, ad azione deacetilasica, catalizzano la reazione di rimozione di un gruppo acetile a livello degli istoni, componenti fondamentali della cromatina, la cui struttura influenza il ciclo cellulare e la regolazione dell'espressione genica. L'importanza della proteina in questione, a scopo terapeutico, risiede nello studio degli inibitori ad essa associati, i quali risultano utili a livello farmacologico, come coadiuvanti nelle terapie per la cura di tumori.

La produzione di HDAC1 ha previsto l'utilizzo di due diversi ceppi del batterio *Escherichia coli*, denominati TOP10 e BW25993, che sono serviti come sistemi "ospiti" per l'inserimento del vettore di espressione pBAD-HDAC1 contenente la porzione di DNA che codifica per la proteina ricombinante. Sono state determinate le condizioni più idonee, per entrambi i sistemi analizzati, in modo da massimizzare l'espressione della proteina indotta mediante aggiunta di arabinosio al terreno di coltura. A seconda della combinazione ceppo-vettore, infatti, il livello di espressione ottenuto cambia significativamente. In seguito, gli estratti proteici totali sono stati sottoposti a purificazione mediante diversi passaggi cromatografici ed è stata determinata la resa finale del processo. La caratterizzazione della proteina ricombinante purificata ha evidenziato una forma aggregata, di tipo ottamerico, che potrebbe influenzare l'attività enzimatica. Per questo motivo sono stati portati avanti numerosi tentativi di dissociazione dell'oligomero incubando HDAC1 con diversi agenti. Un effetto disaggregante è stato osservato solo in presenza di due detergenti, SDS (anionico) e CTAB (cationico), i quali hanno permesso di ottenere la proteina in forma monomerica. Tra i due detergenti, l'SDS è risultato più efficace, mentre per il CTAB si richiedono ulteriori indagini ed approfondimenti. Altri studi, infine, sono auspicabili ai fini di migliorare ulteriormente la fase di espressione, in modo da rendere il protocollo di produzione adatto ad un'applicazione a livello industriale.

## Abstract

The human protein HDAC1 belongs to the family of HDAC (Histone Deacetylase), enzymes with a deacetylase action. In particular, they catalyze the reaction of removal of an acetyl group from histones, essential components of the chromatin, the structure of which influences the cell cycle and regulates gene expression. The importance of this protein, for therapeutic purposes, is related to the study of inhibitors associated with it, which are useful, at pharmacological level, as adjuvants in the therapies for the treatment of tumors.

The production of HDAC1 was performed using two different strains of *Escherichia coli*, TOP10 and BW25993. These strains are used as "hosts" systems for the insertion of the expression vector pBAD-HDAC1, containing the sequence of DNA encoding for the recombinant protein. Firstly, we determined the most suitable conditions for both systems in order to maximize the expression of the protein, induced by arabinose. Indeed, the different combination strain-vector, significantly affects the process. Afterward, the protein suspension extract from cells was subjected to different purification steps, consisting of specific chromatographic columns, and the final yield of the process for each strain was determined. Unfortunately, we found that the recombinant protein was purified in an aggregated form, likely an octamer. Since the aggregation can affect the enzymatic activity, several attempts to dissociate the oligomer were carried out, using different compounds belonging to different chemical categories. The only positive effect was observed using two different detergents, SDS (anionic) and CTAB (cationic), which allowed obtaining the protein in a monomeric form. The addition of SDS had a more significant disaggregating effect than CTAB, therefore, further investigations are needed.

# Indice

<b>ABSTRACT</b> .....	I
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
1.1 Epigenetica e regolazione genica .....	1
1.2 Struttura e “rimodellamento” della cromatina.....	2
1.3 Meccanismi di acetilazione e deacetilazione.....	3
1.4 La famiglia delle HDAC -Histone Deacetylase .....	6
1.5 HDAC1 .....	7
1.6 Inibitori di HDAC e scopi terapeutici.....	9
1.7 Produzione di proteine ricombinanti .....	11
1.7.1 Scelta dell’organismo ospitante .....	11
1.7.2 Escherichia coli nella produzione di proteine ricombinanti .....	12
1.7.3 Sistemi di espressione .....	13
1.7.3.1 Il sistema di espressione pBAD.....	14
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	16
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	17
3.1 Ceppi batterici .....	17
3.2 Vettore di espressione .....	17
3.3 Terreni e condizioni di coltura .....	18
3.4 Preparazione delle cellule elettrocompetenti .....	18
3.5 Determinazione della densità ottica (Optical Density) .....	19
3.6 Estrazione del DNA plasmidico .....	19
3.7 Quantificazione del DNA .....	20
3.8 Elettroforesi su gel di agarosio .....	20
3.9 Elettroporazione.....	21

3.10 Prove di espressione .....	21
3.11 Curve di crescita .....	22
3.12 Protocollo di espressione della proteina .....	22
3.13 Estrazione delle proteine .....	23
3.14 Prove cromatografiche.....	23
3.14.1 Cromatografia a scambio anionico: Q-Sepharose Fast Flow.....	24
3.14.2 Cromatografia di affinità: HiTrap Heparine .....	25
3.14.3 Cromatografia di affinità: poli-L-lisina.....	26
3.14.4 Cromatografia ad esclusione molecolare: Superdex 200.....	27
3.15 Concentrazione .....	27
3.16 Elettroforesi SDS-PAGE .....	27
3.17 Elettroforesi Nativa.....	28
3.18 Colorazione di gel.....	29
3.19 Western Blotting.....	29
3.20 Quantificazione proteica.....	30
3.21 Prove di dissociazione .....	31
3.21.1 Prove in condizioni native.....	31
3.21.2 Prove di ultrafiltrazione .....	33
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>34</b>
4.1 Produzione di HDAC1 nel ceppo di Escherichia coli TOP10.....	34
4.1.1 Prove di espressione .....	34
4.1.2 Cinetiche di crescita .....	35
4.1.3 Protocollo di produzione .....	37
4.1.4 Protocollo di purificazione .....	37
4.1.4.1 Cromatografia a scambio anionico: Q-Sepharose Fast Flow.....	37
4.1.4.2 Cromatografia di affinità: HiTrap-Heparine.....	39
4.1.4.3 Cromatografia di affinità: Poly-L-lysine .....	41
4.1.4.4 Cromatografia ad esclusione molecolare: Superdex 200.....	43
4.1.4.5 Purificazione e quantificazione proteica.....	45
4.1.5 Prove di dissociazione.....	46
4.1.5.1 Prove in condizioni native .....	46
4.1.5.1 Prove di ultrafiltrazione .....	48
4.2 Produzione di HDAC1 nel ceppo di Escherichia coli BW25993.....	50

4.2.1 Trasformazione del ceppo BW25993 con il vettore pBAD-HDAC1 .....	50
4.2.2 Prove di espressione.....	51
4.2.3 Protocollo di produzione.....	52
4.2.4 Confronto dell'espressione: SDS-PAGE e Western Blotting.....	53
4.2.5 Protocollo di purificazione.....	54
4.2.5.1 Cromatografia a scambio anionico: Q-Sepharose Fast Flow.....	55
4.2.5.2 Cromatografia di affinità: HiTrap-Heparine.....	56
4.2.5.3 Cromatografia di affinità: Poly-L-lysine .....	58
4.2.5.4 Cromatografia ad esclusione molecolare: Superdex 200.....	59
4.2.5.5 Purificazione e quantificazione proteica.....	61
4.2.6 Prove di dissociazione con ultrafiltrazione.....	62
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>66</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>68</b>



# 1. Introduzione

## 1.1 Epigenetica e regolazione genica

Con il termine *epigenetica* si intende lo studio delle modificazioni, ereditabili attraverso processi di divisione cellulare quali mitosi e/o meiosi, attraverso una o più generazioni, che alterano l'espressione e la funzione genica non implicando variazioni nella sequenza del DNA. I geni sono unità contenenti informazione genetica e ciascuno codifica per una determinata proteina funzionale mediante la trascrizione dello specifico mRNA; la loro regolazione, positiva o negativa (attivazione o disattivazione) è, quindi, direttamente controllata dai fenomeni epigenetici, i quali determinano per quali proteine può avvenire la trascrizione e la relativa produzione. Tutti i fenomeni epigenetici sono caratterizzati da reazioni di tipo reversibile; la reversibilità di questi processi viene direttamente influenzata da agenti chimici. Tra i meccanismi più significativi, che giocano un ruolo rilevante nella regolazione, talvolta intimamente connessi tra loro, rientrano:

- le modificazioni covalenti post-traduzionali delle proteine istoniche, quali acetilazione, fosforilazione, metilazione ed ubiquitinazione
- la metilazione del DNA: avviene ad opera di specifici enzimi, le metiltrasferasi, a livello dei residui di citosina nelle regioni promotrici dei geni dette "CpG site"
- il silenziamento genico associato a RNA non codificante

Questi meccanismi sono coinvolti in diversi processi cellulari e sono estremamente importanti nel normale sviluppo e nella salute dell'organismo ma allo stesso tempo possono essere i responsabili della comparsa di numerose patologie. L'interruzione, infatti, di uno qualsiasi dei meccanismi sopraelencati contribuisce ad alterazioni epigenetiche che possono causare l'attivazione anomala o il silenziamento di geni specifici; queste anomalie nel funzionamento dell'espressione genica sono state associate al cancro, sindromi che coinvolgono instabilità cromosomiche e, inoltre, ritardo mentale<sup>[1]</sup>. Numerose e recenti speculazioni hanno evidenziato come la dieta e lo stile di vita influenzino questi cambiamenti e vi è un'ampia ricerca, tutt'ora molto attiva, finalizzata a dimostrare come questi fattori trasmettano una sorta di "impronta" epigenetica al genoma umano<sup>[2]</sup>.

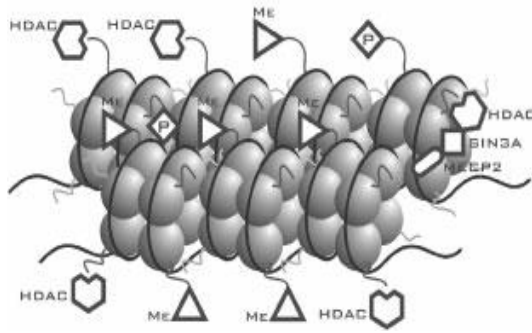


## 1.2 Struttura e “rimodellamento” della cromatina

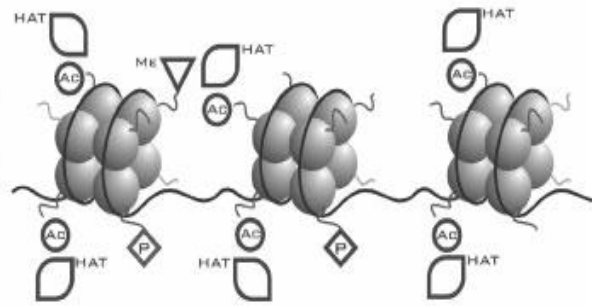
Nel nucleo delle cellule eucariotiche il genoma è presente sotto forma di un complesso perfettamente compattato e ripiegato, costituito da proteine e DNA, chiamato cromatina. Il complesso, nello specifico, è costituito dai cosiddetti nucleosomi, strutture di DNA avvolto su particolari proteine basiche dette istoni, e da proteine non-istoniche. Gli istoni sono, quindi, i componenti primari della cromatina ed agiscono da supporti attorno ai quali il DNA può disporsi<sup>[1]</sup>. La cromatina è caratterizzata da un'organizzazione pianificata su più livelli strutturali distinti, a loro volta dipendenti dalla struttura dei nucleosomi, unità di base ripetitive. I diversi livelli strutturali, caratterizzati da diversi gradi di ripiegamento, rendono i nucleosomi complessi dinamici che influenzano l'organizzazione e di conseguenza l'attività di un gene<sup>[1]</sup>.

Gli istoni (H2A, H2B, H3, e H4) presenti nel nucleosoma, sono piccole proteine basiche auto-organizzate nella forma di complesso ottamerico (H3-H4 nella forma di tetramero e H2A-H2B presenti come due eterodimeri). Ciascun istone presenta una “coda” NH<sub>2</sub>-terminale più flessibile e carica, che fuoriesce dal nucleosoma. Le cariche positive presenti sulle catene laterali istoniche sono garantite dalla presenza di arginine e lisine, le quali stabilizzano le cariche negative disposte sul DNA. In aggiunta alla struttura ottamerica menzionata, è presente anche l'istone H1, detto istone-linker. Nonostante sia ancora poco chiara la modalità attraverso la quale la cromatina viene organizzata in filamenti via via più compatti, è noto che l'istone H1 ne coordina la compattazione a livello del ripiegamento di ordine superiore; tutto ciò avviene attraverso la neutralizzazione delle cariche negative nel segmento di DNA di collegamento ad opera di cariche positive presenti sul dominio carbossi-terminale. Di conseguenza gli istoni variano la struttura della cromatina che, a sua volta, determina se il DNA cromosomico associato può essere trascritto. Esistono due strutture principali associate al complesso cromatinico: la cromatina condensata, anche detta “eterocromatina”, risulta essere inattiva e di conseguenza favorisce la repressione trascrizionale del DNA e il silenziamento del gene; al contrario la forma “aperta” rilassata, detta “eucromatina”, si presenta attiva e favorisce la trascrizione del DNA associato.

### A Heterochromatin



### B Euchromatin

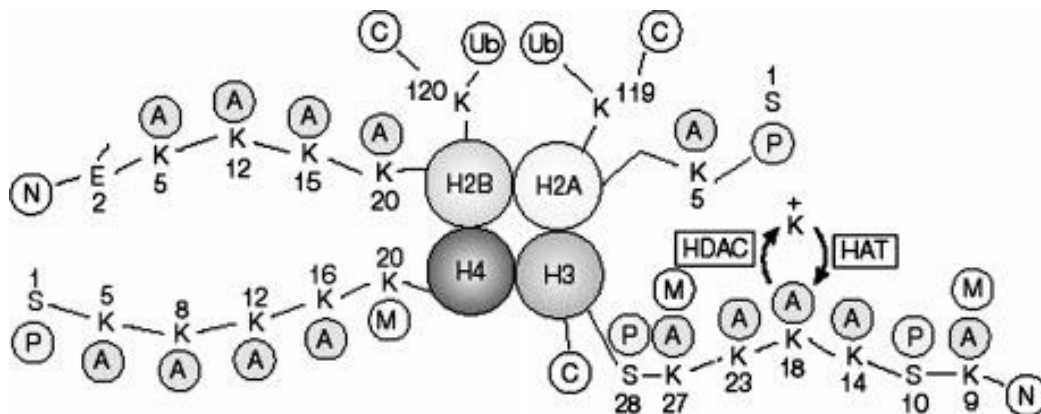


**Figura 1.1.** Le due diverse strutture della cromatina: A rappresenta la forma condensata del complesso indotta da processi di metilazione del DNA e deacetilazione degli istoni (favorisce la repressione trascrizionale). B rappresenta la forma rilassata indotta da processi di acetilazione degli istoni e demetilazione del DNA (favorisce l'attivazione trascrizionale). Tratto da Mai A. et al, "Histone Deacetylation in Epigenetics: An Attractive Target for Anticancer Therapy", *Medicinal Research Reviews* 2005, **25** (3): 265.

È possibile descrivere il fenomeno nell'ottica di una visione più semplice: i fattori di trascrizione (TF), proteine responsabili della trascrizione dell'informazione genetica contenuta nei geni, hanno maggiore possibilità di accesso e di attacco al DNA nel caso in cui la cromatina si trovi nella sua forma rilassata rispetto a quella condensata. È importante, inoltre, ricordare che i nucleosomi sono dotati di una struttura dinamica, la quale permette l'accesso dei fattori di trascrizione a diversi livelli<sup>[2]</sup>.

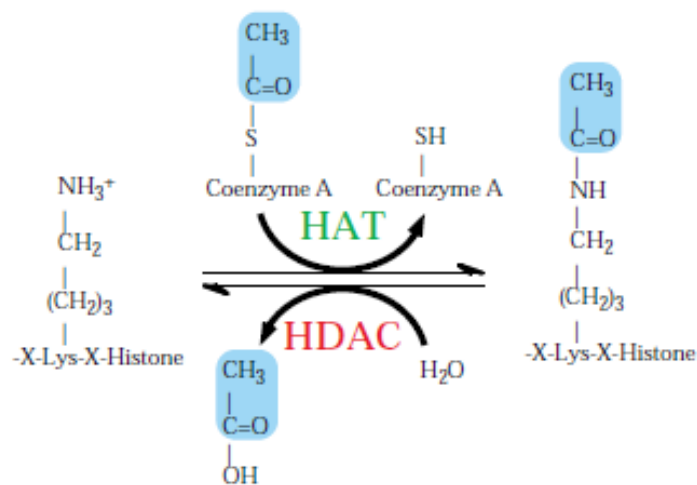
### 1.3 Meccanismi di acetilazione e deacetilazione

Le modalità attraverso cui gli istoni possono essere modificati sono varie; tra le più importanti si ricordano l'acetilazione, la fosforilazione e la metilazione.



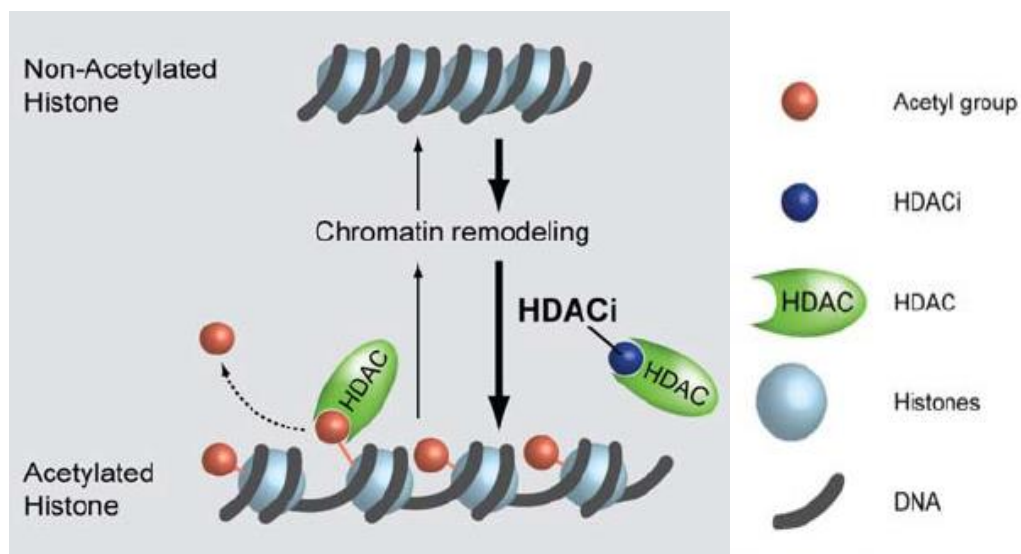
**Figura 1.2.** Modificazioni covalenti dei residui amino-terminali del core istonico. K, lisina; A, acetile; C, residuo carbossi-terminale; E, acido glutammico; M, metile; N, ammino-terminale; P, fosfato; S, serina; Ub, ubiquitina. Tratto da Mai A. et al, "Histone Deacetylation in Epigenetics: An Attractive Target for Anticancer Therapy", *Medicinal Research Reviews* 2005, **25** (3): 265.

In particolare, i meccanismi di acetilazione e deacetilazione avvengono in prossimità delle “code”, o domini ammino-terminali degli istoni, le quali occupano circa il 25-30 % della massa individuale. Si tratta di processi chimici che aggiungono o eliminano un gruppo acetile, rispettivamente, a livello del gruppo  $\epsilon$ -amminico dell'amminoacido lisina presente nella porzione di istone. Questo stato di acetilazione del core istonico viene controllato dall'attività competitiva di una super-famiglia di enzimi denominati HAT (Histone Acetyltransferase) e HDAC (Histone Deacetylase), per i quali il substrato risulta essere il residuo amminoacidico lisina. Le HAC trasferiscono un gruppo acetile sull'azoto terminale della lisina in posizione  $\epsilon$ , posizionato sulla catena adiacente, eliminando così la carica positiva presente, aumentando l'idrofobicità ed impedendo il conseguente legame con le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA. L'acetil-coenzima A funge da donatore ad alta energia, fornendo all'enzima il gruppo acetile da trasferire al gruppo  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. La reazione contraria viene promossa dalle HDAC, le quali permettono la deacetilazione dell' $\epsilon$ -N-acetil-lisina, trasferendo il gruppo acetile ad una molecola di acqua che funge da accettore<sup>[2] [3]</sup>.



**Figura 1.3.** L'equilibrio di acetilazione istonica è mantenuto dall'attività opposta di HAT e HDAC. L'acetil-coenzima A funge da donatore ad alta energia e cede il gruppo acetile utile per la reazione. L'istone acetiltransferasi trasferisce l'acetile al gruppo  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> dei residui interni di lisina, i quali fanno parte del dominio istonico N-terminale. La reazione inversa è catalizzata dall'enzima HDAC (Istone Deacetilasi). Tratto da Kuo Min-Hao, David Allis C., “Roles of istone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation”, *BioEssays* 1998, **20**: 615-626.

L'acetilazione di solito è associata alla cromatina nella sua forma attiva e libera, in quanto il rilassamento provocato dalla reazione di acetilazione favorisce la corretta interazione con i fattori di trascrizione e, di conseguenza, l'inizio del processo di trascrizione. Al contrario la deacetilazione promossa dalle HDAC è generalmente associata all'eterocromatina. Infatti, attraverso l'eliminazione del gruppo acetile, la carica positiva dell'azoto terminale viene ristabilita a livello della lisina presente nella "coda" istonica, favorendo una forma più compatta e superavvolta della cromatina, trascrizionalmente silente<sup>[2]</sup>.



**Figura 1.4.** Meccanismo di azione delle deacetilasi HDAC nel rimodellamento della cromatina. Tratto da Walkinshaw D. R., Yang X. J., "Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics", *Current Oncology* 2008, 15 (5): 70-76.

Entrambe queste classi di enzimi sono, quindi, coinvolte nel silenziamento e nella trascrizione dei geni attraverso una stretta regolazione. L'iperacetilazione catalizzata dagli enzimi HAT, co-attivatori di trascrizione, indica generalmente la presenza di un gene attivo; viceversa la deacetilazione promossa dalle HDAC, che fungono da co-repressori, ne favorisce la repressione dell'attività ed il silenziamento<sup>[4] [5]</sup>.

Oltre agli istoni, anche alcune proteine non istoniche sono bersagli delle reazioni di acetilazione e grazie a recenti studi è stato possibile determinare che la lisina, e le reazioni ad essa associate, risulta implicata in quasi tutti i processi di regolazione delle funzioni nucleari e di molti processi che avvengono all'interno del citoplasma e che vanno al di là della regolazione dei geni.

#### 1.4 La famiglia delle HDAC -Histone Deacetylase

Il genoma dei mammiferi codifica per 18 enzimi con attività deacetilasi i quali si dividono in due distinti gruppi:

- le classiche HDAC (Histone Deacetylase), la cui attività enzimatica richiede la presenza dello ione  $Zn^{2+}$
- le sirtuine, enzimi  $NAD^+$  dipendenti.

