

Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologia della Chimica Industriale

Espressione della proteina CRM197 in
Escherichia coli e purificazione
mediante cromatografia di affinità

CANDIDATO

Mattia Boiani

RELATORE

Dott.ssa Stefan Alessandra

CORRELATORE

Prof. Alejandro Hochkoepler

II Sessione

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1. Scopo del lavoro	3
2. Introduzione	4
2.1: <u>La tossina difterica</u>	4
2.2: <u>Caratteristiche biologiche e biochimiche</u>	5
2.2.1: <u>Sintesi</u>	5
2.2.2: <u>Struttura</u>	5
2.2.3: <u>Interazione con la membrana</u>	6
2.2.4: <u>Attività catalitica</u>	7
2.3: <u>Il CRM197</u>	9
2.3.1: <u>Caratteristiche generali</u>	9
2.4: <u>Principali metodiche di produzione</u>	10
2.4.1: <u>Tossina difterica in <i>C. Diphtheriae</i></u>	10
2.4.2: <u>CRM197 in <i>C. Diphtheriae</i></u>	14
2.4.3: <u>Produzione eterologa di CRM197</u>	15
2.5: <u>Espressione eterologa in <i>Escherichia coli</i></u>	17
2.6: <u>Principali caratteristiche e applicazione potenziali di CRM197</u>	19
3. Materiali e metodi	22
3.1: <u>Ceppi batterici</u>	22
3.2: <u>Plasmidi</u>	22
3.3: <u>Crescita ed espressione</u>	23
3.4: <u>Lisi, estrazione e solubilizzazione</u>	24
3.5: <u>SDS-PAGE</u>	25
3.6: <u>Quantificazione proteica</u>	26
3.7: <u>Purificazione mediante cromatografia</u>	27
3.8: <u>Analisi IR della resina Profinity-IMAC</u>	30
3.9: <u>Dialisi</u>	31
3.10: <u>Saggi di attività DNAsica</u>	31

4. Risultati sperimentali	33
4.1: <u>Espressione batterica</u>	33
4.2: <u>Lisi cellulare ed estrazione</u>	36
4.3: <u>Purificazione estratto proteico</u>	36
4.3.1: <u>Cromatografia per gravità</u>	37
4.3.2: <u>Cromatografia in pressione in condizioni denaturanti</u>	44
4.3.3: <u>Cromatografia in pressione con refolding proteico</u>	51
4.4: <u>Analisi IR della resina Pronity-IMAC</u>	60
4.5: <u>Saggi di attività DNAsica</u>	61
5. Conclusioni	63
Bibliografia	65

1. Scopo del lavoro

In questo lavoro di tesi sono stati confrontati diversi protocolli per la purificazione della proteina CRM197His mediante cromatografia di affinità a cationi divalenti. Il CRM197 è una variante della tossina difterica caratterizzata da stessa massa molecolare e struttura. A causa di un'unica mutazione (G52E), tale variante è atossica e presenta numerose applicazioni in campo farmaceutico (in particolare nella preparazione di vaccini coniugati). Fino ad ora, per la produzione del CRM197 è stato utilizzato il ceppo originale di derivazione cioè *Corynebacterium diphtheriae*, e la produzione eterologa nel batterio *Escherichia coli* ha mostrato notevoli difficoltà. In particolare, mentre è stato possibile definire un valido protocollo di sovraespressione e di estrazione proteica, le fasi successive di purificazione e di *refolding* (rinaturazione) sono ancora problematiche e causano basse rese finali, ostacolando le prospettive di scale-up su scala industriale.

Il CRM197, infatti, per le sue caratteristiche strutturali, come l'elevata percentuale di amminoacidi idrofobici e la presenza di foglietti β esposti al solvente, è suscettibile alla formazione di aggregati insolubili che impone, lungo tutto il processo, il controllo delle interazioni idrofobiche (con agenti denaturanti e/o detergenti).

In un precedente lavoro di tesi, è stato sviluppato un protocollo valido per ottenere un'elevata espressione proteica intracellulare. Il primo passaggio di purificazione prevede una cromatografia di affinità su colonna che viene sfruttata anche per eseguire il *refolding* proteico. Tuttavia, durante la messa a punto di tale processo, sono stati osservati evidenti fenomeni di aggregazione della proteina, oltre all'instaurarsi di legami aspecifici proteina-proteina o proteina-resina cromatografica.

In questo lavoro di tesi sono state affrontate alcune problematiche legate a tale passaggio di purificazione per cercare di individuare le condizioni ottimali per ottenere il CRM197 in forma nativa e biologicamente attiva.

2. Introduzione

2.1 La tossina difterica

I primi studi riguardanti tossine risalgono agli inizi del XX secolo, l'interesse verso queste sostanze biologiche è dovuto al fatto che sono causa di diverse patologie quali il tetano, la pertosse, il botulismo, il colera e la difterite (1). Si definiscono tossine le “sostanze solubili che alterano il normale metabolismo delle cellule ospite, con effetti deleteri sull'intero organismo infettato” (2). Tutte le tossine possono essere distinte in tre grandi categorie secondo il loro sito di attacco (bersaglio) nella cellula ospite:

1. Tossine agenti all'esterno della cellula mediando la necrosi tessutale;
2. Tossine che alterano la permeabilità della membrana plasmatica legando proteine di membrana o specifici recettori;
3. Tossine agenti nel citosol inattivando specifiche vie metaboliche (3).