Nello specifico, all'interno del primo gruppo, quello delle HDAC canoniche, rientrano 11 enzimi per i quali è possibile stilare un'ulteriore classificazione in quattro sottogruppi; i componenti sono riportati in tabella:

<i>HDAC (Histone Deacetylase)</i>			
<b>Classe I</b>	<b>Classe IIa</b>	<b>Classe IIb</b>	<b>Classe IV</b>
HDAC1	HDAC4		
HDAC2	HDAC5	HDAC6	
HDAC3	HDAC7	HDAC10	HDAC11
HDAC8	HDAC9		

**Tabella 1.1**

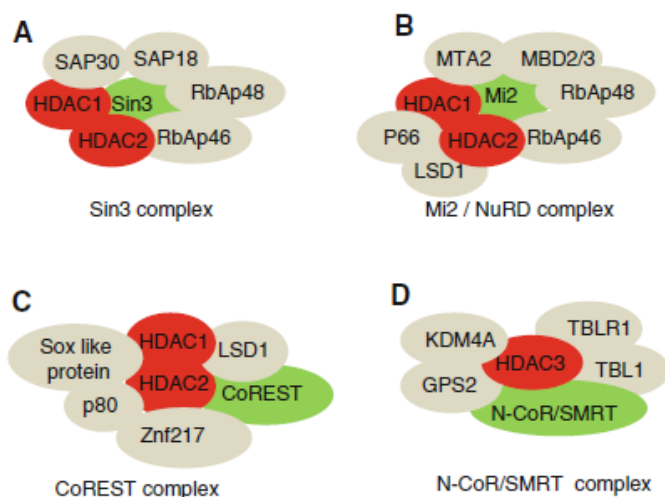
Il secondo gruppo, invece, del quale fanno parte le sirtuine, viene classificato come classe III ed è a sua volta diviso in quattro sottogruppi distinti. Nel presente lavoro l'attenzione verrà posta sul primo gruppo ed in particolare sulla classe I contenente l'enzima di interesse HDAC1. Nei mammiferi la classe I delle HDAC è espressa ubiquitariamente e questa sua caratteristica suggerisce che tali enzimi nucleari possiedano un ruolo generale per quanto concerne la repressione trascrizionale. Inoltre, essi interagiscono con particolari fattori di trascrizione suggerendo il loro coinvolgimento fondamentale in specifici programmi trascrizionali<sup>[5]</sup>. Tutti gli enzimi della classe I, eccetto HDAC8 che è scarsamente espressa, fanno parte di complessi multiproteici ed interagiscono con vari fattori di trascrizione. HDAC1 e HDAC2 presenti nei mammiferi originano da un antenato comune attraverso duplicazione di un gene ancestrale. Esse, infatti, mostrano una elevata omologia nella sequenza amminoacidica, circa pari all'85 %. La loro "coda" C-terminale contiene, inoltre, siti di fosforilazione per l'enzima caseina chinasi II (CK2). HDAC3 condivide lo stesso dominio catalitico con gli enzimi HDAC1 e HDAC2, ma possiede un solo sito di fosforilazione per l'enzima CK2. Infine,

HDAC8 possiede un motivo altamente conservato per il processo di fosforilazione legato all'enzima protein-chinasi A<sup>[4]</sup>.

Recentemente è stata posta l'attenzione sugli effetti causati da potenziali delezioni geniche o sovra-espressioni di questi enzimi nei mammiferi. Per ogni enzima della classe I è stato eseguito il seguente esperimento in topi modello: è stata effettuata una delezione per bloccare la produzione dell'enzima specifico, sia a livello generale sia in determinati tessuti. Si è notato che tali delezioni provocano letalità durante lo stadio embrionale dovuta a ritardo nello sviluppo. Questo conferma la necessità della presenza di tali enzimi per il corretto funzionamento dei processi di embriogenesi nel topo e, inoltre, fa supporre che tale esigenza possa essere estesa anche ad altri organismi, poiché tali meccanismi sono legati a processi fondamentali per la corretta salute e sopravvivenza dell'organismo<sup>[5]</sup>.

### **1.5 HDAC1**

L'enzima HDAC1 appartiene alla classe I e svolge la sua attività in concomitanza con l'enzima HDAC2. Essi, infatti, formano omo ed etero-dimeri tra di loro e, probabilmente, permettono l'uno all'altro di svolgere la loro azione insieme o separatamente. Il dimero è un requisito fondamentale per il corretto espletamento della funzione di HDAC; la sua dissociazione porta a una inibizione dell'attività catalitica. Generalmente HDAC1 e HDAC2 vengono co-esprese e spesso mostrano una ridondanza nella loro funzione in numerosi tessuti adulti e in molte linee cellulari. È importante ricordare, infatti, che la delezione dell'enzima HDAC1 porta spesso ad un incrementato livello di HDAC2 e viceversa, senza che avvenga un conseguente cambiamento a livello dell'mRNA. Questo effetto compensatorio suggerisce che le due proteine possiedano meccanismi omologhi di regolazione e rinforza l'idea che entrambe siano implicate in vie condivise di regolazione. È stato dimostrato, inoltre, che HDAC1 e HDAC2 giocano un ruolo fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare. Entrambi si trovano all'interno di complessi multiproteici corepressori, tra i quali Sin3, NuRD (Nucleosome-Remodelling) e CoREST, tutti destinati alle regioni regolatrici della cromatina mediante fattori di trascrizione (ad esempio Sp1, Sp3 e p53) e possiedono vari ruoli all'interno di specifiche cellule.



**Figura 1.5.** Esempi di complessi multiproteici di cui fa parte HDAC1. La sua azione è svolta in concomitanza con HDAC2 e i due enzimi generalmente costituiscono il *core* catalitico a cui sono associate altre proteine con diverse funzioni: repressori e co-repressori trascrizionali, rimodellatori della cromatina. Tratto da Delcuve Geneviève P., Khan Dilshad H., Davie James R., “Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors”, *Clinical Epigenetics* 2012, **4**: 5.

Il complesso Sin3 (figura 1.5, A) è costituito da sei subunità: il co-repressore trascrizionale Sin3, due proteine associate a Sin3 (SAP18 e SAP30) e due proteine associate al retinoblastoma (RbAp46 e RbAp48). HDAC1 e 2 costituiscono il core catalitico del complesso, il quale funge da piattaforma per l’aggiunta di altri moduli aventi funzioni enzimatiche tra cui anche il rimodellamento del nucleosoma e la metilazione degli istoni. Il complesso NuRD (figura 1.5, B) invece ha una composizione variabile che dipende dal tipo di cellula e dagli stimoli esterni. È l’unico complesso che possiede attività di rimodellamento della cromatina sia legate all’azione di HDAC sia ATP-dipendenti, le quali sono svolte da HDAC1 e/o HDAC2 e Mi-2a e/o Mi-2b rispettivamente. Sono inoltre presenti altre proteine che hanno funzioni strutturali e/o regolatrici ma anche proteine contenenti il dominio con il sito di legame per la metilazione a livello dei siti CpG, le quali riconoscono il DNA metilato e attivano diversi segnali a cascata. Infine, il complesso CoREST (figura 1.5, C), al quale è associato un fattore di trascrizione deputato al silenziamento, è composto da KDM1/LSD1 che promuove la demetilazione di H3 in prossimità della lisina 4; questo evento facilita la formazione di una struttura condensata della cromatina e l’espressione genica viene modulata negativamente. I processi legati alle funzioni del CoREST sono particolarmente importanti nello sviluppo neuronale e nei sistemi delle cellule embrionali<sup>[4]</sup>. Numerosi studi hanno inoltre evidenziato che il ruolo di HDAC1 e 2

all'interno della regolazione del ciclo cellulare avviene, almeno parzialmente, attraverso la repressione diretta dei regolatori del ciclo cellulare, tra cui p21, p27 e p57. Anche altri fattori richiedono l'attività di HDAC1 per esercitare le loro funzioni. Ad esempio, i cosiddetti soppressori tumorali e le regioni di attacco per i modulatori della cromatina richiedono la presenza del complesso Sin3/HDAC1 specifico per il promotore ciclina D1. Il ruolo di HDAC1 nella regolazione genica attraverso la deacetilazione degli istoni ha un impatto consistente anche sulla trascrizione di proteine non istoniche. Studi in vitro, infatti, suggeriscono che l'attività del fattore di trascrizione p53 sia modulata da un fattore HDAC1-dipendente che catalizza la rimozione del gruppo acetile aumentando l'affinità per il DNA. Si è visto che la delezione combinata di entrambi gli enzimi HDAC1 e HDAC2 porta a un forte arresto del ciclo cellulare nella fase G1 accompagnato da una regolazione positiva di p21 e p57, la quale avviene contemporaneamente. Entrambi questi processi sono poi seguiti da apoptosi. La regolazione positiva è diretta, poiché HDAC1 e HDAC2 si legano ai promotori p21 e p57 e possono favorire la repressione della loro trascrizione. In altri studi, si è visto che la delezione degli enzimi o l'inattivazione della loro attività deacetilasica porta a un arresto del ciclo cellulare accompagnato da regolazione positiva di p21 e p53<sup>[5]</sup>.

### **1.6 Inibitori di HDAC e scopi terapeutici**

Da recenti studi è emerso che gli enzimi HDAC svolgono un importante ruolo a livello di regolazione genica durante lo sviluppo di cellule cancerogene di diverso tipo. In particolare i membri delle classi I e II vengono sovraespressi in caso di cancro alla prostata, stomaco, colon, polmoni e mammella. La spiegazione risiede nella variazione del grado di acetilazione degli istoni che influenza la forma della cromatina. Quando viene a mancare l'equilibrio nei processi di acetilazione e deacetilazione, l'espressione genica viene alterata; nel caso di sviluppo di cellule cancerose, il mancato equilibrio conduce alla variazione nell'espressione dei geni soppressori tumorali e/o proto-oncogeni. Anche l'enzima HDAC1 è presente in grandi quantità durante lo sviluppo di vari tipi di tumori e svolge un ruolo importante all'interno del processo di carcinogenesi; una ridotta attività dell'enzima è associata quindi alla soppressione dello sviluppo e della crescita del tumore. Per questo motivo lo studio degli inibitori, in grado di diminuire l'attività deacetilasica di HDAC, è un campo attivo di grande interesse, tutt'ora in fase di sviluppo. Come evidenziato gli inibitori di entrambe le classi sono in grado di aumentare



l'efficacia anti-tumorale e, se affiancati ad ulteriori terapie, ne migliorano gli effetti. Generalmente queste sostanze vengono utilizzate in concomitanza di trattamenti terapeutici tra i quali rientrano le radiazioni ionizzanti e/o la chemioterapia. Numerose applicazioni stanno trovando terreno fertile all'interno della ricerca farmacologica; l'efficacia di queste sostanze è stata inoltre evidenziata nella cura di malattie quali la malaria e patologie di natura infiammatoria. Il meccanismo più importante legato al ruolo degli inibitori di HDAC riguarda l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione del processo di apoptosi nelle cellule cancerose. I meccanismi attraverso i quali avviene tutto ciò includono la variazione dell'espressione di circa il 2-10 % dei geni coinvolti e l'alterazione di proteine sia istoniche che non-istoniche. L'apoptosi è un meccanismo naturale che induce una morte "pianificata" di cellule spesso dannose o nocive per l'organismo. Questo fenomeno è controllato da un delicato equilibrio garantito da proteine proapoptotiche e antiapoptotiche che inducono o arrestano, rispettivamente la morte cellulare; nell'insorgenza del cancro questo bilanciamento viene meno creando processi anomali e la proliferazione delle cellule cancerose. La produzione di entrambe le proteine è vincolata all'espressione dei geni proapoptotici e antiapoptotici. È stato dimostrato che gli inibitori in questione sono in grado di regolare in maniera positiva i geni proapoptotici che inducono l'apoptosi, favorendo la diminuzione delle cellule tumorali e riducendo l'espressione dei geni antiapoptotici. La morte cellulare viene indotta anche in cellule normalmente resistenti al fenomeno dell'apoptosi<sup>[6]</sup>.

I composti riconosciuti come inibitori dei processi di acetilazione e deacetilazione sono numerosi e si dividono in composti naturali o sintetici. Tra i più importanti è possibile ricordare gli acidi grassi a catena corta (acido valproico e butirato), gli idrossammati (tricostatina A), peptidi tetraciclici (trapossina A) e benzammidi<sup>[7]</sup>. Il modello di azione prediletto è quello legato all'azione antitumorale e all'arresto del ciclo cellulare<sup>[8]</sup>.

## **1.7 Produzione di proteine ricombinanti**

Con il termine proteina “ricombinante” si intende un particolare tipo di proteina che non viene prodotta all’interno del suo organismo “naturale” ma che viene espressa all’interno di altri organismi, denominati “ospiti”. All’interno dell’ospite più idoneo vengono inserite porzioni di DNA circolare, dette plasmidi o vettori di espressione, nelle quali viene inserita la porzione di DNA che codifica per la proteina di interesse, la cui espressione viene attivata da sistemi detti promotori. Efficienti strategie nel campo delle biotecnologie molecolari sono state messe a punto per soddisfare la continua e crescente richiesta imposta dal mercato. In particolare, la produzione di proteine ricombinanti richiede grandi quantità, un’elevata qualità e un basso costo del prodotto finito. La quantità e la qualità del prodotto è estremamente vincolata alla scelta del sistema ospite-vettore ed è necessario prestare particolare attenzione a tutti i parametri ed alle variabili in gioco durante l’espressione.

### **1.7.1 Scelta dell’organismo ospitante**

La produzione di proteine ricombinanti può avvenire mediante l’utilizzo di organismi procarioti o eucarioti. Come accennato in precedenza, la scelta della combinazione vettore-ospite più appropriata e stabile è una delle variabili che influenza maggiormente l’esito della produzione. Nello specifico, gli organismi ospitanti possono essere di vari tipi:

- sistemi procarioti:
  - ✓ batteri
- sistemi eucarioti
  - ✓ lieviti (ad esempio *Saccharomyces cerevisiae*)
  - ✓ funghi (ad esempio *Aspergillus niger*)
  - ✓ cellule vegetali
  - ✓ cellule animali
  - ✓ cellule di insetto (*Baculovirus*)

I microrganismi procarioti hanno il vantaggio di essere estremamente economici e facilmente manipolabili; consentono, infatti, una produzione più veloce ed un’alta resa poiché possono essere cresciuti in tempi ridotti. Inoltre, la disponibilità di numerosi vettori di espressione con un’alta efficacia e di promotori forti garantisce un elevato grado di espressione della proteina target. Allo stesso tempo, questi sistemi possiedono

qualche svantaggio; non sono in grado di garantire modifiche post-traduzionali, come ad esempio la glicosilazione, l'acetilazione e la fosforilazione. Le modifiche post-traduzionali sono necessarie per il corretto svolgimento delle complesse funzioni della proteina in quanto ne determinano la giusta conformazione o "folding"; la mancanza del corretto ripiegamento può portare ad una mancanza di attività ma anche a difficoltà legate all'interazione della proteina di interesse con altre biomolecole<sup>[9]</sup>. Per questo motivo, nel caso in cui siano necessarie questo tipo di modifiche, spesso è necessario scegliere un sistema più idoneo, come ad esempio lieviti o cellule più sofisticate<sup>[10]</sup>. Il *baculovirus* è un sistema molto utilizzato per la produzione di proteine ricombinanti tra le quali anche HDAC1 (Histone Deacetylase 1). Questo virus, in forma di bastoncino, infetta cellule di insetto e viene utilizzato come vettore d'espressione per questo sistema. Il suo utilizzo presenta numerosi vantaggi tra i quali la presenza di un forte promotore, una gamma limitata di ospiti e non ha la capacità di infettare invertebrati. In aggiunta sembra che le cellule di insetto siano molto utili nella produzione di glicoproteine ricombinanti. Lo svantaggio principale è dato dalle basse rese di proteina pura.

### **1.7.2 Escherichia coli nella produzione di proteine ricombinanti**

Tra i sistemi procariotici più utilizzati va menzionato il batterio gram-negativo *Escherichia coli*; il suo ampio utilizzo è giustificato dall'estrema semplicità di tale microrganismo dal punto di vista genetico e delle sue caratteristiche fisiologiche. Questo tipo di sistema presenta numerosi vantaggi tra cui l'ampia varietà di vettori di espressione disponibili, che possono essere scelti in base al tipo di produzione desiderata. La trasformazione delle cellule del batterio avviene attraverso l'inserimento del plasmide, presente nell'ambiente esterno alla cellula, attraverso la membrana cellulare. Questo meccanismo per *E. coli* non è "naturale" ma può essere indotto artificialmente attraverso una procedura che utilizza un campo elettrico per favorire la penetrazione del DNA plasmidico all'interno dell'ospite (elettroporazione); l'efficienza di questo processo risulta essere particolarmente elevata. Un altro vantaggio associato ad *Escherichia coli* è l'ampia conoscenza delle condizioni ottimali associate alle fasi della sua crescita; esso, infatti, necessita di terreni colturali poco costosi e questo permette un'ulteriore miglioramento dell'espressione e una maggiore resa finale<sup>[10]</sup>.

La produzione della proteina di interesse in *E. coli* può essere incrementata significativamente attraverso l'utilizzo di sistemi colturali caratterizzati da un'elevata concentrazione cellulare, i quali possono raggiungere valori pari a 100 g (peso secco)/L.

Diversi studi inerenti ai processi fermentativi hanno dimostrato che numerose variabili, quali il terreno colturale, il pH e la temperatura di crescita, sono possono influenzare il processo di traduzione dell'mRNA così come i livelli di produzione e di secrezione<sup>[11]</sup>. Al contrario esistono anche alcuni svantaggi legati all'utilizzo di questo tipo di batterio: tra i più rilevanti, come già accennato, vi è l'impossibilità di effettuare modifiche post-traduzionali a livello della proteina. Uno svantaggio legato all'elevata sovra-espressione riguarda la possibile formazione di aggregati proteici poco solubili (chiamati corpi di inclusione), i quali possono impedire alla proteina di svolgere la sua attività nella maniera corretta. Grande attenzione va posta anche sulla presenza di alcuni enzimi, detti proteasi, i quali, se presenti durante il processo di purificazione, possono portare alla degradazione del prodotto.

### **1.7.3 Sistemi di espressione**

Un vettore di espressione per organismi procarioti che risulti ben congeniato deve contenere una serie di elementi genetici perfettamente configurati, i quali influenzano gli aspetti trascrizionali e traslazionali legati alla produzione della proteina. Inoltre, l'aggiunta di un gene che conferisce antibiotico-resistenza facilita la selezione del vettore. I componenti essenziali associati ad un sistema di espressione sono:

- **Promotore**

Il promotore viene utilizzato per dare inizio alla trascrizione ed è posizionato a monte della sequenza che codifica per la proteina di interesse; generalmente ha la caratteristica di essere inducibile e, quindi, la trascrizione ha inizio solo nel momento in cui viene aggiunto un induttore specifico. Inoltre, questo elemento deve avere caratteristiche che favoriscano al massimo l'espressione come ad esempio un basso livello trascrizionale basale ma anche un'induzione semplice e conveniente. Esistono numerosi sistemi basati sull'utilizzo di promotori quali lattosio o arabinosio ( $P_{lac}$  e  $P_{BAD}$ ).

- **Terminatore di trascrizione**

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

- **Origine di replicazione**

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

- **Resistenza ad antibiotico (marker di selezione)**

I marcatori di resistenza vengono utilizzati per conferire maggiore stabilità al sistema di espressione e possono essere di vari tipi; generalmente la resistenza conferita avviene nei confronti di antibiotici quali ampicillina, tetraciclina o cloramfenicolo.

- **Utilizzo dei codoni**

I codoni vengono utilizzati per porre fine al processo di traduzione e lo migliorano aumentandone l'efficienza<sup>[11]</sup>.

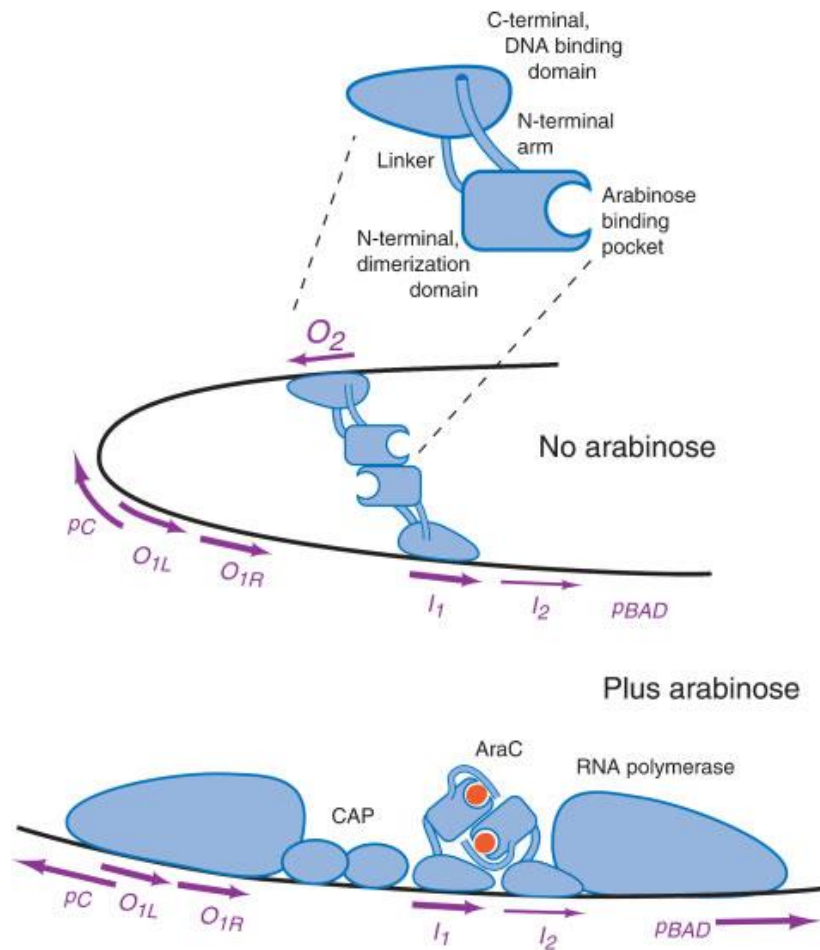
### 1.7.3.1 Il sistema di espressione pBAD

Come accennato in precedenza, è spesso vantaggioso esprimere un gene eterologo mediante l'ausilio di un promotore inducibile. Esistono numerosi vettori di espressione basati su un tipo di espressione controllata da promotori forti e inducibili; generalmente è altamente richiesta una modulazione dell'espressione tale da raggiungere livelli di sintesi simili a quelli del gene *wild-type*<sup>[12]</sup>. Uno dei sistemi più utilizzati è quello basato sul promotore P<sub>BAD</sub> dell'operone dell'arabinosio *araBAD*. Tale operone è costituito da tre geni, *araA*, *araB*, e *araD* coinvolti nel catabolismo iniziale dell'L-arabinosio, zucchero a cinque atomi di carbonio. L'arabinosio viene convertito a D-xilulosio-5-fosfato, prodotto finale utilizzato nella via dei pentoso fosfati. Diversi studi hanno identificato l'attività enzimatica delle diverse proteine associate ai diversi geni:

- AraA: L-arabinosio isomerasi che converte arabinosio a L-ribulosio
- AraB: chinasi che fosforila L-ribulosio formando L-ribulosio-fosfato
- AraD: epimerasi che converte L-ribulosio-fosfato di D-xilulosio-fosfato

L'operone *ara* comprende anche il gene *araC* che funge da regolatore positivo, attivando la sintesi dei tre enzimi quando è presente arabinosio nel terreno di coltura. Tuttavia è bene specificare che la proteina AraC, presente come dimero, si comporta da regolatore sia positivo che negativo. Infatti, in assenza di arabinosio, la proteina dimerica AraC si trova a contatto con due siti sul DNA, I<sub>1</sub> e O<sub>2</sub>, separati da 210 paia di basi; un monomero si trova a contatto con un sito e l'altro monomero lega l'altro sito, generando così un *loop* nella struttura del DNA che non consente libero accesso alla RNA polimerasi. Quando, invece, è presente arabinosio, la proteina AraC si lega ai due siti adiacenti I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> sul

DNA; questa condizione stimola la trascrizione e l'espressione genica a partire dal promotore  $P_{BAD}$  che interagisce direttamente con la RNA polimerasi.



**Figura 1.6.** L'immagine mostra la struttura del dimero della proteina AraC e la sua interazione con arabinosio. Il legame di AraC con  $O_2$  e  $I_1$  forma un anello (*loop*) di DNA in assenza di arabinosio. Al contrario, dopo il legame con arabinosio, AraC si lega ai siti  $I_1$  e  $I_2$  stimolando la trascrizione dei geni dell'operone. Tratto da Schleif R., "AraC protein: a love-hate relationship", *BioEssays*, 2003, 25: 274–282.

L'operon *ara* comprende anche due sistemi di trasporto per l'arabinosio: *araE*, che sfrutta un potenziale elettrochimico per il trasporto (trasportatore a bassa affinità), e *araFGH* trasportatori ad alta specificità.

Il sistema in generale possiede, quindi, numerosi vantaggi tra i quali la possibilità di attivare o spegnere l'induzione dell'espressione in modo semplice<sup>[13][14]</sup>.

## 2. Scopo della tesi

La produzione di proteine ricombinanti in organismi procarioti è un campo in continuo sviluppo, soggetto a numerosi e progressivi tentativi di miglioramento. A partire da studi di laboratorio, il processo deve essere esteso su scala industriale per ottenere grandi quantità di una proteina di interesse. Una delle variabili che influenza l'esito della produzione, è la scelta della combinazione vettore-ospite più appropriata; in base alla composizione di questo binomio ed alle condizioni di crescita utilizzate, la quantità di proteina espressa può variare in modo considerevole. Molto utilizzato come ospite per la produzione di proteine ricombinanti è *Escherichia coli*.

L'enzima umano Istone Deacetilasi 1 (HDAC1) possiede attività deacetilasi ed è coinvolto in numerosi processi biologici cellulari; di conseguenza, è oggetto di studio in campo farmaceutico e la sua produzione risulta estremamente importante per l'identificazione di suoi inibitori, da utilizzare per scopo terapeutico.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato tentare di migliorare la produzione eterologa di tale proteina in *E. coli* confrontando due diversi sistemi di espressione. In un lavoro precedente, infatti, era stata indagata la possibilità di produrre HDAC1 in un sistema batterico, ma le rese del processo erano risultate limitate. Durante questo studio, quindi, sono state analizzate diverse condizioni per cercare di ottimizzare l'espressione e la successiva purificazione di HDAC1. Come secondo obiettivo, inoltre, è stato studiato il fenomeno di aggregazione che si osserva per la proteina purificata. Il protocollo di purificazione messo a punto, infatti, consente di ottenere HDAC1 pura ma la proteina risulta aggregata (presumibilmente in forma ottamerica). Affinché un processo di produzione di proteine ricombinanti possa essere applicato su scala industriale è fondamentale che il prodotto di interesse sia attivo e presenti una corretta conformazione. L'aggregazione, infatti, può influenzare l'attività biologica di un enzima. Risulta, quindi, fondamentale studiare le cause del fenomeno aggregativo per potere definire una procedura che consenta di produrre HDAC1 in forma monomerica.

### 3. Materiali e Metodi

#### 3.1 Ceppi Batterici

I ceppi batterici di *Escherichia coli* utilizzati nel seguente lavoro sono elencati nella tabella sottostante:

<i>Ceppo</i>	<i>Genoma</i>	<i>Produttore</i>
TOP10	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 $\lambda^-$	Invitrogen
BW25993	$\Delta$ (araD-araB)567, $\lambda^-$ , rph-1, $\Delta$ (rhaD-rhaB)568, hsdR514	CGSC

#### 3.2 Vettore di espressione

Il vettore utilizzato per l'espressione della proteina HDAC1, con entrambi i ceppi di *Escherichia coli*, è il plasmide pBAD/HisB (Invitrogen<sup>TM</sup>, figura 3.1), in cui il gene di interesse è stato clonato a valle del promotore pBAD (operon *ara*). Di conseguenza, l'espressione di HDAC1 è indotta con arabinosio ed è regolata dalla presenza della proteina AraC, che funge da attivatore.

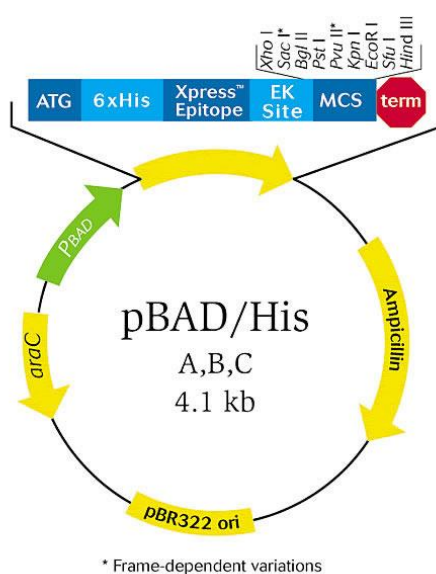


Figura 3.1



Il ceppo TOP10/pBAD-HDAC1 era stato precedentemente preparato nel laboratorio ospitante e conservato a -20 °C in terreno di coltura LB liquido contenente glicerolo 20 %. Il ceppo BW25993/pBAD-HDAC1, invece, è stato preparato durante il presente lavoro di tesi.

### **3.3 Terreni e condizioni di coltura**

Per tutte le colture è stato utilizzato terreno LB (Luria-Bertani) avente la seguente composizione:

- Triptone Enzymatic Digest 10 g/L
- Estratto di lievito 5 g/L
- NaCl 10 g/L

I ceppi sono stati coltivati su terreni solidi, in piastre per microbiologia, e su terreni liquidi in beuta. Il terreno LB solido è stato ottenuto aggiungendo agar (15 g/L) al terreno liquido. Tutti i terreni, prima dell'utilizzo, sono stati sterilizzati mediante autoclave, eseguendo un ciclo di 20 minuti a 120 °C con pressione pari a 1 atm. Ai terreni sono stati aggiunti, dopo autoclave, i seguenti antibiotici per la selezione dei ceppi:

- Ampicillina: concentrazione finale 100 µg/ml
- Cloramfenicolo: concentrazione finale 25 µg/ml

Il ceppo TOP10/pBAD-HDAC1 presenta resistenza all'ampicillina; infatti, la resistenza è conferita dal plasmide. Il ceppo BW25993/pBAD-HDAC1 presenta resistenza all'ampicillina, conferita dal plasmide, oltre a resistenza al cloramfenicolo data dal ceppo. Per indurre l'espressione della proteina ricombinante, è stato aggiunto arabinosio alle colture batteriche con concentrazione finale pari a 1,3 mM e 0,13 mM, a seconda dei casi.

### **3.4 Preparazione delle cellule elettrocompetenti**

Affinché una coltura batterica possa subire una trasformazione, essa deve essere incubata in presenza di DNA libero; *competenza* è il termine con cui si indica lo specifico stato fisiologico in cui si trova il batterio pronto per la trasformazione. Il ceppo desiderato, BW25993, è stato scongelato e cresciuto a 37 °C in piastra con terreno solido contenente cloramfenicolo. Successivamente, è stata prelevata una colonia singola, trasferita in 1 ml

di terreno contenente l'antibiotico e lasciata crescere *overday* (d'ora in avanti abbreviato con la sigla *o/d*) a 37 °C. In seguito a diluizione (1:1000) in 5 ml di terreno fresco, la coltura è stata lasciata crescere *overnight* (da qui in poi abbreviato con sigla *o/n*) a 37 °C. Il giorno seguente è stata eseguita una diluizione 1:250 in 25 ml di terreno ed è stata cresciuta la coltura per circa 3 h 37 °C. La crescita è stata controllata con l'ausilio di uno spettrofotometro (Gene Quant, Amersham Biosciences) con lunghezza d'onda impostata a 600 nm per monitorare la crescita delle colture cellulari. Raggiunto un valore di  $OD_{600} = 0,5-0,7$ , la coltura è stata posta in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugata a 4000 rpm per 15 minuti a 4 °C. Operando in condizioni di sterilità, sono stati effettuati lavaggi ripetuti del pellet cellulare con una soluzione fredda di glicerolo sterile al 10 % (w/v), dimezzando di volta in volta il volume di glicerolo aggiunto ed eliminando il surnatante. Le cellule, infine, sono state risospese in 1 ml di soluzione e suddivise in aliquote da 50 µl ciascuna (congelate a -20 °C).

### **3.5 Determinazione della densità ottica (Optical Density)**

La massa cellulare di una coltura batterica può essere misurata attraverso metodi diretti o indiretti. Tra i metodi indiretti vi è la determinazione della densità ottica (OD) a 600 nm, che è direttamente proporzionale alla quantità di cellule presenti nella coltura batterica. Il valore di assorbanza è stato determinato utilizzando opportune diluizioni delle colture cellulari e lo spettrofotometro Gene Quant (Amersham Biosciences) impostato alla lunghezza d'onda specifica.

### **3.6 Estrazione del DNA plasmidico**

Per estrarre il DNA plasmidico (pBAD-HDAC1), necessario alla trasformazione delle cellule competenti, è stato utilizzato il kit per estrazione Plasmid Midi Kit (Quiagen, USA). A partire da un pre-inoculo, è stata effettuata una diluizione 1:1000 della coltura di *E. coli* TOP10/pBAD-HDAC1 in 100 ml di terreno fresco. Dopo crescita a 37 °C o/n, il pellet ottenuto è stato poi risospeso in 4 ml di buffer P1 (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasi A) e 4 ml di buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS w/v). La lisi cellulare è stata completata aggiungendo 4 ml di buffer P3 (3 M potassio acetato pH 5.5) secondo quanto riportato nel protocollo. La miscela è stata centrifugata a 10.000 rpm per 50 minuti ed il surnatante, filtrato, è stato caricato in colonna (Quiagen-tip 20) opportunamente equilibrata con 4 ml di tampone QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS

pH 7.0, 15 % isopropanolo v/v, 0,15 % Triton X-100 v/v). Eseguiti due lavaggi con 10 ml di tampone QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanolo v/v) il DNA è stato eluito con 5 ml di tampone QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15 % isopropanolo v/v) e precipitato con 3,5 ml di isopropanolo. Dopo centrifugazione (10.000 rpm per 40 minuti), il pellet è stato lavato con etanolo al 70 % prima di essere risospeso in un volume di 80 µL di acqua.

### **3.7 Quantificazione del DNA**

La quantificazione del DNA viene eseguita mediante misura allo spettrofotometro a 260 nm, utilizzando una cuvetta di quarzo. Secondo parametri standard, una soluzione di DNA avente concentrazione pari a 50 µg/ml presenta un valore di OD<sub>260</sub> uguale a 1 (se il cammino ottico corrisponde a 1 cm). Per valutare l'accuratezza della purificazione viene preso in esame il rapporto OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> che considera eventuali contaminanti, come proteine, le quali presentano assorbimento massimo a 280 nm, OD. La sospensione risulta essere pura nel caso in cui il rapporto abbia un valore compreso tra 1.8 e 2. Il DNA plasmidico estratto è stato opportunamente diluito in acqua per eseguire le misure allo spettrofotometro (Gene Quant, Amersham Biosciences).

### **3.8 Elettroforesi su gel di agarosio**

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica utilizzata per separare acidi nucleici, molecole che a pH neutro sono caratterizzate da cariche negative. Si sfrutta un campo elettrico che ne permetta la migrazione verso l'anodo attraverso un gel che funziona da mezzo di migrazione. Quest'ultimo è costituito da un polimero lineare (agarosio) che forma una matrice semisolida caratterizzata da una rete di pori che consente di separare le molecole in base alle dimensioni.

Il gel è stato preparato con una soluzione di agarosio all'1 % in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Nel gel, insieme al campione di DNA plasmidico da analizzare, è stato caricato un marcatore di DNA a peso molecolare noto (1 kbp Ladder DNA, Fermentas). Eseguita la corsa elettroforetica ad un voltaggio pari a 85 V per 1 h, il gel è stato immerso in una soluzione di bromuro di etidio, molecola fluorescente intercalante degli acidi nucleici, per 45 minuti in agitazione. Per visualizzare le bande di DNA nel gel è stato utilizzato l'apparato di rilevazione Gel Doc (Bio-Rad) in grado di irradiare il gel con raggi UV e rilevare la fluorescenza emessa mostrando l'immagine relativa.

### 3.9 Elettroporazione

L'elettroporazione è un metodo che utilizza un impulso elettrico per creare pori provvisori nella membrana di una sospensione cellulare e permettere al DNA in soluzione di penetrare all'interno. Aliquote di cellule competenti sono state scongelate in ghiaccio, quindi sono state aggiunte diverse quantità di DNA plasmidico (3-5 ng). Le sospensioni sono state trasferite in cuvette per elettroporazione da 0,1 cm (Bio-Rad) ed è stato impostato un voltaggio pari a 1,8 kV mediante l'utilizzo dell'elettroporatore Gene-Pulser (Bio-Rad). Eseguito l'impulso, le cellule sono state trasferite in 1 mL di terreno SOC (LB, glucosio 0,2 %, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 2,5 mM KCl) e mantenute in incubazione per 1 h a 37 °C. Opportune diluizioni sono state trasferite su terreno LB solido contenente ampicillina e cloramfenicolo. Le piastre sono state incubate *o/n* a 37 °C in modo tale da selezionare i cloni trasformati contenenti il plasmide pBAD-HDAC1.

### 3.10 Prove di espressione

Sono state eseguite diverse prove di espressione con entrambi i ceppi batterici per valutare l'efficacia del sistema di espressione modificando alcuni fattori fondamentali quali la temperatura di induzione, la concentrazione di induttore ed il tempo di induzione. Tali prove sono state realizzate utilizzando piccoli volumi di colture batteriche. Colonie singole sono state prelevate da piastre Petri e trasferite in 1 ml di terreno; l'incubazione è avvenuta *o/d* a 37 °C. Successivamente, è stata effettuata una diluizione 1:500 in 5 ml di terreno per la crescita *o/n* a 37 °C. Il giorno seguente le colture sono state trasferite (diluizione 1:250) in 10 mL di terreno fresco per eseguire le varie prove, come riportato in tabella:

<b>CEPPO</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Concentrazione di induttore</b>	<b>Tempo</b>
TOP10/pBAD-HDAC1	30 °C 37 °C	130 mM	<i>overnight</i>
		13 mM	
		1.3 mM	
		0.13 mM	
BW25993/pBAD-HDAC1	30 °C 37 °C	1.3 mM	<i>overnight</i>
		0.13 mM	

In parallelo è stato preparato un controllo negativo (campione non indotto). Le colture sono state centrifugate alla massima velocità per qualche minuto ed i pellet ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi SDS-PAGE.

### **3.11 Curve di crescita**

La crescita di un microrganismo, come *Escherichia coli*, è influenzata da numerosi fattori quali la temperatura, il terreno di coltura, la presenza e concentrazione di un dato induttore. Per determinare la curva di crescita specifica di un ceppo microbico si valuta la variazione del numero di cellule nel tempo mediante analisi spettrofotometrica.

In particolare, la cinetica di crescita di *E. coli* TOP10/pBAD-HDAC1 è stata determinata utilizzando delle beute contenenti 20 ml di terreno. Una volta effettuato l'inoculo (1:500) a partire da una coltura cresciuta o/n a 37 °C, la misura della torbidità cellulare è stata eseguita ad intervalli di tempo definiti utilizzando un turbidimetro (Biolog) che misura la trasmittanza (%). Per ottenere il valore di densità ottica, i valori di trasmittanza sono stati convertiti in valori di assorbanza attraverso la relazione  $A = -\log T$ . L'arabinosio è stato aggiunto alle colture ad un valore di OD pari a 0.7-0.8.

### **3.12 Protocollo di espressione della proteina**

Il protocollo di espressione prevede una serie di passaggi che consentono di ottenere la proteina ricombinante di interesse, facendo particolare attenzione alla scelta delle condizioni di crescita ed alla modalità di induzione dell'espressione.

Le prove preliminari di espressione hanno permesso di definire il protocollo ottimale per i due ceppi, come descritto in tabella:

<b>CEPPO</b>	<b>Diluizione del preinoculo (o/n)</b>	<b>Diluizione della coltura (o/d)</b>	<b>Temperatura di crescita (o/d)</b>	<b>Temperatura di induzione (o/n)</b>	<b>Concentrazione di induttore</b>
TOP10/pBAD-HDAC1	1:500	1:250	37 °C	37 °C	0,13 mM
BW25993/pBAD-HDAC1	1:1000	1:500	30 °C	30 °C	1,3 mM

Per ciascun ceppo sono stati preparati 3 L di coltura. I pellet cellulari, recuperati mediante centrifugazione, sono stati congelati a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  prima di procedere con la purificazione.

### **3.13 Estrazione delle proteine**

I pellet cellulari sono stati risospesi nel tampone di lisi (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) utilizzando l'omogeneizzatore Potter per rendere uniforme la soluzione proteica e aggiungendo PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) come inibitore di proteasi. Il campione è stato sottoposto a cicli di sonicazione (Sonicator 3000, Misonix) della durata totale di 4 minuti ciascuno, in cui si alternano 15 secondi di sonicazione e 15 secondi di pausa, con potenza di 18 W. Una volta completata la lisi, il campione è stato centrifugato per 30 minuti a 10.000 rpm e successivamente il surnatante ottenuto è stato filtrato su filtro a pieghe per eliminare eventuali residui.

### **3.14 Tecniche cromatografiche**

Le tecniche cromatografiche sono tecniche separative utilizzate nella purificazione di biomolecole. La cromatografia sfrutta due diverse fasi; una fase stazionaria fissa a contatto con una fase mobile che si muove con continuità.

Per la purificazione della proteina di interesse sono state utilizzate diverse tecniche in sequenza, le quali si differenziano per la fase stazionaria utilizzata:

- 1) Cromatografia a scambio anionico Q-Sepharose Fast Flow
- 2) Cromatografia di affinità HiTrap Heparine
- 3) Cromatografia di affinità Poly-L-Lysine
- 4) Cromatografia ad esclusione molecolare Superdex 200

Tutte le colonne utilizzate sono state collegate ad un apparato cromatografico (Pharmacia Biotech) dotato di una pompa peristaltica (Pharmacia LKB Pump P-1) con la quale è possibile impostare e variare il flusso. La corsa cromatografica è stata seguita mediante un detector UV (Pharmacia LKB Control Unit UV-1) che rileva la variazione di assorbanza (280 nm). Alla fine si ottiene un cromatogramma, in cui l'assorbanza varia in funzione del volume di eluizione.

Per tutte le cromatografie si procede filtrando e degasando le soluzioni impiegate in colonna. Prima del caricamento del campione, viene eseguito un lavaggio della colonna con acqua (5/10 volumi di colonna), seguito dal condizionamento con il tampone opportuno (5/10 volumi di colonna).

### **3.14.1 Cromatografia a scambio anionico: Q-Sepharose Fast Flow**

La cromatografia a scambio ionico si basa sul principio di attrazione tra ioni di carica opposta. La fase stazionaria è solida ed è costituita da una matrice di resina sulla quale si trovano gruppi funzionali carichi positivamente o negativamente.

La cromatografia a scambio anionico, nello specifico, utilizza una fase stazionaria caratterizzata da una matrice sulla quale sono presenti gruppi funzionali caricati positivamente. Il punto isoelettrico (pI) è il valore di pH al quale la proteina non presenta carica netta; in tali condizioni la proteina non è in grado di interagire con i gruppi carichi della resina. Al di sopra del pI, la proteina presenta carica netta negativa e può quindi interagire con un mezzo carico positivamente. La proteina HDAC1 possiede un pI teorico di circa 5.3 e per avere carica netta negativa è necessario lavorare con valori di pH al di sopra del punto isoelettrico: per tale motivo è stato mantenuto il pH pari a 8. La colonna utilizzata (1,6 x 25 cm) è impaccata con la resina Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) caratterizzata da una matrice di agarosio (6 %) con gruppi funzionali carichi (volume totale di 50 mL) e con una dimensione media delle particelle è di 90 µm. Il gruppo funzionale è un'ammina quaternaria,  $-O-CH_2N^+(CH_3)_3$ , uno scambiatore forte di anioni in grado di interagire con le proteine cariche negativamente. La colonna durante tutta la cromatografia è stata mantenuta in condizioni refrigerate (4 °C) per la conservazione delle proteine presenti nel campione.

Il condizionamento della colonna è stato eseguito a flusso 2 mL/min con il Buffer A (tabella 3.1) mentre l'eluizione è stata effettuata impostando un gradiente 50-600 mM NaCl, con un volume di 400 mL. Alle frazioni eluite (volume di 6 mL) è stato aggiunto un ugual volume di buffer C (tabella 3.1) per abbassare la concentrazione di sale ed aggiungere il glicerolo.

<b>Q-Sepharose: tamponi utilizzati</b>		
<b>BUFFER A</b>	<b>BUFFER B</b>	<b>BUFFER C</b>
Tris-base 50 mM NaCl 50 mM EDTA 1 mM pH 8	Tris-base 50 mM NaCl 2M EDTA 1mM pH 8	Tris-base 50 mM EDTA 1mM Glicerolo 40 % pH 8

**Tabella 3.1**

### **3.14.2 Cromatografia di affinità: HiTrap Heparine**

La cromatografia di affinità consiste in un processo di separazione di biomolecole che sfrutta le loro interazioni specifiche con un ligando immobilizzato su una matrice presente nella fase stazionaria. Tale interazione è specifica e reversibile. Nel caso della separazione di proteine, si sfruttano le loro proprietà biologiche e la loro struttura. Generalmente la fase stazionaria è costituita da una matrice alla quale è attaccato un braccio spaziatore che lega il ligando in modo covalente. La proteina di interesse interagisce con il ligando in maniera specifica mentre tutte le proteine che non si legano vengono eliminate tramite un ripetuto lavaggio. Per favorire il distacco della proteina, viene impostato un gradiente lineare opportuno, il quale permette l'eluizione della molecola target.

Nel nostro studio, come secondo passaggio di purificazione, è stata utilizzata la colonna pre-impaccata HiTrap Heparine HP (GE), caratterizzata da una matrice costituita da catene di agarosio 6 % (volume 5 mL). La dimensione media delle particelle è di 34 µm e su di esse si trova immobilizzato, attraverso legami covalenti, il ligando costituito da eparina, un glicosaminoglicano estratto dall'intestino porcino.

La colonna è stata condizionata con 50 mL di tampone A (flusso 1 mL/min, tabella 3.2) prima del caricamento del campione (flusso 0,5 mL/min). L'eluizione è stata eseguita mediante gradiente 50-800 mM di NaCl, in un volume di 50 mL, con flusso 1 mL/min e sono state raccolte frazioni da 1 mL.



<b>HiTrap Heparine: tamponi utilizzati</b>	
<b>BUFFER A</b>	<b>BUFFER B</b>
Tris-base 50 mM NaCl 50 mM EDTA 1 mM Glicerolo 20 % pH 8	Tris-base 50 mM NaCl 2M EDTA 1mM Glicerolo 20 % pH 8

**Tabella 3.2**

### **3.14.3 Cromatografia di affinità: poly-L-lysine**

Come terzo passaggio di purificazione è stata utilizzata una colonna impaccata con la resina Poly-L-Lysine-Agarose (Sigma-Aldrich). Tale resina è costituita da sfere di agarosio (4 %), caratterizzate da diversi gradi di cross-linking intra-catena. Il ligando presente è la poli-L-lisina, un omo-polipeptide derivato dall'amminoacido lisina. Il sito di legame del ligando alla resina è il gruppo amminico in posizione  $\epsilon$  e non in posizione  $\alpha$ , come avviene di solito. L'attivazione della resina ed il legame del gruppo amminico alla matrice è stato realizzato mediante l'uso di CNBr (bromuro di cianogeno).

La resina (5 mL) è stata impaccata in una colonna 1,5 x 15 cm. Il caricamento è stato eseguito a flusso 0,5 mL/min, mentre tutte le altre fasi sono state effettuate con flusso 0,6 mL/min. Per l'eluizione è stato impostato un gradiente lineare 50 mM-1M NaCl (volume 50 mL).

<b>Poly-L-lysine: tamponi utilizzati</b>	
<b>BUFFER A</b>	<b>BUFFER B</b>
Tris-base 50 mM NaCl 50 mM EDTA 1 mM Glicerolo 20 % pH 8	Tris-base 50 mM NaCl 2M EDTA 1mM Glicerolo 20 % pH 8

**Tabella 3.3**

#### **3.14.4 Cromatografia ad esclusione molecolare: Superdex 200**

Come fase finale di purificazione è stata utilizzata una cromatografia ad esclusione molecolare, la quale separa le molecole in base alla loro forma ed al peso molecolare utilizzando una resina che funge da setaccio molecolare. Nel nostro caso, è stata utilizzata la resina Superdex 200 (GE) costituita da agarosio *cross-linked* (legami intracatena) e destrano, collegati da legami ramificati. Il polimero risultante possiede un reticolo tridimensionale poroso, con particelle del diametro di 34  $\mu\text{m}$  e con caratteristiche di gel, per questo il procedimento che utilizza questi materiali è anche denominato *gel filtration*.

La colonna utilizzata (1,6 x 70 cm, con volume di 140 mL) è stata mantenuta in condizioni refrigerate durante tutto il processo. La cromatografia è stata eseguita con il tampone Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Glicerolo 20 % (pH 8), mantenendo il flusso costante a 0,6 mL/min e raccogliendo frazioni da 0,9 mL. Per il caricamento del campione è stato usato un loop da 2 mL.

#### **3.15 Concentrazione**

La concentrazione dei campioni proteici è stata effettuata utilizzando celle Amicon (Millipore) di diversi volumi, dotate di agitatore magnetico. Tali celle utilizzano una membrana in cellulosa rigenerata (Millipore) con cut-off di 30 kDa, precedentemente lavata con acqua distillata. Per consentire il passaggio delle proteine attraverso la membrana viene applicata una pressione, impostando un flusso di azoto, non superiore a 0.8-0.9 bar. Una volta raggiunto il volume finale desiderato vengono quantificate le proteine in previsione del caricamento nella colonna successiva.

#### **3.16 Elettroforesi SDS-PAGE**

L'SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) è una tecnica elettroforetica che permette la separazione di proteine in base alla loro massa molecolare. Il detergente anionico SDS, forte agente denaturante delle proteine, reagisce spezzando quasi tutte le interazioni intramolecolari non covalenti ed idrofobiche e permette di ottenere proteine denaturate, in forma lineare, dotate di carica negativa. La separazione, quindi, avviene solo ed esclusivamente in base alle dimensioni delle catene polipeptidiche. Inoltre, si utilizza  $\beta$ -mercaptoetanololo per favorire la riduzione dei ponti disolfuro. Ai campioni viene aggiunto Sample Buffer 5X (Tris-HCl 500 mM pH 6.8,

SDS 10 %,  $\beta$ -mercaptoetanololo 5 %, colorante Blu Bromofenolo 0,5 %) e prima del caricamento in gel si procede alla bollitura per circa 5 minuti per favorire la denaturazione completa. Per la separazione si utilizza un gel di poliacrilammide costituito da due parti distinte:

- *Stacking gel* (acrilammide al 4 %, SDS 0,2 %, Tris-HCl 0,25 M a pH 6.8, ammonio persolfato 0,25 %, TEMED 0,1 %): costituisce la parte superiore del gel e permette il caricamento e la concentrazione dei campioni.
- *Running gel* (acrilammide 10 %, SDS 0,2 %, Tris-HCl 0,25 M a pH 8.8, ammonio persolfato 0,25%, TEMED 0,1 %): costituisce la parte inferiore e serve per separare le proteine presenti in miscela in base alla loro massa.

Per la corsa si utilizza un tampone specifico (Tris-Glicina-SDS a pH 8.3) posto all'interno della cella (Mini-Protean, Bio-Rad) contenente i gel. Attraverso l'applicazione di un voltaggio costante pari a 120 V avviene la penetrazione delle proteine all'interno del *running gel* e la migrazione verso l'anodo. Per valutare la dimensione delle proteine separate si utilizza un *marker* contenente bande con pesi molecolari noti (Unstained Protein Molecular Marker, Fermentas).

### **3.17 Elettroforesi Nativa**

Un'altra modalità con cui può essere eseguita l'elettroforesi per la separazione di proteine è l'elettroforesi nativa. Con il termine "nativa" si indica il particolare stato conformazionale in cui si ripiega la proteina nella sua forma naturale. In tale metodica, infatti, non vengono impiegati agenti denaturanti e le proteine non vengono caricate negativamente di conseguenza la separazione avviene in base sia alle dimensioni che alla carica netta. I gel vengono preparati senza SDS ed il running gel viene utilizzato con una concentrazione di acrilammide al 7,5 % (stesse composizioni dei gel usate per SDS-PAGE ma senza SDS). Il Sample Buffer 5X aggiunto ai campioni presenta stessa composizione del precedente ma è privo di SDS e  $\beta$ -mercaptoetanololo. L'elettroforesi è stata condotta con voltaggio costante pari a 100 V utilizzando il tampone di corsa privo di SDS (Tris-HCl e Glicina pH 8.3) e senza far bollire i campioni prima del caricamento in gel.

### **3.18 Colorazione di gel**

Per poter visualizzare le proteine separate in gel di poliacrilammide, al termine della corsa elettroforetica, è necessario eseguire una colorazione. In particolare, viene usato il colorante Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) che si lega alle proteine attraverso interazioni ioniche tra i gruppi acidi solfonici ed i gruppi amminici delle proteine (anche attraverso forze di Van der Waals). La sensibilità di tale metodo rientra nell'ordine dei 100 ng. Il gel viene posto nella soluzione colorante per circa 1 h, successivamente viene decolorato per l'eliminazione del colorante in eccesso con una soluzione di *destaining* (etanolo al 30% e acido acetico al 10%) fino alla comparsa di bande nitide e distinte.

### **3.19 Western Blotting**

Il *western blot* è una tecnica che permette di identificare una determinata proteina all'interno di una miscela proteica, attraverso il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Le proteine vengono prima separate, in base al loro peso molecolare, attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Affinché l'anticorpo riconosca la proteina in questione, viene poi eseguito un trasferimento, mediante campo elettrico, delle proteine dal gel ad una membrana di PVDF (polivinilidenefluoruro, Bio-Rad).

Il transfer è stato eseguito preparando una sorta di "sandwich" all'interno di un apposito supporto, i cui componenti sono stati disposti in sequenza:

1. Spugna
2. Carta da filtro
3. Membrana
4. Gel
5. Carta da filtro
6. Spugna

Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato immerso nel tampone di Transfer (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8.3) per circa 15 minuti. La membrana è stata immersa in metanolo per 10 minuti ed, in seguito, equilibrata con il transfer buffer. Analogamente anche i due supporti spugnosi e la carta assorbente sono stati equilibrati con lo stesso buffer. Il trasferimento è stato eseguito in ghiaccio con un voltaggio costante di 70 V per 75 minuti (cella Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad). La membrana è stata recuperata ed incubata *o/n* in agitazione nella *blocking solution*, contenente TBS

(Tris-Buffered Saline 1X: Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5) e latte scremato al 2 % w/v).

Il giorno seguente, la membrana è stata lavata ripetutamente in TTBS (TBS contenente Tween 0,1 %), quindi incubata per due ore in una soluzione contenente l'anticorpo primario anti-HDAC1 (Rabbit Polyclonal Antibody, Millipore) specifico per la proteina di interesse. L'anticorpo primario è stato diluito 1:2000 in 20 mL di antibody buffer (0,2 % di latte w/v sciolto in TTBS). L'eccesso di anticorpo è stato, quindi, rimosso mediante ripetuti lavaggi con TTBS (Wash Solution TTBS: Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 0,1%, pH 7.5). La membrana è stata poi incubata per un'ora con una soluzione contenente l'anticorpo secondario (Goat Anti-Rabbit AP Conjugate, Bio-Rad), in grado di riconoscere l'anticorpo primario e coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina. Sono stati effettuati nuovi lavaggi con la stessa soluzione TTBS per eliminare l'anticorpo secondario in eccesso, quindi la membrana è stata equilibrata con AP buffer (Alcaline Phosphatase Buffer: NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9.5). La rivelazione è stata eseguita, per via colorimetrica, attraverso incubazione con i substrati specifici per la fosfatasi alcalina: BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt, Bio-Rad) e NBT (p-nitro-blue tetrazolium chloride, Bio-Rad), disciolti in DMF alla concentrazione 15 mg/mL (Development solution: 300 µl di BCIP soluzione stock 15 mg/ml in DMF + 600 µl di NBT soluzione stock 15 mg/ml in DMF al 70% V/V in 30 ml di AP buffer). La reazione di colorazione è stata, infine, bloccata con acqua.

### **3.20 Quantificazione proteica**

Le proteine sono state quantificate con il saggio di Bradford. Questo metodo colorimetrico pone le sue basi sull'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) che lega i residui basici ed aromatici delle proteine, in particolar modo l'arginina. Con la formazione di questi complessi si determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 a 595 nm e la variazione viene misurata allo spettrofotometro impostato a lunghezza d'onda pari a 595 nm. Poiché il contenuto di amminoacidi è differente seconda della proteina in esame, questo metodo fornisce una misura relativa della concentrazione proteica. Prima di stimare la concentrazione dei campioni è stata realizzata una curva di taratura, sfruttando come proteina standard una soluzione di BSA (Albumina di Siero Bovino) a concentrazioni note (0,1-0,2-0,3 mg/ml). Le determinazioni sono state eseguite in doppio.

### **3.21 Prove di dissociazione**

L'aggregazione proteica è un fenomeno che può influenzare in modo importante la funzionalità delle proteine in vivo ed in vitro. Tale processo avviene a causa di vari fattori che possono essere classificati come intrinseci (struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria) ed estrinseci (ambiente in cui la proteina è presente o condizioni di processo).

Una volta ottenuta una preparazione di HDAC1 pura, sono state effettuate diverse prove di dissociazione utilizzando una gamma di reagenti che potessero favorire tale processo.

#### **3.21.1 Prove in condizioni native**

Per avere una panoramica completa dell'effetto di un'ampia gamma di additivi con azione dissociante sono state eseguite numerose prove di dissociazione in condizioni native. Aliquote della proteina HDAC1 sono state incubate, in agitazione, per 1 h ad una temperatura di 30 °C con diversi co-solventi aventi diverse concentrazioni finali. Ciascun campione è stato, quindi, analizzato in gel di acrilammide in condizioni native come descritto in precedenza. I reagenti analizzati e le relative concentrazioni sono riportati nella tabella a pagina seguente:

	<b>Reagente utilizzato</b>	<b>Concentrazione finale</b>
<b>Sali</b>	KCl	500 mM
	LiCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	200 mM
	CaCl <sub>2</sub>	200 mM
	StCl <sub>2</sub>	200 mM
	CH <sub>3</sub> COOLi	200 mM
	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	1 M
<b>Amminoacidi</b>	Arginina	250 mM
	Betaina	250 mM
<b>Acidi Grassi</b>	Acido Laurico	200 μM
	Acido Miristico	200 μM
	Acido Stearico	200 μM
<b>Alcoli</b>	Etanolo	2%
	Isopropanolo	2%
	1-butanolo	1,5%
	1-pentanolo	0,6%
	Putrescina	150 mM
	Urea	1 M
	β-mercaptoetanolo	10 mM
<b>Detergenti</b>	Triton X-100	1%
	Tween 20	1%
	SDS	0,5%

### 3.21.2 Prove di ultrafiltrazione

Le prove di dissociazione sono state ripetute per alcuni reagenti utilizzando dei filtri da centrifuga Amicon Ultra-0.5 (Centrifugal Filter Unit, Millipore) con membrana con cut-off pari a 100 kDa. In questo caso, aliquote di HDAC1 sono state incubate per 1 h a temperatura ambiente con alcuni co-solventi. Le soluzioni sono state, in seguito, sottoposte a centrifugazione a 14.000 g per 1-2 minuti. In tal modo sono stati recuperati il retentato (*up*) ed il permeato (*down*). I due campioni sono stati analizzati in gel SDS-PAGE.

I reagenti e le relative concentrazioni utilizzate sono riassunte nella tabella seguente:

	<b>Reagente utilizzato</b>	<b>Concentrazione finale</b>
<b>Amminoacidi</b>	Glicina	200 mM
	Arginina	200 mM
	Betaina	200 mM
	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	0,1 M 1 M
	Acido Stearico	200 µM
	Putrescina	100 mM
	PEG	2%
<b>Detergenti</b>	SDS (controllo positivo per ogni gel)	0,5%
	CTAB	0,5% 1%
<b>Alcoli</b>	Etanolo	2%
	Isopropanolo	2%
	1-butanolo	1,5%
	1-pentanolo	0,6%

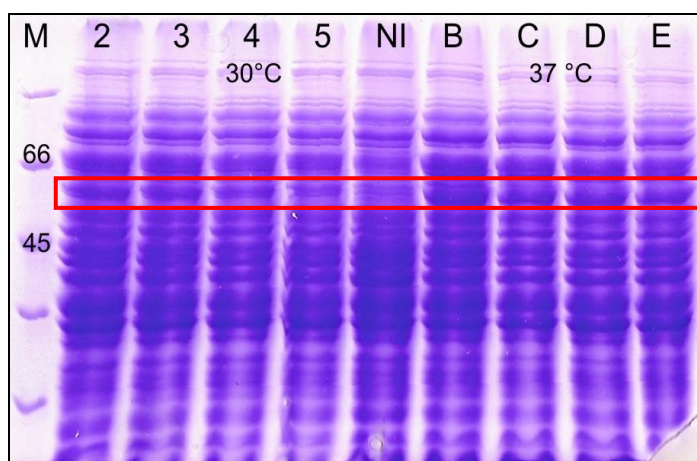


## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Produzione di HDAC1 nel ceppo di *Escherichia coli* TOP10

#### 4.1.1 Prove di espressione

Come primo studio, sono state effettuate delle prove preliminari per valutare la capacità di espressione di HDAC1 nel ceppo TOP10. Lo scopo di tali prove era determinare le giuste variabili, quali temperatura, tempo di induzione e concentrazione di induttore (arabinosio). Il ceppo di *Escherichia coli*, precedentemente trasformato con il vettore di espressione pBAD-HDAC1, è stato, quindi, sottoposto a diverse condizioni colturali (vedi paragrafo 3.10, capitolo 3 Materiali e Metodi). La quantità di proteina espressa nelle varie condizioni è stata controllata mediante elettroforesi SDS-PAGE, caricando gli estratti proteici totali ottenuti per semplice bollitura di aliquote di ciascun campione. Nel gel riportato in figura 4.1 sono visibili i *pattern* proteici corrispondenti ai vari campioni:



**Fig. 4.1.** Gel elettroforetico dei campioni cresciuti con diverse condizioni. La crescita è avvenuta a 37 °C mentre l'induzione è stata eseguita a 30 °C o 37 °C con diverse concentrazioni di arabinosio. **M:** marker; **2:** 0,13 mM; **3:** 1,3 mM; **4:** 13 mM; **5:** 130 mM; **NI:** controllo negativo senza induttore; **B:** 0,13 mM; **C:** 1,3 mM; **D:** 13 mM; **E:** 130 mM.

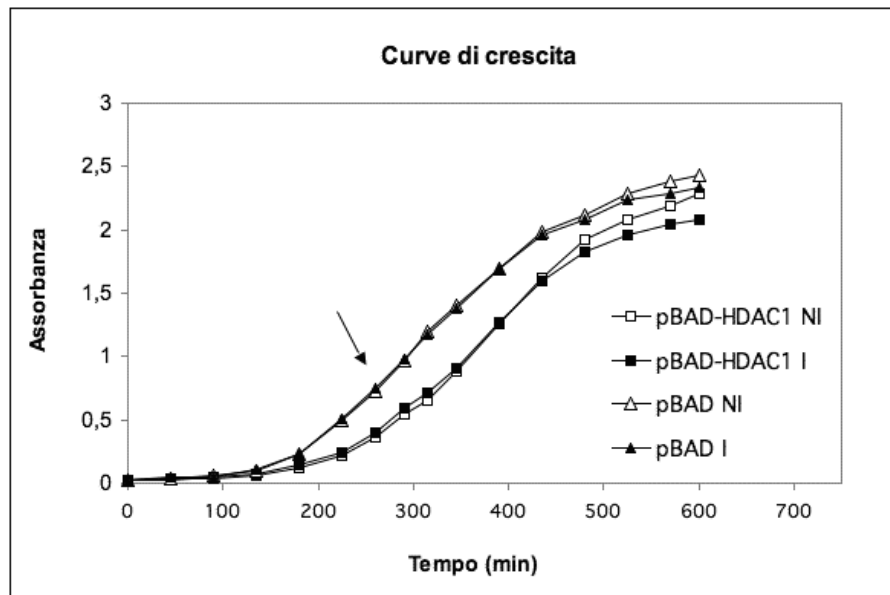
La proteina di nostro interesse ha una peso molecolare di 55 kDa; in gel, la banda corrispondente a HDAC1 (delimitata dal riquadro di colore rosso in figura 4.1) si posiziona tra le due bande presenti nella corsia del marker, caratterizzate da pesi

molecolari pari a 45 kDa e 65 kDa. La presenza della banda proteica è facilmente riscontrabile dal confronto con il campione non indotto (NI), dove non compare nessuna banda in corrispondenza del peso molecolare atteso. Come si può facilmente osservare, le bande più evidenti si trovano nei campioni dove l'induzione è avvenuta alla temperatura di 37 °C rispetto a quelle dove l'induzione è stata effettuata a 30 °C. Inoltre, si osserva una quantità maggiore di proteina con concentrazioni inferiori di induttore. In particolare, la banda più abbondante è visibile alla concentrazione di arabinosio pari a 0,13 mM, e la quantità di proteina decresce man mano che la concentrazione di arabinosio viene aumentata.

Da queste prove si può concludere che, per il ceppo TOP10, l'espressione eterologa di HDAC1 è massima in condizioni di temperatura elevata (37 °C) e con basse concentrazioni di induttore (0,13 mM). Questa combinazione di parametri probabilmente pone la cellula in circostanze di minimo stress fisiologico e favorisce l'espressione. Di conseguenza, per la produzione della proteina, sono stati utilizzati questi parametri, lavorando con quantità più elevate di coltura.

#### **4.1.2 Cinetiche di crescita**

Per valutare l'effetto dell'espressione di HDAC1 utilizzando i parametri prescelti in base all'esito delle prove di espressione, è stata misurata la cinetica di crescita del ceppo TOP10. In particolare, è stato eseguito un confronto tra il ceppo batterico contenente il vettore di espressione con il gene codificante per HDAC1 (TOP10/pBAD-HDAC1) ed il ceppo contenente il vettore privo del gene (TOP10/pBAD). La crescita è stata misurata in presenza/assenza di arabinosio. Questo tipo di esperimento consente di avere una visione completa dell'influenza delle condizioni colturali e del sistema di espressione sulla crescita batterica. Va ricordato, inoltre, che la crescita del ceppo TOP10/pBAD-HDAC1 in piastra era risultata lenta, evidenziando la formazione di piccole colonie solo dopo 24 h di incubazione a 37 °C. La valutazione delle cinetiche di crescita permette, quindi, di rilevare un eventuale effetto tossico o uno stress, causato dalla presenza del plasmide o dovuto alle condizioni colturali imposte. Il grafico in figura 4.2 riporta le curve di crescita relative alle quattro colture batteriche considerate.



**Figura 4.2.** I grafici indicano l'andamento dell'assorbanza, proporzionale alla torbidità della soluzione, in funzione del tempo. Curve di crescita di TOP10/pBAD-HDAC1 o TOP10/pBAD, entrambi in assenza (**NI**, non indotto) o presenza (**I**, indotto) di induzione. La crescita è avvenuta alla temperatura di 37 °C, la concentrazione di arabinosio aggiunto è pari 0,13 mM e l'induzione è stata eseguita alla densità ottica (OD) pari a 0,7-0,8 (indicata dalla freccia in grafico).

Per ciascun campione si possono distinguere le diverse fasi di crescita, tipiche per ogni microrganismo:

1. la fase di latenza (primi 100-120 minuti), fase in cui il microrganismo sta cercando di adattarsi all'ambiente e la crescita è minima;
2. la fase di crescita esponenziale durante la quale si ha la massima velocità di sviluppo (tra i 180-450 minuti);
3. La fase stazionaria (in figura si vede solamente l'inizio, dopo i 450 minuti) in cui la crescita rallenta ed il numero di organismi che si duplica è compensato da un pari numero di organismi che muoiono.

È evidente che i ceppi contenenti il plasmide pBAD-HDAC1 (quadrato pieno e vuoto) mostrano una crescita inferiore rispetto ai ceppi contenenti il plasmide vuoto (triangolo pieno e vuoto). Questo potrebbe essere dovuto ad un leggero effetto tossico della proteina ricombinante. Generalmente l'induzione dell'espressione genica genera stress all'organismo coinvolto, in quanto esso viene indotto a produrre in grandi quantità la proteina di interesse determinando un leggero rallentamento dello sviluppo. Per contenere tale effetto e favorire la crescita si è deciso di utilizzare una bassa

concentrazione di arabinosio e l'induzione è stata effettuata all'inizio della fase esponenziale di crescita (come indicato dalla freccia).

#### **4.1.3 Protocollo di produzione**

Una volta messe a punto le condizioni ottimali di crescita e di espressione, è stato definito il “protocollo di espressione” come descritto nei Materiali e Metodi (paragrafo 3.12). In particolare, sono stati preparati 3 L di coltura indotta *overnight* con arabinosio 0,13 mM a 37 °C. Poiché HDAC1 viene espressa nel citoplasma cellulare, le colture batteriche di TOP10/pBAD-HDAC1 sottoposte ad induzione sono state centrifugate per eliminare il surnatante e recuperare la biomassa. I pellet cellulari sono stati pesati e congelati in attesa dei successivi passaggi di purificazione: da 3 L di coltura sono stati raccolti circa 9 g di biomassa umida.

#### **4.1.4 Protocollo di purificazione**

Una volta effettuata l'estrazione delle proteine dai pellet cellulari (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.13), sono stati eseguiti quattro passaggi di purificazione mediante diverse tecniche cromatografiche. Ad ogni stadio le frazioni eluite sono state analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE, in modo tale da individuare quali contenevano HDAC1. Tali frazioni sono state unite, concentrate ed, eventualmente, desalate (Materiali e Metodi, paragrafo 3.15) prima del caricamento nella colonna successiva. Per ogni fase di purificazione è stata, inoltre, eseguita una quantificazione delle proteine totali.

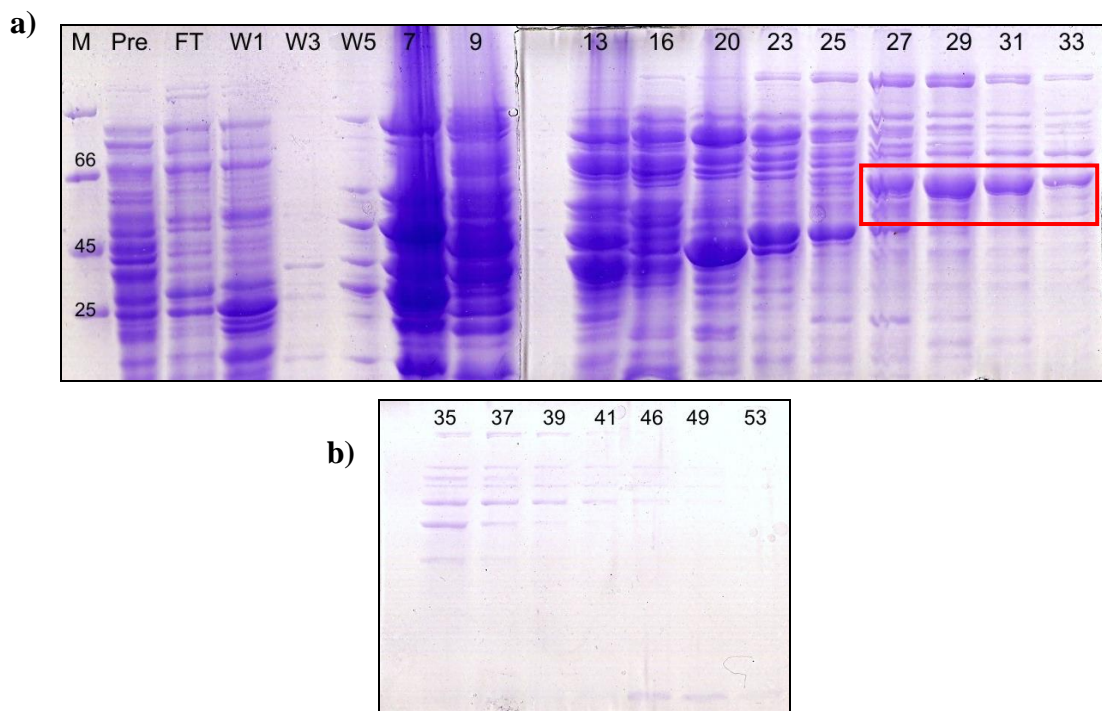
##### **4.1.4.1 Cromatografia a scambio anionico: Q-Sepharose Fast Flow**

Per la prima fase di purificazione è stata utilizzata una cromatografia a scambio anionico, in particolare una colonna impaccata con resina Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). L'estratto proteico totale (40 mL), ottenuto da 3 L di coltura, è stato caricato in colonna (condizionata come descritto nei Materiali e Metodi). Il cromatogramma ottenuto è mostrato in figura 4.4. È possibile individuare nel grafico le seguenti fasi della cromatografia:

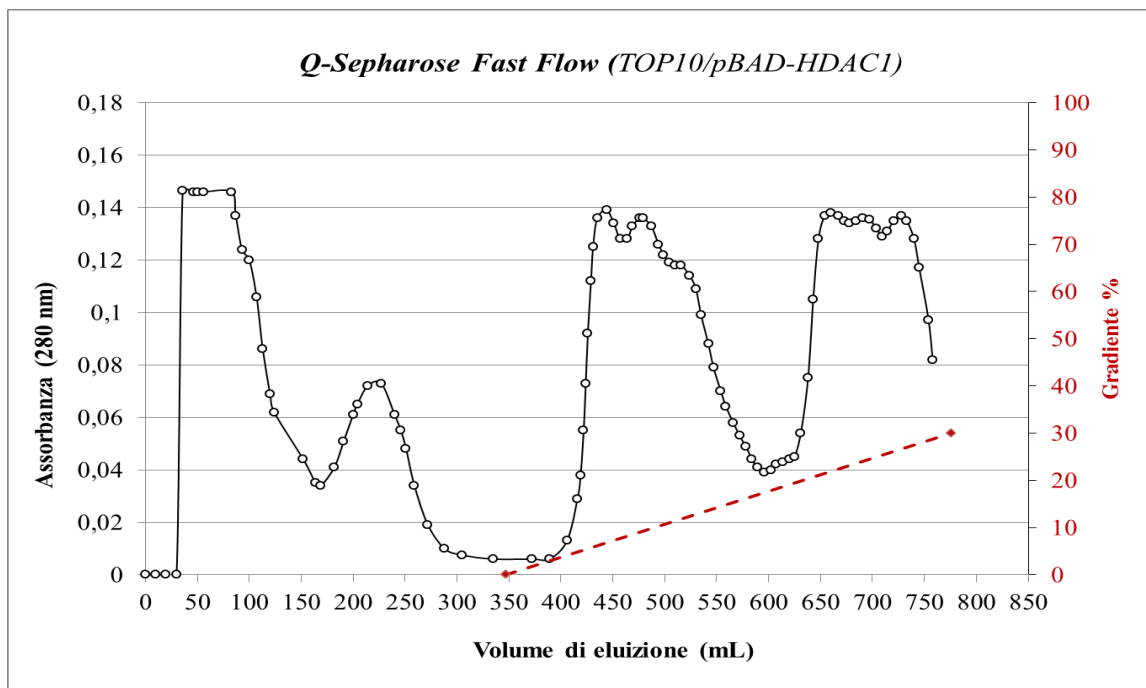
1. *Flow-through*: indica la fuoriuscita dalla colonna di tutte le proteine che non si sono legate alla resina e costituisce il primo picco (fino ad un volume pari a circa 70 ml).

2. *Wash*: fase di lavaggio successiva al caricamento del campione per eliminare le proteine debolmente legate alla resina. Questa fase termina a circa 350 ml di volume di eluizione.
3. Impostazione del gradiente lineare di eluizione (50-600 mM NaCl): in questa fase la concentrazione crescente di NaCl presente nel tampone favorisce il distacco delle proteine dalla colonna (tra queste anche HDAC1). Sono state raccolte frazioni da 6 ml ciascuna a cui è stato aggiunto il glicerolo per evitare aggregazione della proteina. L'eluizione è stata eseguita con 400 mL di tampone.

Al termine della cromatografia, aliquote (20  $\mu$ L) delle frazioni corrispondenti alle varie fasi del processo sono state controllate mediante elettroforesi per verificare la presenza di HDAC1. I gel ottenuti sono mostrati in figura 4.3.



**Figura 4.3.** SDS-PAGE delle frazioni ottenute dalla cromatografia a scambio anionico (gel **a** e **b**). HDAC1 è evidenziata dal riquadro rosso nel gel **a**. **Pre**: campione caricato; **FT**: Flow Through; **W1**, **W3**, **W5**: frazioni di lavaggio (*Wash*). La numerazione si riferisce alla successione di campioni raccolti durante il gradiente di eluizione.



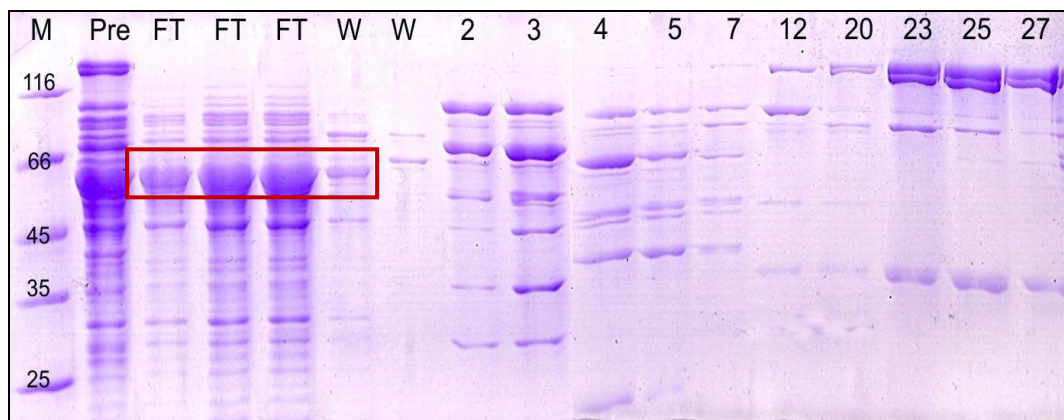
**Figura 4.4.** Q-Sepharose Fast Flow: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluizione. La retta indicata con il colore rosso rappresenta il gradiente lineare di eluizione (NaCl 50-600 mM).

Il riquadro rosso evidenzia le bande corrispondenti alla proteina di interesse (peso molecolare di 55 kDa). È stato, perciò, deciso di unire le frazioni di eluizione comprese dalla 26 alla 34. Tali frazioni corrispondono ad una percentuale di gradiente che va dal 15 al 19 %, di conseguenza HDAC1 è stata eluita con una concentrazione di NaCl compresa tra 350 a 450 mM. Data l'elevata concentrazione salina del campione (400 mM), è stato necessario ridurre tale concentrazione ad un valore pari a 50 mM, adatto per il passaggio cromatografico successivo. Questo procedimento è stato eseguito secondo la metodica descritta nel paragrafo 3.15 (Materiali e Metodi).

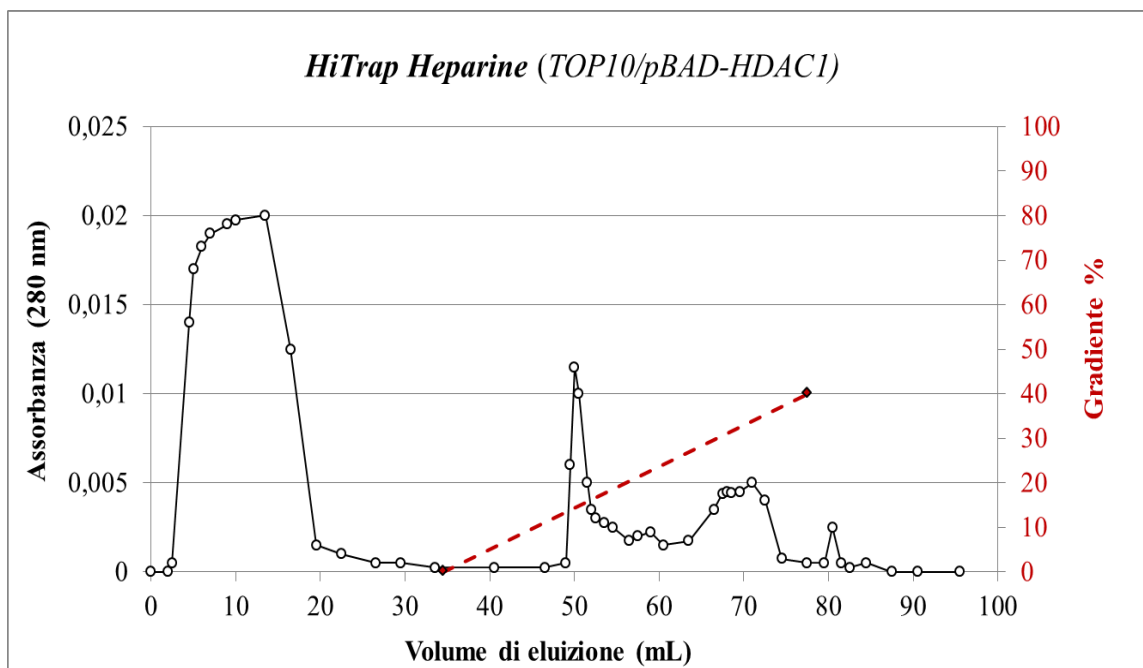
#### **4.1.4.2 Cromatografia di affinità: HiTrap-Heparine**

Il secondo passaggio di purificazione ha previsto una cromatografia di affinità con la resina HiTrap Heparine HP (GE). Il campione caricato in colonna (20 mL), era costituito dalle frazioni eluite dalla cromatografia a scambio anionico e, successivamente, desalate e concentrate. Nel cromatogramma (figura 4.6) è possibile osservare la fase di *flow-through* seguita dal lavaggio (*wash*). È stato, quindi, impostato il gradiente lineare di NaCl 50-800 mM; i numerosi picchi visibili durante questa fase sono dovuti al distacco di proteine dalla colonna. Le frazioni raccolte, da 1 ml, sono state controllate mediante SDS-PAGE per verificare in quali fosse presente HDAC1 (figura 4.5).

Come si può osservare dal profilo proteico presente in gel, HDAC1 è presente nelle frazioni del *flow through* e nella prima frazione di lavaggio. Questo indica che la proteina di interesse non si lega alla matrice ma esce dalla colonna durante il caricamento, mentre proteine contaminanti sono state trattenute dalla resina ed eluite dopo in presenza di una elevata concentrazione di sale. Di conseguenza, nonostante il mancato legame di HDAC1 alla colonna, tale passaggio cromatografico consente di ottenere un pool di frazioni ripulite da numerosi contaminanti. Tutte le frazioni corrispondenti al *flow through* ed alla prima fase di lavaggio concluso il caricamento sono state recuperate ed unite (30 mL). Non è stato necessario, in questo caso, desalare il campione poiché la concentrazione di sale era rimasta invariata (50 mM). Tuttavia il campione è stato concentrato per avere un volume pari a circa 10 ml adatto per la successiva cromatografia.



**Figura 4.5.** SDS-PAGE delle frazioni relative alla cromatografia di affinità (HiTrap-Heparine HP). **Pre:** campione caricato concentrato; **FT:** Flow Through; **W:** Wash. La numerazione si riferisce alla successione di campioni raccolti durante il gradiente. HDAC1 è evidenziata dal riquadro rosso (55 kDa).

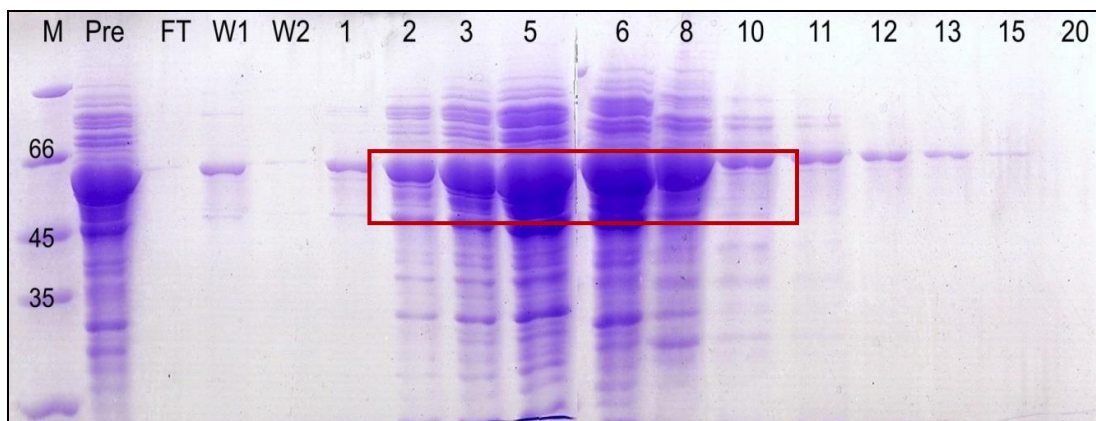


**Figura 4.6.** HiTrap-Heparine HP: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluizione. La retta in colore rosso rappresenta il gradiente lineare di eluizione.

#### **4.1.4.3 Cromatografia di affinità: Poly-L-lysine**

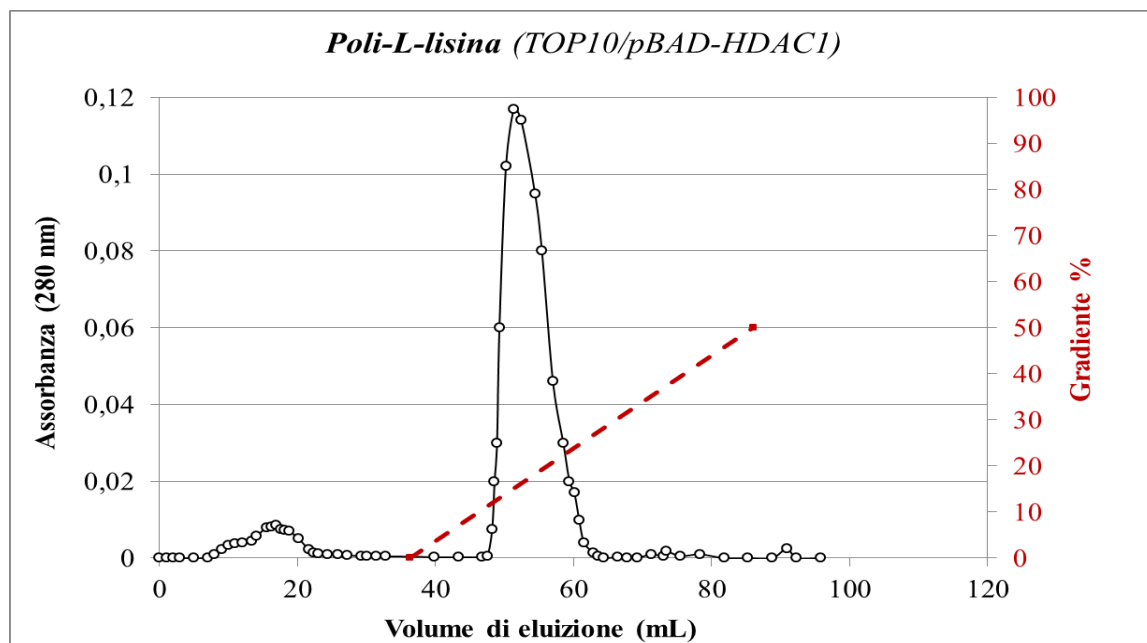
Il terzo passaggio cromatografico è stato eseguito mediante l'utilizzo di una colonna impaccata con resina Poly-L-Lysine-Agarose (Sigma-Aldrich). Il campione caricato in colonna (10 mL) era ricavato dalle frazioni provenienti dalla cromatografia precedente, HiTrap Heparine, e presentava la giusta concentrazione di sale (50 mM). In figura 4.8 è riportato il cromatogramma corrispondente. È facilmente visibile un primo picco in corrispondenza di un volume di eluizione pari a 10-20 mL identificabile con il *flow through* e la fase di lavaggio. Segue un picco molto elevato generato dal distacco di proteine dalla resina per effetto del gradiente lineare di NaCl 50 mM-1 M. Le frazioni eluite, da 1 mL ciascuna, sono state caricate in gel e controllate con elettroforesi SDS-PAGE per individuare la presenza della proteina HDAC1 (figura 4.7).





**Figura 4.7.** SDS-PAGE delle frazioni relative alla cromatografia di affinità (Poli-L-lisina). **Pre:** campione caricato; **FT:** Flow Through; **W:** Wash. La numerazione si riferisce alla successione di campioni raccolti durante il gradiente. HDAC1 è evidenziata dal riquadro rosso (55 kDa).

Osservando il profilo proteico ottenuto in gel, HDAC1 è visibile nelle prime frazioni eluite per effetto del gradiente di concentrazione. È stato, quindi, deciso di unire le frazioni di eluizione comprese dalla 2 alla 10. Tali frazioni, a livello del cromatogramma, corrispondono alla percentuale di gradiente tra il 18 e il 25 %, di conseguenza la proteina è stata eluita con una concentrazione di NaCl compresa tra 400 e 440 mM. Anche in questo caso, è stato necessario ridurre la concentrazione di sale, fino a 150 mM, per potere procedere con l'ultimo passaggio di purificazione.

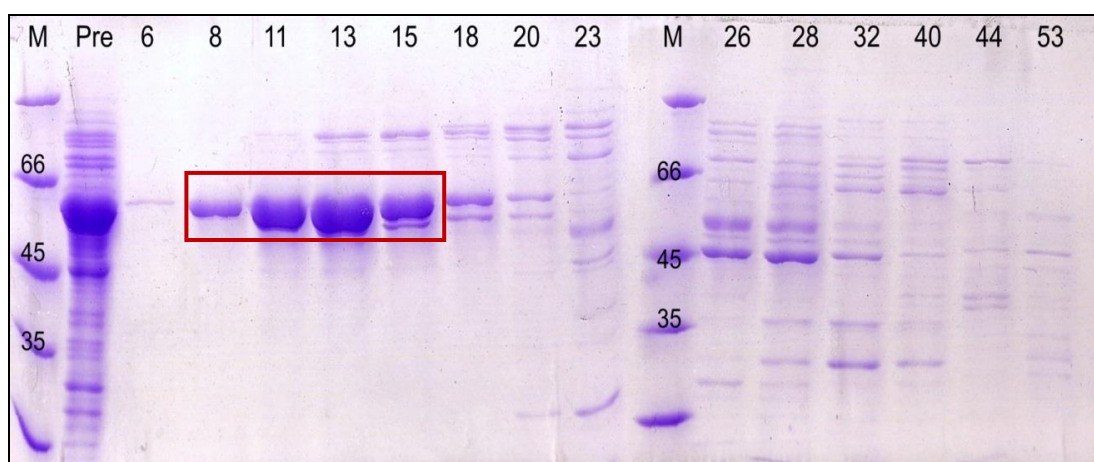


**Figura 4.8.** Poli-L-lisina: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (misurata a lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluizione. La retta indicata in colore rosso rappresenta il gradiente lineare di eluizione.

#### 4.1.4.4 Cromatografia ad esclusione molecolare: Superdex 200

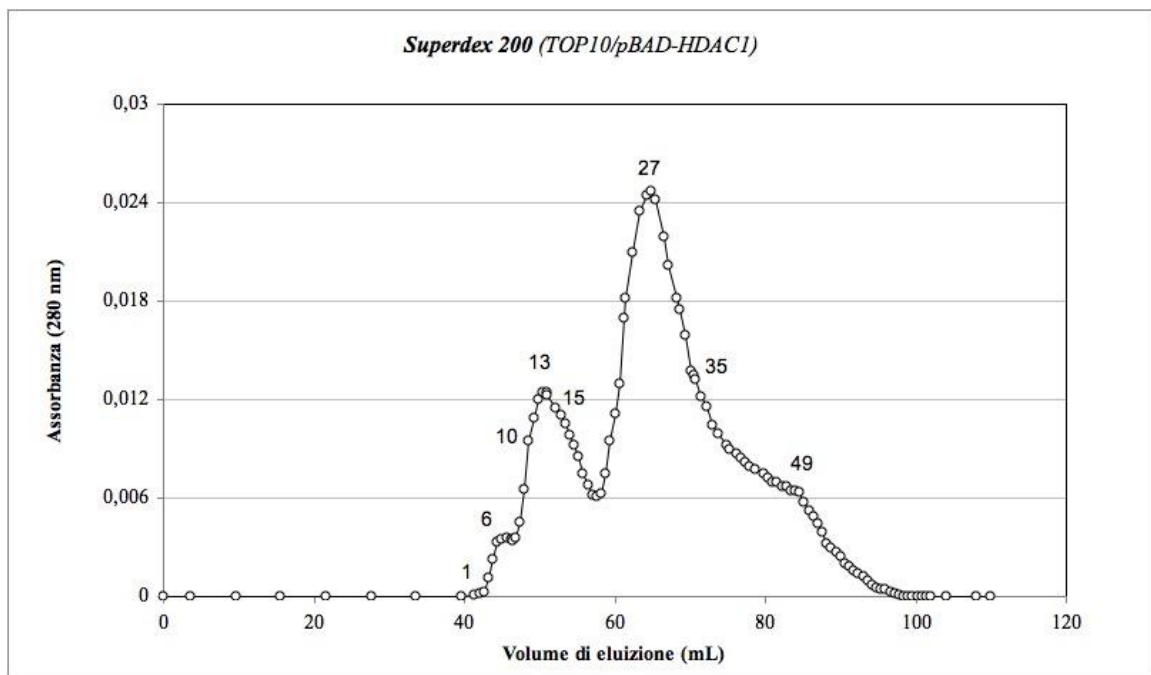
Come fase conclusiva del processo di purificazione è stata eseguita una cromatografia ad esclusione molecolare (gel filtrazione) utilizzando una colonna impaccata con resina Superdex 200. Questo tipo di processo si basa su un principio semplice di separazione che non utilizza un gradiente di concentrazione ma semplicemente sfrutta la dimensione delle proteine in soluzione. Infatti, all'interno del setaccio molecolare le molecole più grandi, completamente escluse dai pori, passano attraverso gli spazi interstiziali e si muovono più velocemente, fuoriuscendo per prime (volume  $V_0$ ); le molecole più piccole, al contrario, si distribuiscono nel tampone presente sia all'interno sia all'esterno del setaccio e attraversano la colonna a diversa velocità (volume di eluizione  $V_i$ ). La colonna cromatografica viene sottoposta preventivamente a calibrazione, facendo eluire una miscela di proteine standard, aventi pesi molecolari noti, e misurando per ciascuna l'esatto volume di eluizione. In questo modo è possibile risalire al peso molecolare del campione caricato in colonna in base al suo volume di eluizione.

Il pool delle frazioni 2-10 contenenti HDAC1, ottenuto mediante cromatografia di affinità, è stato concentrato per ottenere un volume di caricamento pari a 2 mL, adatto al *loop* utilizzato per l'iniezione (paragrafo 3.15 dei Materiali e Metodi). Le frazioni eluite, da 0,9 mL, sono state caricate in gel e controllate mediante elettroforesi SDS-PAGE per individuare la presenza della proteina HDAC1 (figura 4.9).



**Figura 4.9.** SDS-PAGE delle frazioni relative alla cromatografia ad esclusione molecolare (Superdex 200). **Pre:** campione caricato concentrato. HDAC1 è evidenziata dal riquadro rosso (55 kDa). Nei gel sono riportate, in successione, le frazioni raccolte.

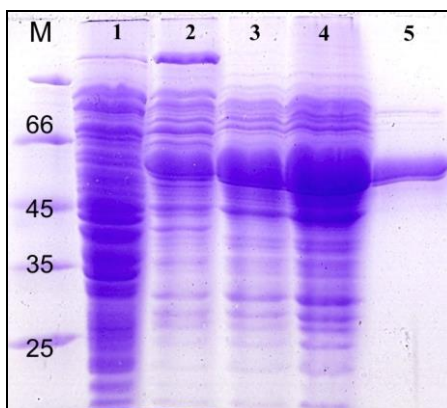
Come si osserva dal gel, nelle frazioni 8-16 (volume totale pari a 9,3 mL) è presente una banda proteica corrispondente a HDAC1, compresa tra i marcatori con peso molecolare di 66 e 45 kDa. Tali frazioni si localizzano nel primo picco osservabile nel cromatogramma (figura 4.10). L'eluizione della proteina di interesse è, quindi, avvenuta subito dopo il fronte (blu destrano) con un volume di eluizione che corrisponde al marcatore ferritina, caratterizzato da peso molecolare pari a 440 kDa. Tale risultato indica un possibile stato di aggregazione della proteina, la quale assume presumibilmente forma ottamerica. Questo fenomeno potrebbe rappresentare un ostacolo significativo nello studio e nell'eventuale utilizzo della proteina ricombinante; si può ipotizzare che condizioni non ottimali durante l'espressione o la purificazione abbiano favorito l'aggregazione della proteina alterandone la struttura e, probabilmente, influenzandone l'attività. È quindi stato necessario eseguire prove di dissociazione per cercare di ottenere la proteina in forma monomerica.



**Figura 4.10.** Superdex 200: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (misurata a lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluizione. Nel grafico sono riportati i numeri delle frazioni raccolte.

#### **4.1.4.5 Purificazione e quantificazione proteica**

Per valutare l'efficacia dei passaggi di purificazione e la resa finale, è stata eseguita un'analisi SDS-PAGE confrontando aliquote dei campioni provenienti da ciascuna cromatografia insieme al campione finale ottenuto dalla cromatografia per gel filtrazione. L'esito è mostrato in figura 4.11:



**Figura 4.11.** SDS-PAGE delle varie fasi di purificazione. **M:** marker; **1:** Pre Q-Sepharose; **2:** Pre-HiTrap Heparine; **3:** Pre-Poli-L-lisina; **4:** Pre-Gel Filtrazione; **5:** Post-Gel Filtrazione.

Dall'osservazione del profilo elettroforetico è possibile notare un progressivo aumento della concentrazione di HDAC1 da un passaggio all'altro, parallelamente ad una simultanea diminuzione di proteine contaminanti. Il protocollo di purificazione messo a punto, di conseguenza, è risultato efficace e consente di ottenere un campione finale con un elevato grado di purezza.

Oltre all'analisi qualitativa, mediante elettroforesi, è stata anche determinata la concentrazione proteica di ciascun campione attraverso il Saggio di Bradford, la cui metodica è descritta nel paragrafo 3.20 (Materiali e Metodi). I valori ottenuti sono riassunti nella tabella 4.1.

<b>Tabella 4.1. Purificazione dal ceppo TOP10/pBAD-HDAC1</b>			
<b>Tipo di colonna cromatografica</b>	<b>Volume di campione</b>	<b>Concentrazione proteica</b>	<b>Quantità di proteina totale</b>
<i>Q-sepharose</i>	40 mL	[16,3 mg/mL]	652 mg
<i>HiTrap Heparine</i>	20 mL	[1,78 mg/mL]	35,6 mg
<i>Poli-L-lisina</i>	10 mL	[1,73 mg/mL]	17,3 mg
<i>Gel Filtration</i>	2 mL	[4,77 mg/mL]	9,54 mg

La quantità di proteina totale cala durante le fasi di purificazione, a conferma dell'avvenuta separazione di proteine contaminanti. La soluzione proteica finale, ottenuta dopo gel filtrazione e contenente HDAC1 pura, risulta avere questi valori:

<b>Volume</b>	<b>Concentrazione proteica</b>	<b>Quantità di proteina totale</b>	<b>Molarità</b>
9,3 mL	[0,27 mg/ mL]	2,5 mg	4,9 $\mu$ M

Di conseguenza, a partire da 3 L di coltura (biomassa pari a circa 3-3,3 g/L) sono stati ottenuti 2,5 mg di proteina. La resa del processo non è elevata e la principale causa può essere dovuta al basso livello di espressione in *Escherichia coli* TOP10.

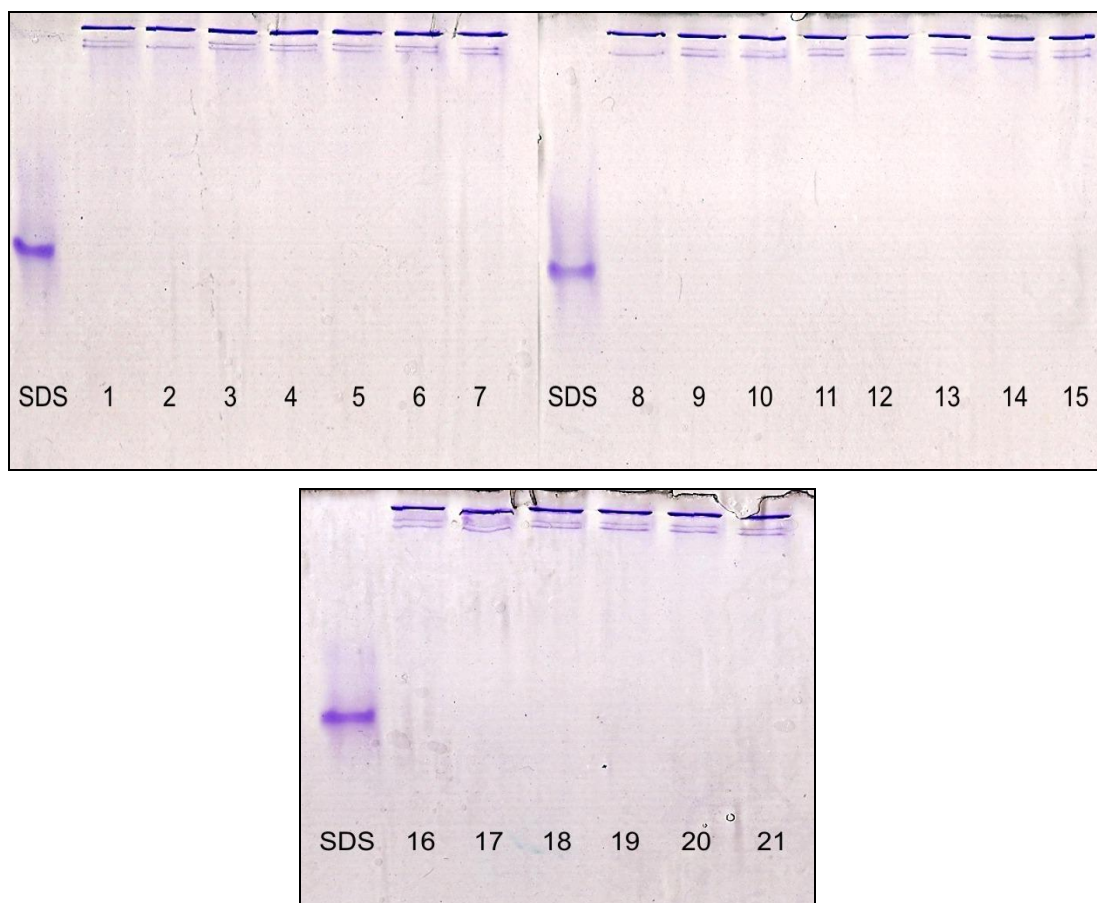
#### **4.1.5 Prove di dissociazione**

L'aggregazione è la maggiore manifestazione di instabilità che può influenzare in modo importante la funzionalità delle proteine *in vivo* e *in vitro*. Tale fenomeno avviene a causa di vari fattori che possono essere classificati come intrinseci (struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria) ed estrinseci (ambiente in cui la proteina è presente o condizioni di processo)<sup>[15]</sup>. Per evitare tale problema si può tentare di favorire la dissociazione mediante l'uso di additivi, i quali destabilizzano gli aggregati (le interazioni intermolecolari) e aumentano la stabilità della proteina nella sua forma "nativa" (interazioni intramolecolari)<sup>[16]</sup>. Per questo motivo si è tentato un approccio finalizzato a favorire la dissociazione della proteina HDAC1, ottenuta dalla purificazione, attraverso l'aggiunta di diversi additivi, sia in condizioni native che con prove di ultrafiltrazione (vedi Materiali e Metodi, paragrafi 3.21.1 e 3.21.2).

##### **4.1.5.1 Prove in condizioni native**

Le prove di dissociazione in condizioni native sono state condotte incubando aliquote di HDAC1 purificata con diversi additivi; le miscele sono state, quindi, analizzate in elettroforesi nativa in assenza di detergente SDS ed agenti riducenti per valutare la migrazione nel gel. I risultati sono riportati in figura 4.12. Come controllo positivo, è stato preparato un campione in presenza di SDS 0,5 % che, in un lavoro di Tesi precedente (Schipani F, aa 2012-2013), era risultato efficace nel dissociare l'aggregato proteico. L'SDS si lega alla proteina mascherandone la carica e, quindi, probabilmente ne favorisce la dissociazione.

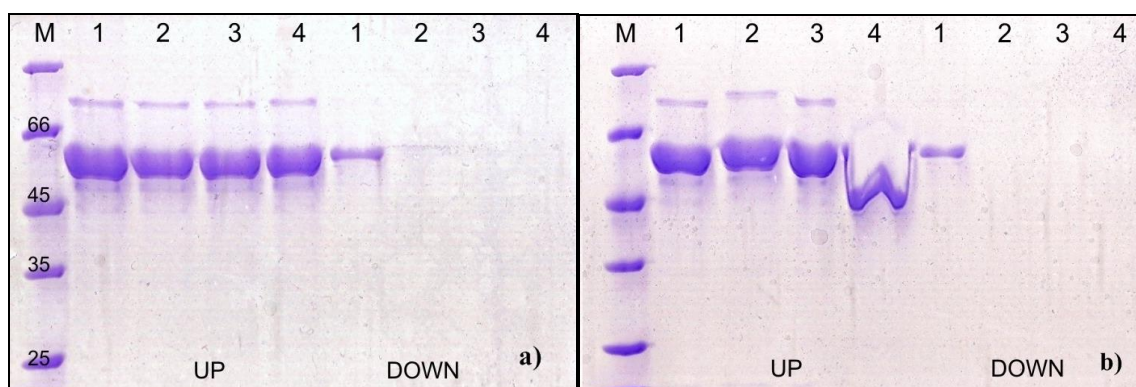
Tutti i co-solventi aggiunti, scelti tra una vasta gamma di categorie, non hanno mostrato alcuna azione dissociante, come è possibile notare dai gel. La banda proteica rimane immobile e non riesce a migrare nel gel, a differenza del controllo (con SDS). Tale risultato induce a pensare che sia necessario utilizzare reagenti differenti oppure che il processo di aggregazione debba essere controllato durante la fase di purificazione. L'aggiunta di glicerolo, effettuata da noi durante la purificazione, sembra non essere da sola sufficiente a favorire la dissociazione e, probabilmente, altri additivi andrebbero aggiunti. L'unico composto che mostra evidente efficacia rimane l'SDS che, malgrado la spiccata azione esercitata, possiede allo stesso tempo alcuni svantaggi tra cui la tendenza a formare micelle e ad inattivare l'enzima.



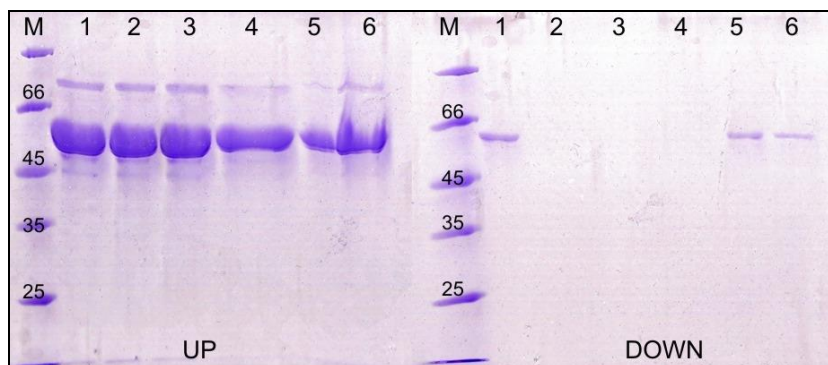
**Figura 4.12.** Prove di dissociazione in condizioni native. SDS: controllo positivo; 1) LiCl; 2) KCl; 3) CaCl<sub>2</sub>; 4) MgCl<sub>2</sub>; 5) StCl<sub>2</sub>; 6) CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>; 7) CH<sub>3</sub>COOLi; 8) Arginina; 9) Betaina; 10) Putrescina; 11) Ac. Laurico; 12) Ac. Miristico; 13) Ac. Stearico; 14) Urea; 15) β-mercaptoetanol; 16) Tween 20; 17) Triton X-100; 18) Etanolo; 19) Propanolo; 20) 1-butanolo; 21) 1-pentanol.

#### 4.1.5.2 Prove di ultrafiltrazione

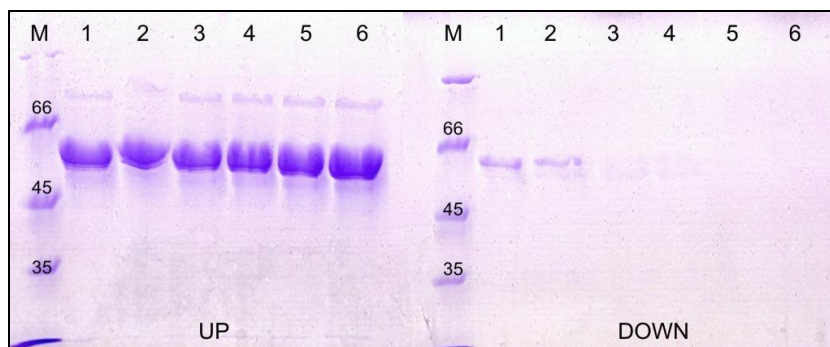
Per verificare ulteriormente la capacità di dissociazione di diversi additivi, alcuni già utilizzati nelle prove in condizioni native, sono stati utilizzati dei filtri da centrifuga con una membrana da 100 kDa in grado di separare HDAC1 monomerica (55 kDa) da forme aggregate con peso molecolare superiore (paragrafo 3.21.2). I campioni, dopo incubazione, sono stati sottoposti ad ultrafiltrazione ed aliquote del ritentato (up) e del permeato (down) sono state analizzate in SDS-PAGE. I risultati sono illustrati nelle figure 4.13, 4.14 e 4.15.



**Figura 4.13.** Prove di dissociazione ed analisi SDS-PAGE. Up: retentato. Down: permeato. **Gel a)** SDS 0,5 % (1); Arginina (2); Glicina (3); Betaina (4). **Gel b)** SDS 0,5 % (1); Putrescina (2); Ac. Stearico (3); PEG (4).



**Figura 4.14.** Prove di dissociazione ed analisi SDS-PAGE. Up: retentato. Down: permeato. 1) SDS 0,5 %, controllo positivo; 2) HDAC1, controllo negativo; 3)  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0,1 M; 4)  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1 M; 5) CTAB 0,5 %; 6) CTAB 1 %.



**Figura 4.15.** Prove di dissociazione ed analisi SDS-PAGE. Up: retentato. Down: permeato 1) SDS 0,5 %, controllo positivo; 2) CTAB 1 %; 3) Etanolo; 4) Isopropanolo; 5) 1-Butanolo; 6) 1-Pentanolo.

Le aliquote denominate *down* contengono la proteina nella sua forma dissociata, in quanto la dimensione del filtro consente il passaggio della forma monomerica di 55 kDa. Come è evidente dai gel, la dissociazione avviene solo in presenza di SDS, la cui azione era già stata verificata nelle prove precedenti. Un debole effetto si osserva solo con il tensioattivo CTAB (Bromuro di cetil-trimetilammonio) nelle due diverse concentrazioni utilizzate (0,5 e 1%). È possibile, infatti, notare una leggera azione disgregante, poiché appare visibile, anche se debolmente, una banda proteica con una massa di 55 kDa nel campione permeato (figura 4.14 campioni 5 e 6). Questo incoraggiante risultato potrebbe essere ulteriormente indagato provando, ad esempio, concentrazioni diverse o tensioattivi di tipo cationico simili al CTAB. È probabile che questo tipo di composto, similmente al detergente anionico SDS, svolga una funzione di schermo delle cariche che favoriscono i legami inter-molecolari, sfavorendo l'aggregazione proteica.



## ***4.2 Produzione di HDAC1 nel ceppo di Escherichia coli BW25993***

I risultati ottenuti con il ceppo TOP10/pBAD-HDAC1 hanno indicato una limitata espressione della proteina ricombinante mentre il protocollo di purificazione è risultato essere efficace. Come descritto in precedenza, inoltre, la proteina purificata presentava un notevole stato di aggregazione. Per cercare di migliorare entrambe le fasi del processo ed influenzare lo stato finale della proteina, si è deciso di cambiare il ceppo di *E. coli* usato come ospite per la sovraespressione; variando, infatti, la combinazione ceppo-vettore è possibile modificare la produzione della proteina ricombinante. Il ceppo prescelto, BW25993, si differenzia dal precedente TOP10 per caratteristiche genetiche e metaboliche. Tale ceppo, presente nel laboratorio ospitante, non conteneva però il plasmide pBAD-HDAC1. È stato, quindi, necessario trasformare il ceppo con il vettore idoneo, prima di procedere con le fasi di espressione e di purificazione.

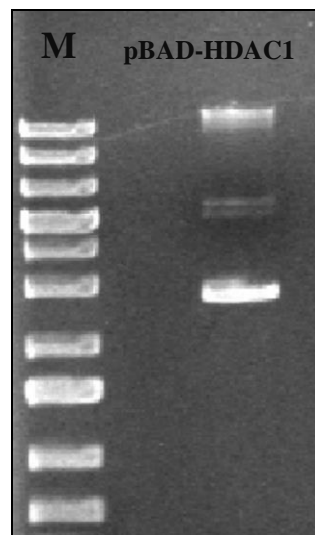
### **4.2.1 Trasformazione del ceppo BW25993 con il vettore pBAD-HDAC1**

Per dare inizio alla produzione della proteina è stato necessario costruire, *ex novo*, il ceppo BW25993/pBAD-HDAC1. La metodica di preparazione prevede una successione di passaggi:

1. Per prima cosa è stato estratto il DNA plasmidico (pBAD-HDAC1) dal ceppo TOP10/pBAD-HDAC1 usato in precedenza.
2. Il DNA ottenuto è stato sottoposto a quantificazione mediante misura allo spettrofotometro. Le letture hanno fornito come risultato una concentrazione pari a 760 ng/  $\mu$ L.
3. Per valutare qualitativamente l'esito dell'estrazione del DNA, il plasmide (5,5 kbp) è stato visualizzato in gel di agarosio. Dalla corsa elettroforetica è stato possibile osservare le diverse configurazioni del DNA plasmidico estratto; la forma superavvolta, che migra più velocemente poiché compatta, la forma circolare, che migra più lentamente ed infine la forma lineare, la quale possiede una velocità intermedia. In parallelo è stato corso in gel anche un marcatore di DNA a peso molecolare noto (1 kbp Ladder DNA, Fermentas). È stata, infine, esclusa la presenza di bande situate agli estremi del gel, le quali indicherebbero la presenza di genoma o di RNA. Il gel ottenuto è mostrato in figura 4.16.
4. Sono state preparate le cellule BW25993 elettrocompetenti, nelle quali inserire il vettore pBAD-HDAC1. La metodica prevede successivi lavaggi di un pellet

cellulare con una soluzione di glicerolo sterile per eliminare i sali contenuti nel terreno. Al termine sono state preparate aliquote di cellule competenti pronte per il processo di trasformazione.

5. Le cellule elettrocompetenti BW25993, a cui sono state aggiunte diverse quantità di DNA plasmidico (3-5 ng), sono state sottoposte ad elettroporazione: tale metodica permette al plasmide di penetrare la membrana cellulare attraverso pori temporanei creati da un campo elettrico. Diverse diluizioni della miscela sottoposta ad elettroporazione sono state cresciute in piastre selettive contenenti gli antibiotici necessari alla selezione dei trasformanti BW25993/pBAD-HDAC1. Alcune colonie cresciute a 37 °C *overnight*, sono state prelevate e cresciute in terreno liquido per preparare gli stock in glicerolo 30 % da conservare a -20 °C ed utilizzare per le prove di espressione.

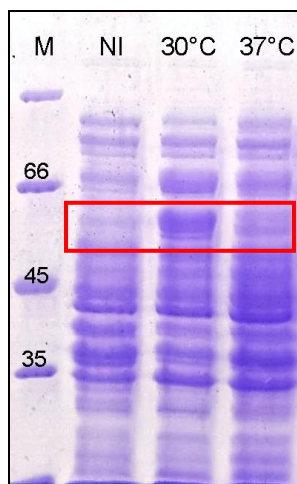


**Fig. 4.16.** Gel di agarosio (1 %) per controllare il plasmide purificato. M: marcatore molecolare (1 kbp). Nella corsia pBAD-HDAC1 sono visibili le tre forme del plasmide: rilassata (in alto), lineare (centro) e superavvolta (in basso).

#### **4.2.2 Prove di espressione**

Come nel caso del precedente (ceppo TOP10), sono state inizialmente eseguite delle prove per valutare la capacità di espressione di HDAC1 da parte del ceppo BW25993. Sono state analizzate due diverse condizioni di temperatura (30 e 37 °C) e di concentrazione di induttore (arabinosio), in modo da determinare la più idonee (vedi paragrafo 3.10, capitolo 3 Materiali e Metodi). La quantità di HDAC1 espressa nelle varie condizioni è stata controllata mediante elettroforesi SDS-PAGE, caricando gli

estratti proteici totali ottenuti per semplice bollitura di aliquote di ciascun campione. Nel gel riportato in figura 4.17 sono visibili i *pattern* proteici relativi ai vari campioni. La proteina di interesse (55 kDa) appare visibile in entrambi i campioni in cui è stato aggiunto l'induttore mentre è assente totalmente nel campione non indotto (riquadro rosso). Si osserva, inoltre, una quantità nettamente superiore nel campione trattato a 30 °C con una concentrazione di arabinosio pari a 1,3 mM.



**Fig. 4.17.** Gel elettroforetico dei campioni cresciuti in diverse condizioni. La crescita è avvenuta a 37 °C mentre l'induzione è stata eseguita a 30 °C o 37 °C con due diverse concentrazioni di arabinosio. **M:** marker; **NI:** controllo negativo senza induttore; **30 °C:** 1,3 mM di arabinosio; **37 °C:** 0,13 mM di arabinosio.

Le condizioni che massimizzano l'espressione in BW25993, sono differenti da quelle determinate per il ceppo TOP10; inoltre, la quantità di HDAC1 espressa, e visibile nell'estratto proteico separato in gel, è più elevata rispetto al ceppo utilizzato in precedenza. Infine, anche la crescita delle colonie in piastra risultava più veloce rispetto al ceppo TOP10, a conferma di una migliore capacità di resistenza del ceppo allo stress indotto dalla sovraespressione. Non è stato ritenuto necessario, di conseguenza, analizzare la cinetica di crescita del ceppo BW25993/pBAD-HDAC1.

#### **4.2.3 Protocollo di produzione**

Una volta determinate le condizioni ottimali di crescita e di espressione, è stato definito il "protocollo di espressione" come descritto nei Materiali e Metodi (paragrafo 3.12). Sono stati, perciò, preparati 3 L di coltura di BW25993/pBAD-HDAC1 indotta *overnight* a 30 °C con arabinosio 1,3 mM. La biomassa è stata recuperata per centrifugazione (HDAC1 viene espressa nel citoplasma cellulare) ed i pellet cellulari sono stati pesati: da

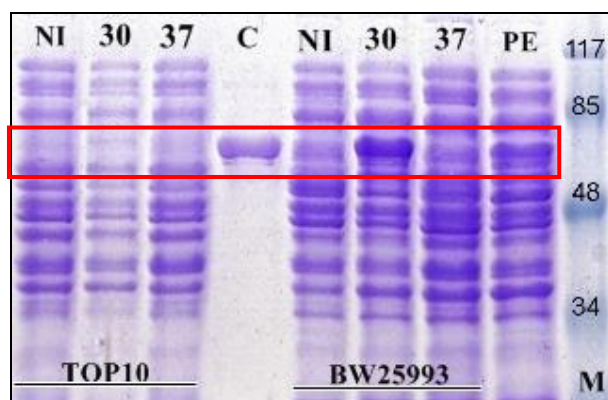
3 L di coltura sono stati raccolti circa 15 g di biomassa umida. La quantità di biomassa è nettamente aumentata rispetto alla quantità prodotta con TOP10 (10 g) indicando che il cambiamento di ceppo ha favorito la produzione di biomassa. I pellet sono stati, quindi, congelati in attesa dei successivi passaggi di purificazione.

#### **4.2.4 Confronto dell'espressione: SDS-PAGE e Western Blotting**

L'espressione di HDAC1 nei due ceppi batterici, TOP10 e BW25993, è stata confrontata mediante analisi SDS-PAGE. Per ciascun ceppo sono state confrontate aliquote dei campioni non indotti e indotti nelle rispettive condizioni ottimali:

- Induzione a 37 °C e concentrazione di induttore pari a 0,13 mM (TOP10)
- Induzione a 30 °C e concentrazione di induttore pari a 1,3 mM (BW25993)

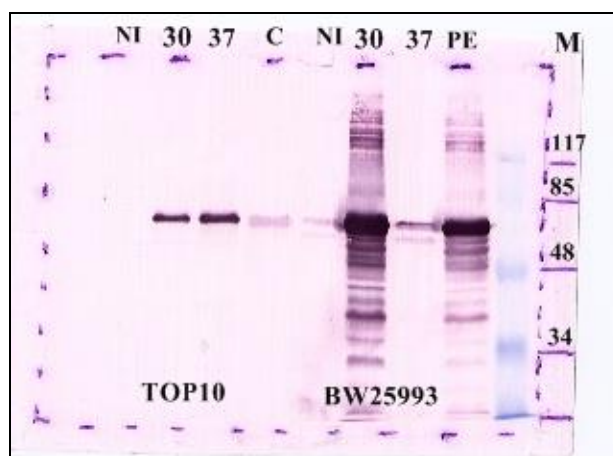
È stata inoltre controllata un'aliquota dei 3 L di coltura preparati durante il protocollo di produzione. La successione di campioni controllati mediante elettroforesi SDS-PAGE è riportata in figura 4.18.



**Fig. 4.18.** Gel elettroforetico delle prove di espressione nei due ceppi TOP10 e BW25993. Per entrambi la crescita è avvenuta a 37 °C mentre l'induzione è stata eseguita a 30 °C o 37 °C con due diverse concentrazioni di arabinosio. **M:** marker; **C:** HDAC1 purificata; **NI:** controllo negativo senza induttore; **30:** 30 °C con 1,3 mM di arabinosio; **37:** 37 °C con 0,13 mM di arabinosio; **PE:** prova di espressione relativa al controllo delle beute indotte durante la produzione.

La banda corrispondente ad HDAC1 (55 kDa), localizzata tra i marcatori con peso molecolare pari a 48 e 85 kDa, è evidenziata dal riquadro rosso. La massima quantità di proteina espressa si ottiene con il ceppo BW25993/pBAD-HDAC1 alla temperatura di 30 °C e con la concentrazione di induttore pari a 1,3 mM. Questo conferma il miglioramento, nel livello di espressione, dovuto al cambiamento del ceppo ospite.

Come ulteriore analisi, per verificare con assoluta certezza che la banda osservata a 55 kDa nelle miscele proteiche corrispondesse alla proteina di interesse, HDAC1, è stato effettuato un esperimento di *Western Blot*. La procedura, descritta nel paragrafo 3.19 (Materiali e Metodi), prevede il trasferimento delle proteine separate in elettroforesi SDS-PAGE su una membrana di PVDF. L'identificazione della proteina di interesse viene eseguita mediante incubazione della membrana con un anticorpo specifico. In figura 4.19 è riportato il risultato utilizzando gli stessi campioni descritti in figura 4.18:



**Fig. 4.19.** Western blotting delle proteine estratte dai ceppi TOP10/pBAD-HDAC1 e BW25993/pBAD-HDAC1. **M:** marker; **C:** controllo positivo HDAC1 pura; **NI:** controllo negativo senza induttore; **30:** 30 °C con 1,3 mM di arabinosio; **37:** 37 °C con 0,13 mM di arabinosio; **PE:** prova di espressione relativa al controllo delle beute indotte durante la produzione.

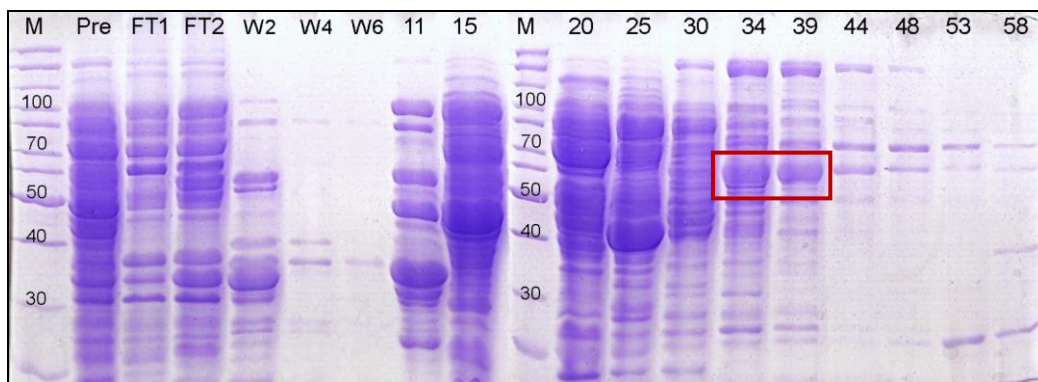
La rivelazione colorimetrica, che si utilizza per individuare l'anticorpo legato alla proteina bersaglio, permette di evidenziare le bande corrispondenti ad HDAC1. Si osserva, invece, l'assenza di bande nei campioni non indotti, dove la proteina non è presente. Questa analisi permette di confermare l'identità di HDAC1 ed indica, inoltre, l'elevata espressione ottenuta nel ceppo BW25993 dove compaiono anche delle bande aspecifiche dovute al caricamento in gel di un'elevata quantità di proteine totali.

#### **4.2.5 Protocollo di purificazione**

Una volta eseguita l'estrazione delle proteine dai pellet di BW25993/pBAD-HDAC1 (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.13), sono stati ripetuti gli stessi quattro passaggi di purificazione, mediante diverse tecniche cromatografiche, effettuati per la purificazione di HDAC1 dal ceppo TOP10/pBAD-HDAC1. Le condizioni operative sono rimaste invariate.

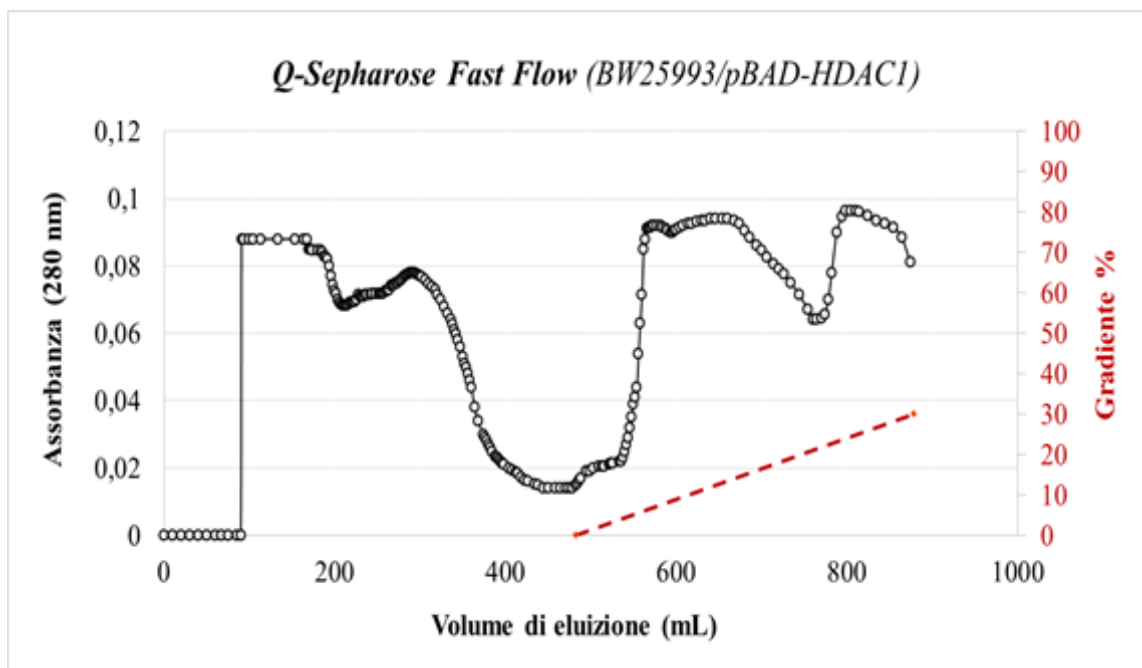
#### 4.2.5.1 Cromatografia a scambio anionico: Q-Sepharose Fast Flow

La prima fase prevedeva una cromatografia a scambio anionico. L'estratto proteico totale (50 mL), ottenuto da 3 L di coltura, è stato caricato in una colonna impaccata con la resina Q-Sepharose Fast Flow. Il cromatogramma, analogo a quello ottenuto precedentemente, è mostrato in figura 4.21. Il primo picco (tra 100 e 200 mL di eluizione), corrispondente al *flow-through*, è seguito da un picco leggermente più basso che rappresenta la fase di *wash* (termina a un volume pari a 400 mL). Una volta impostato il gradiente lineare di eluizione (50-600 mM di NaCl), sono state raccolte frazioni da 6 mL ciascuna. Aliquote delle diverse fasi del processo sono state analizzate in elettroforesi per verificare la presenza di HDAC1; i gel sono mostrati in figura 4.20.



**Figura 4.20.** SDS-PAGE delle frazioni relative alla cromatografia a scambio anionico (Q-Sepharose Fast Flow). **Pre:** campione caricato concentrato; **FT<sub>1</sub>, FT<sub>2</sub>:** Flow Through; **W<sub>2</sub>, W<sub>4</sub>, W<sub>6</sub>:** Wash. La numerazione si riferisce alla successione di campioni raccolti durante il gradiente.

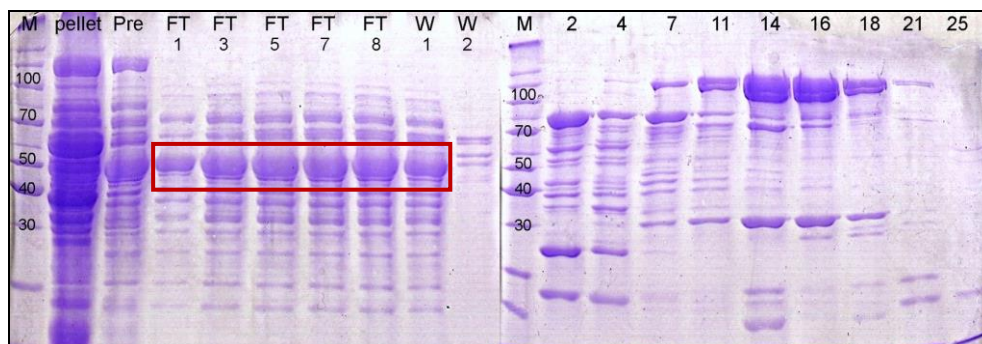
Il riquadro rosso evidenzia le bande corrispondenti ad HDAC1 (55 kDa). È stato, perciò, deciso di unire le frazioni di eluizione 32- 41 che corrispondono ad una percentuale di gradiente che va dal 16 al 20 %, pari ad una concentrazione di NaCl compresa tra 360 a 450 mM. Data l'elevata concentrazione salina del campione, è stato necessario ridurre tale concentrazione ad un valore pari a 50 mM, per operare il successivo passaggio cromatografico; il metodo è descritto nel paragrafo 3.15 (Materiali e Metodi).



**Figura 4.21.** Q-Sepharose Fast Flow: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluzione. La retta indicata con il colore rosso rappresenta il gradiente lineare di eluzione (NaCl 50-600 mM).

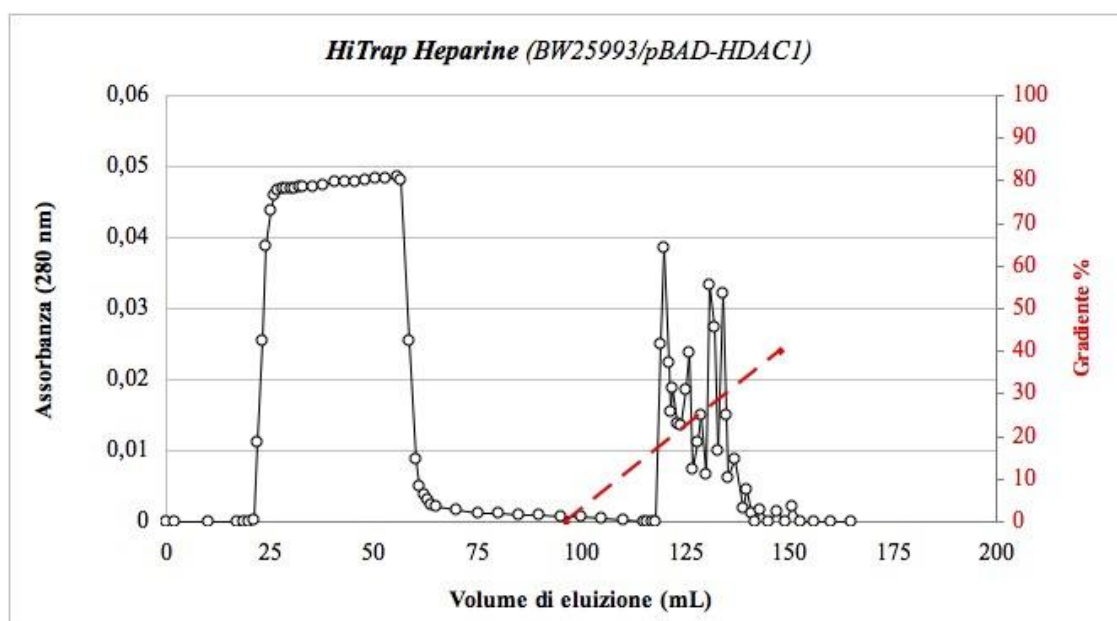
#### **4.2.5.2 Cromatografia di affinità: HiTrap-Heparine**

Come secondo passaggio di purificazione è stata eseguita una cromatografia di affinità con la resina HiTrap Heparine HP; è stato utilizzato lo stesso volume di caricamento e la stessa metodica descritta per il ceppo TOP10. Nel cromatogramma (figura 4.23) è possibile osservare un elevato picco, corrispondente alle fasi di *flow-through* e di lavaggio (*wash*). Il gradiente lineare di NaCl (50-800 mM) ha provocato il distacco di numerose proteine dalla colonna, generando diversi picchi visibili nel cromatogramma. Le frazioni raccolte, da 1 ml ciascuna, sono state controllate mediante elettroforesi SDS-PAGE per verificare in quali fosse presente HDAC1 (figura 4.22).



**Figura 4.22.** SDS-PAGE delle frazioni relative alla cromatografia di affinità (HiTrap-Heparine HP). **Pre:** campione caricato concentrato; **FT<sub>1</sub>, FT<sub>3</sub>, FT<sub>5</sub>, FT<sub>7</sub>, FT<sub>8</sub>:** Flow Through; **W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>:** Wash. La numerazione si riferisce alla successione di campioni raccolti durante il gradiente. HDAC1 è evidenziata dal riquadro rosso (55 kDa).

Dall'osservazione del profilo proteico del gel, HDAC1 è presente nelle frazioni del *flow through* e nella prima frazione di lavaggio. Questo indica, come osservato anche nei risultati precedenti (paragrafo 4.1.4.2, Risultati e discussione), che la proteina non si lega alla matrice ma esce durante il caricamento; la colonna ha trattenuto proteine contaminanti, eluite successivamente con il gradiente di sale. Di conseguenza, malgrado il mancato legame di HDAC1 alla resina, sono state eliminate numerose proteine contaminanti. Tutte le frazioni incluse nel *flow through* ed la prima fase di lavaggio sono state raccolte ed unite (45 mL). Anche in questo caso, non è stato necessario desalare il campione dato che la concentrazione di sale era rimasta invariata (50 mM). Il campione è stato semplicemente concentrato per ottenere un volume adatto alla successiva cromatografia (10 mL).

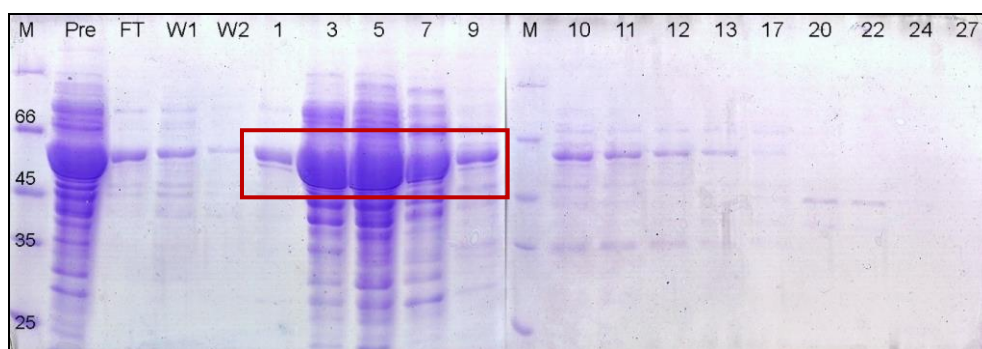


**Figura 4.23.** HiTrap-Heparine HP: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluizione. La retta in colore rosso rappresenta il gradiente lineare di eluizione.



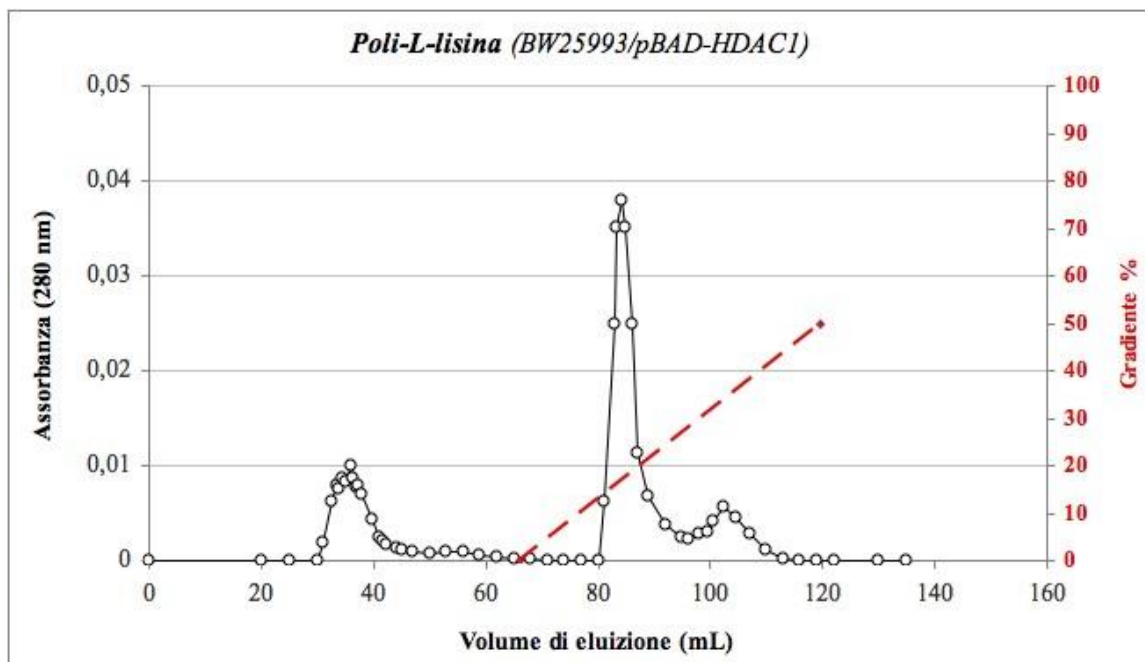
#### 4.2.5.3 Cromatografia di affinità: Poly-L-lysine

Il terzo passaggio cromatografico è stato eseguito con lo stesso tipo di colonna e con la stessa metodica, descritta nel paragrafo 4.1.4.3, relativa al ceppo TOP10. In figura 4.25 è riportato il cromatogramma ottenuto. Si nota un primo picco, poco elevato, in corrispondenza del *flow through* e della fase di lavaggio (volume pari a 30-40 mL). Segue un picco molto elevato e definito dovuto all'applicazione del gradiente lineare di NaCl (50 mM-1 M). Le frazioni eluite sono state controllate in SDS-PAGE per individuare la presenza della proteina HDAC1 (figura 4.24).



**Figura 4.24.** SDS-PAGE delle frazioni relative alla cromatografia di affinità (Poli-L-lisina). **Pre:** campione caricato; **FT:** Flow Through; **W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>:** Wash. La numerazione si riferisce alla successione di campioni raccolti durante il gradiente. HDAC1 è evidenziata dal riquadro rosso (55 kDa).

Dall'analisi del gel si osserva che HDAC1 è presente nelle prime frazioni eluite durante il gradiente di concentrazione. Le frazioni 1-9, che corrispondono alla percentuale di gradiente compresa tra il 12 e il 16 % (corrispondente a 290 e 370 mM NaCl), sono state riunite. La concentrazione di sale è stata ridotta, anche in questo caso, fino a 150 mM, per potere procedere con l'ultimo passaggio di purificazione.

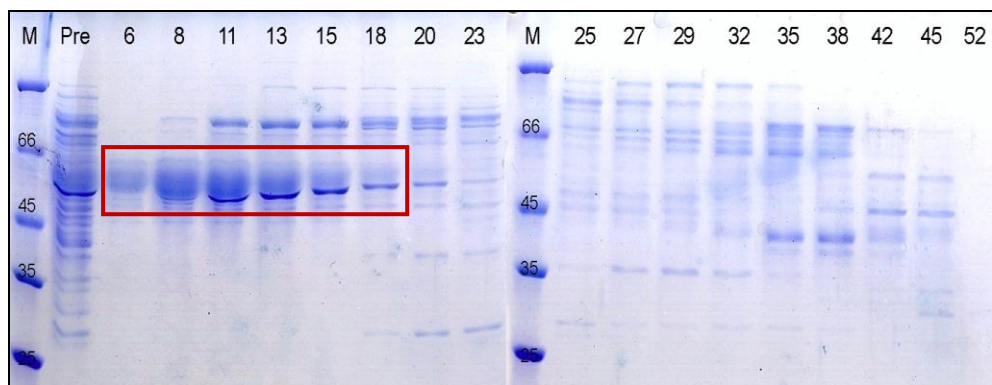


**Figura 4.25.** Poli-L-lisina: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (misurata a lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluzione. La retta indicata in colore rosso rappresenta il gradiente lineare di eluzione.

#### **4.2.5.4 Cromatografia ad esclusione molecolare: Superdex 200**

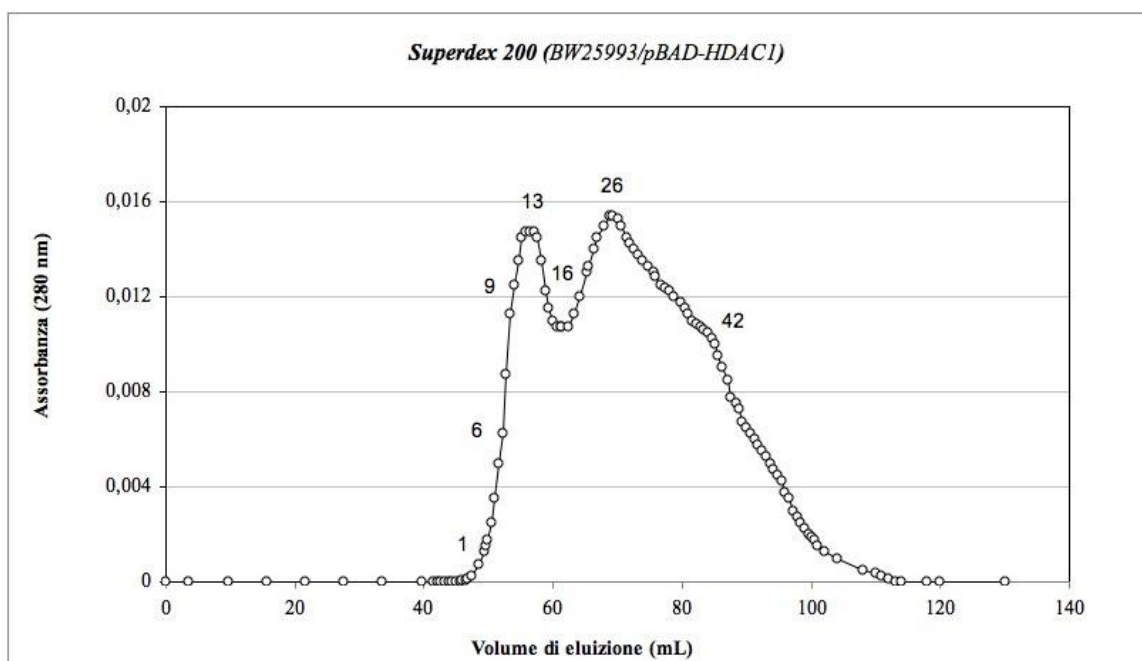
La fase conclusiva del processo di purificazione ha previsto, anche in questo caso, una cromatografia ad esclusione molecolare (gel filtrazione). Il tipo di resina e la metodica utilizzata sono le stesse descritte nel paragrafo 4.1.4.4 (Discussione e risultati). Aliquote delle frazioni eluite sono state caricate in gel e controllate mediante SDS-PAGE per individuare la presenza, ed il livello di purezza, di HDAC1 (figura 4.26).

Come si osserva nei gel, la banda proteica corrispondente a HDAC1 è presente nelle frazioni 6-15 (volume totale pari a 8,8 mL). Tali frazioni, anche in questo caso, si localizzano nel primo picco del cromatogramma (figura 4.27) di conseguenza l'eluizione della proteina è avvenuta subito dopo il fronte con un volume di eluzione che corrisponde al marcatore con peso molecolare pari a 440 kDa (ferritina).



**Figura 4.26.** SDS-PAGE delle frazioni relative alla cromatografia ad esclusione molecolare (Superdex 200). **Pre:** campione caricato concentrato. HDAC1 è evidenziata dal riquadro rosso (55 kDa). Nei gel sono riportate, in successione, le frazioni raccolte.

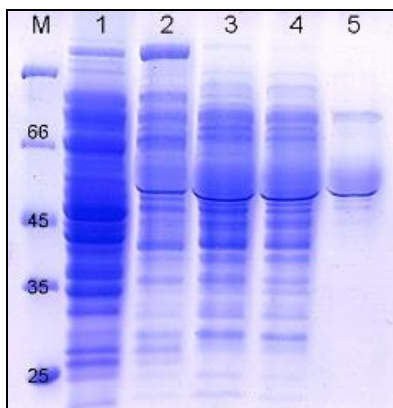
Tale risultato, analogo a quanto osservato nel caso del ceppo TOP10, è indice di uno stato di aggregazione di HDAC1, la quale assume presumibilmente forma ottamerica. Di conseguenza, pur avendo cambiato il ceppo e le modalità di espressione, l'esito finale non è cambiato e l'aggregazione non è stato impedita. Sarebbe interessante, a questo punto, valutare altre variazioni, (condizioni di espressione, nuovo ceppo batterico, diverso vettore) per tentare di ottenere HDAC1 in forma monomerica.



**Figura 4.27.** Superdex 200: cromatogramma che riporta l'andamento dell'assorbanza (misurata a lunghezza d'onda pari a 280 nm) in funzione del volume di eluizione. Nel grafico sono riportati i numeri delle frazioni raccolte.

#### 4.2.5.5 Purificazione e quantificazione proteica

Per valutare l'efficacia dei passaggi di purificazione e la resa finale, come descritto nel paragrafo 4.1.4.5 (Risultati e discussione), è stata eseguita un'analisi SDS-PAGE confrontando aliquote dei campioni provenienti da ciascuna cromatografia insieme al campione finale ottenuto dalla cromatografia per gel filtrazione. L'esito è mostrato in figura 4.28:



**Figura 4.28.** SDS-PAGE delle varie fasi di purificazione. **M:** marker; **1:** Pre Q-Sepharose; **2:** Pre-HiTrap Heparine; **3:** Pre-Poli-L-lisina; **4:** Pre-Gel Filtrazione; **5:** Post-Gel Filtrazione.

Anche durante questo protocollo di purificazione, è possibile notare un progressivo aumento della concentrazione di HDAC1 da un passaggio all'altro, in contemporanea ad una diminuzione di proteine contaminanti. Il protocollo di purificazione messo a punto, di conseguenza, è risultato efficace anche per il nuovo ceppo e ha consentito di ottenere un campione finale ad alto grado di purezza.

Parallelamente all'analisi qualitativa, è stata anche determinata la concentrazione proteica di ciascun campione attraverso il Saggio di Bradford, la cui metodica è descritta nel paragrafo 3.20 (Materiali e Metodi). I valori ottenuti sono riassunti nella tabella 4.2.

<b>Tabella 4.2. Purificazione dal ceppo BW25993/pBAD-HDAC1</b>			
<b>Tipo di colonna cromatografica</b>	<b>Volume di campione</b>	<b>Concentrazione proteica</b>	<b>Quantità di proteina totale</b>
<i>Q-sepharose</i>	50 ml	[19 mg/ml]	950 mg
<i>HiTrap Heparine</i>	35 ml	[1,51 mg/ml]	52,9 mg
<i>Poli-L-lisina</i>	11 ml	[2,25 mg/ml]	24,75 mg
<i>Gel Filtration</i>	2 ml	[5,51 mg/ml]	11,02 mg

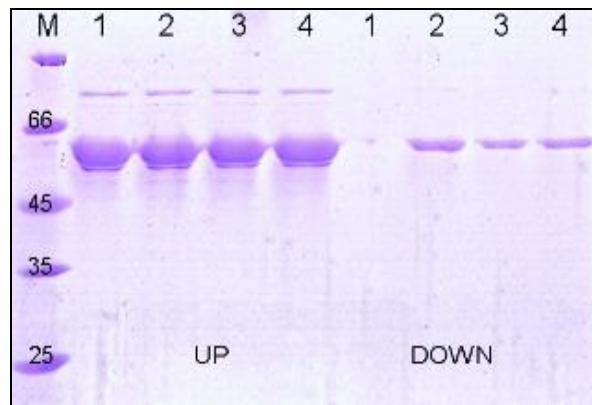
La quantità di proteina totale, come previsto, cala durante le fasi di purificazione, a conferma dell'avvenuta separazione di proteine contaminanti. La soluzione proteica finale, ottenuta dopo gel filtrazione e contenente HDAC1 pura, risulta avere questi valori:

<b>Volume</b>	<b>Concentrazione proteica</b>	<b>Quantità di proteina totale</b>	<b>Molarità</b>
8,8 ml	[0,503 mg/ml]	4,4 mg	9,1 $\mu$ M

Da 3 L di coltura (biomassa pari a circa 5 g/L) sono stati ottenuti 4,4 mg di proteina. La resa del processo è nettamente superiore rispetto al precedente ceppo TOP10 di *E.coli*, e questo può essere spiegato dall'aumento del livello di espressione derivato dal cambio di ceppo. Questo conferma la maggiore efficacia della nuova combinazione ceppo-vettore, che ha determinato un aumento della quantità di proteina ma non ne ha favorito la produzione in forma monomerica. Risulta, quindi, necessario eseguire ulteriori studi per tentare di risolvere il problema dell'aggregazione ed ottenere HDAC1 pura e nella forma di monomero.

#### **4.2.6 Prove di dissociazione con ultrafiltrazione**

Poiché, anche dal ceppo BW25993/pBAD-HDAC1, HDAC1 è stata ottenuta in forma ottamerica, sono state effettuate delle prove di ultrafiltrazione per tentare di dissociare la proteina (vedi paragrafo 4.1.5, Risultati e discussione e paragrafo 3.21, Materiali e Metodi). Tra i numerosi agenti disaggreganti testati in precedenza, è stato scelto solo il detergente SDS, che era stato l'unico ad avere un effetto positivo. In particolare, sono state analizzate tre diverse concentrazioni (0,2-0,5-1 %). La procedura utilizzata è la stessa del ceppo TOP10 ed è descritta nel paragrafo 4.1.5.2 (Risultati e discussione). I campioni sono stati sottoposti ad ultrafiltrazione ed aliquote del ritentato (up) e del permeato (down) sono state analizzate in SDS-PAGE. Il risultato è illustrato in figura 4.29.



**Figura 4.29.** Prove di dissociazione ed analisi SDS-PAGE. Up: retentato. Down: permeato 1) controllo negativo, HDAC1 senza additivo; 2) SDS 0,2 %; 3) SDS 0,5 %; 4) SDS 1%.

In analogia a quanto osservato con il precedente campione proteico, tutte le concentrazioni di SDS sono state efficaci; infatti, le aliquote denominate *down*, contengono HDAC1 in forma dissociata, con un peso molecolare inferiore a quello del filtro (100 kDa). L'effetto dissociante svolto dall'SDS non è totale in quanto una parte della proteina rimane nel campione *up* e, di conseguenza, si trova in una forma aggregata. Di conseguenza, sono necessari ulteriori studi per riuscire a migliorare tale effetto ed eliminare il problema dell'aggregazione.

## 5. Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha permesso di ottenere informazioni interessanti riguardanti l'espressione in *Escherichia coli* e la purificazione della proteina ricombinante HDAC1. In letteratura sono riportati solamente esempi di produzione di HDAC1 in sistemi eucariotici, di conseguenza, la possibilità di utilizzare un sistema batterico costituisce un'alternativa molto interessante.

Una prima considerazione può essere fatta sulla scelta del sistema di espressione e, quindi, sulla diversa combinazione ceppo-vettore. Non esiste, infatti, un protocollo ottimale standard ma, per ogni proteina che si intenda produrre in maniera eterologa, è necessario mettere a punto le condizioni più adatte, variando il ceppo ospite, il vettore di espressione ed i parametri culturali.

In questo caso, è stata valutata l'espressione di HDAC1 utilizzando due ceppi diversi di *E. coli*: TOP10 e BW25993. Dai risultati ottenuti è possibile osservare una considerevole differenza nei due protocolli di espressione della proteina eterologa. In entrambi i casi, è stata utilizzata una stessa quantità di coltura batterica, pari a 3 L, cresciuta adottando condizioni diverse studiate in modo da ottimizzare il processo. Con il ceppo TOP10/pBAD-HDAC1 è stata ottenuta una quantità di biomassa pari a circa 3 g/L ma il livello di espressione di HDAC1 è risultato piuttosto basso. La situazione è stata migliorata utilizzando il ceppo BW25993/pBAD-HDAC1, costruito *ex novo* nel laboratorio ospitante. Le prove di espressione, infatti, hanno evidenziato un significativo incremento della quantità di proteina prodotta e tale risultato è stato confermato in fase di produzione: la quantità di biomassa è risultata pari a 5 g/L e la quantità di proteina ottenuta è risultata doppia rispetto al caso precedente. Tali risultati possono essere spiegati ipotizzando una maggiore stabilità e resistenza allo stress provocato dall'inserimento del plasmide del ceppo BW25993 di *E. coli*. Inoltre, anche la temperatura di crescita e la concentrazione di induttore sembrano influenzare notevolmente l'esito dell'espressione.

Ulteriori considerazioni si possono fare per la fase di purificazione. Il protocollo messo a punto, che prevede una serie specifica di passaggi cromatografici, è risultato efficace e consente di ottenere HDAC1 con un elevato grado di purezza. Negli estratti proteici totali di entrambi i ceppi, infatti, la quantità di proteine contaminanti è stata ridotta

notevolmente durante i successivi passaggi. Tale risultato è visibile chiaramente, in entrambe i casi, analizzando i gel SDS-PAGE dove si osserva un aumento graduale della banda proteica corrispondente ad HDAC1. Data la diversa resa di espressione iniziale, la quantità finale di HDAC1 purificata è differente nei due casi: con il ceppo BW25993/pBAD-HDAC1 sono stati ottenuti 4,4 mg di proteina totale, mentre con il ceppo TOP10/pBAD-HDAC1 circa 2,5 mg.

Infine, è possibile formulare alcune riflessioni in merito alla preparazione proteica ottenuta ed alla forma in cui HDAC1 è stata purificata. Dall'interpretazione dei dati, provenienti dalla cromatografia per gel filtrazione, è possibile ipotizzare che la proteina sia eluita come oligomero, presumibilmente come ottamero. Questo presunto stato di aggregazione potrebbe influenzare il corretto svolgimento dell'attività enzimatica. Per questo motivo, sono state eseguite numerose prove di dissociazione utilizzando diversi agenti con azione disaggregante. Tuttavia, gli unici composti che sono risultati efficaci sono due detergenti, l'SDS (anionico) e il CTAB (cationico). Il primo, già utilizzato in studi precedenti, è attivo in diverse concentrazioni ed è in grado di dissociare circa 1/3 della proteina totale presente in soluzione. Il detergente cationico CTAB, invece, è un composto che ha mostrato una più debole capacità di dissociazione e saranno necessari, perciò, ulteriori studi per indagare meglio la sua azione dissociante.

In conclusione, grazie agli studi effettuati, la proteina ricombinante di interesse, HDAC1, è stata prodotta in forma purificata e con un'alta resa, anche se in forma ottamerica. Di conseguenza, il protocollo utilizzato è efficace, tuttavia sono necessari ulteriori studi che conducano alla produzione della proteina in forma monomerica. In futuro si potrebbero indagare, ad esempio, altri reagenti dissocianti, in particolare detergenti, in grado di dissociare l'aggregato proteico senza modificare l'attività enzimatica. In alternativa, si potrebbero utilizzare altri sistemi di espressione (nuove combinazioni ceppo-plasmide), per valutare il livello di espressione e di aggregazione finale della proteina purificata.



# BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUZIONE

[1] Simmons D., “Genetic inequality: Human genetic engineering”, *Nature Education*, 2008, **1**(1): 173.

[2] Mai A., Massa S., Rotili D., Cerbara I., Valente S., Pezzi R., Simeoni S., Ragno R., “Histone Deacetylation in Epigenetics: An Attractive Target for Anticancer Therapy”, *Medicinal Research Reviews*, 2005, **25** (3): 261-309.

[3] Kuo Min-Hao, David Allis C., “Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation”, *BioEssays*, 1998, **20**: 615-626.

[4] Delcuve Geneviève P., Khan Dilshad H., Davie James R., “Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors”, *Clinical Epigenetics*, 2012, **4**: 5.

[5] Reichert N., Choukrallah M. A., Matthias P., “Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation and development”, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012, **69**: 2173–2187.

[6] Hrabeta J., Stiborova M., Vojtech A., Kizek R., Eckschlager T., “Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review”, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2014 Jun; **158**(2): 161-169.

[7] Walkinshaw D. R., Yang X. J., “Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics”, *Current Oncology*, 2008, **15** (5): 70-76.

[8] Dokmanovic M., Clarke C., Marks P. A., “Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Prospectives”, *Mol Cancer Res*, 2007, **5**: 981-989.

[9] Walsh Christopher T., Garneau-Tsodikova Sylvie, and Gatto Gregory J. Jr, “Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**: 7342 – 7372.

[10] Laura A. Palomares, Sandino Estrada-Mondaca, and Octavio T. Ramírez, (2004) “Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, Second Edition”, Edited by Paulina Balbàs and Argelia Lorence; Editore, Humana Press; volume 267.

[11] Hanning G. and Makrides S. C., “Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*”, *TIBTECH*, feb 1998, vol. 16: 54-60.

[12] Guzman L. M., Belin D., Carson M. J. and Beckwith J., “Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter”, *J. Bacteriol.* 1995, **177**(14):4121.

[13] Schleif R., “AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action” *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 1–18.

[14] Schleif R., “AraC protein: a love-hate relationship”, *BioEssays*, 2003, 25: 274–282.

#### **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

[15] Wang W, Nema S, Teagarden D, “Protein aggregation- Pathways and influencing factors”, *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 390: 89-99.

[16] Bondos S E, Bicknell A, “Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification”, *Analytical Biochemistry* 2003, 316 (2): 223-231.

# RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare alla Prof.ssa Stefan, per la pazienza, l'aiuto e l'incoraggiamento, per avermi seguito e insegnato tante cose, per avermi spronato a fare sempre meglio.

Un ringraziamento al Prof. Hochkoepler per l'aiuto, gli insegnamenti e i consigli.

Grazie a tutti i ragazzi del laboratorio, che hanno passato con me questi mesi tra momenti più impegnativi e altri più spensierati.

Il tirocinio è stata una meravigliosa esperienza che non dimenticherò.

Grazie alla mia famiglia, per esserci sempre stata, perché c'è e mi da ogni giorno il suo affetto. Avete faticato con me in questi anni, non potrò mai ringraziarvi abbastanza.

“Last but not least”, un ringraziamento a tutti coloro che mi sono stati vicini, non vi nomino uno ad uno perché vorrei ringraziarvi personalmente per tutto il supporto che mi avete dimostrato in questi mesi.

**GRAZIE DI CUORE**

“Se camminassimo solo nelle giornate di sole non raggiungeremmo mai la nostra destinazione.” (P. Coelho)