La tossina difterica (DT) si inserisce nell'ultimo gruppo. Lo studio di questa tossina risale al 1820, quando la difterite fu identificata come una malattia specifica, anche se solo nel 1884 venne individuato il *Corynebacterium diphtheriae* come agente eziologico, ovvero della causa della malattia (4). Da allora la difterite fu al centro di molti studi per molte ragioni:

- Il batterio responsabile della difterite fu uno dei primi isolati in coltura pura,
- La difterite è una malattia i cui maggiori sintomi sono attribuibili all'azione di una singola esotossina, non a un complesso di cause scatenanti,
- Le proprietà biologiche e biochimiche della tossina difterica rappresentavano una sfida poiché ricadevano in ambiti scientifici ancora inesplorati in quel periodo (5).

La prima evidenza sperimentale della presenza di una sostanza tossica diffusibile secreta dal batterio e in grado di agire lontano dal sito d'infezione si ebbe quando Roux e Yersin, dopo aver infettato alcuni animali con filtrati sterili di colture liquide di *C. diphtheriae*, osservarono la presenza degli stessi sintomi della difterite (6). Successivamente, tale ipotesi fu confermata con l'isolamento della tossina stessa (7) (8). Le prime vaccinazioni furono possibili quando si scoprì che trattando la DT con formaldeide si otteneva una forma non tossica, asintomatica ma altamente immunogenica chiamata “tossoido difterico” (9), questo permise l'eradicazione della malattia in vaste aree del mondo (10) ed ancora oggi il tossoido viene usato all'interno di vaccini combinati (ad esempio nel

vaccino DPT anti difterite-tetano-pertosse). La difterite, infatti, è una malattia infettiva molto contagiosa che colpisce inizialmente le vie respiratorie ma può provocare complicanze in numerosi organi, quali reni, fegato e cuore (miocardite). La tossina (esotossina) è estremamente tossica: la dose letale nell'uomo è pari a 100-150 ng/kg.

2.2 Caratteristiche biologiche e biochimiche

2.2.1 Sintesi

Il microrganismo *Corynebacterium diphtheriae* (Gram positivo) è in grado di sintetizzare la DT solo se infettato dal corinefago β , un virus lisogenico che integra nel genoma del batterio il gene *tox*, codificante la tossina; in seguito a questa integrazione, il ceppo batterico diventa patogeno (il ceppo “selvatico” non è virulento). La trascrizione del gene *tox* è fortemente regolata dalla concentrazione di ferro nel terreno di coltura; è stato identificato, infatti, un fattore di trascrizione batterico (DTxR), che funge da repressore della trascrizione in presenza di concentrazioni di ferro maggiori di 0,14 $\mu\text{g/mL}$ (11) (12). Il repressore DTxR, infatti, è in grado di complessare lo ione ferroso Fe^{2+} adottando di conseguenza una conformazione ad alta affinità per l'operatore del gene *tox* (13).

2.2.2 Struttura

La tossina difterica è un polipeptide composto da 535 amminoacidi, il cui peso molecolare è di 58 kDa e la cui struttura può essere suddivisa in due frammenti legati insieme da un ponte disolfuro: il frammento A costituito dal solo dominio catalitico (composto dai primi 193 amminoacidi) ed il frammento B composto dal dominio R, di legame al recettore, e dal dominio T di traslocazione; il frammento B comprende gli ultimi 342 amminoacidi (14) (15) (16). La tossina viene secreta dalla cellula sotto forma di “proenzima”, ovvero in forma non attiva, ed esplica la sua azione tossica solo in seguito ad un taglio proteolitico fra i due frammenti A-B ed alla riduzione del ponte S-S. In figura è riportata la struttura della tossina difterica.

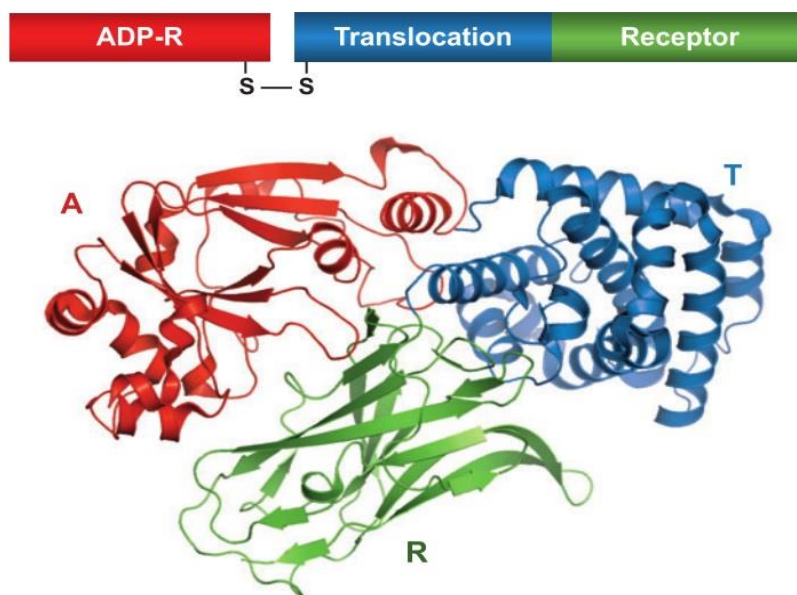


Fig. 2.1: Struttura cristallografica della tossina difterica (PDB: 1DDT). In rosso il dominio N-terminale, corrispondente al frammento A; in verde ed in blu il dominio C-terminale corrispondente al frammento B.

Il frammento B è suddiviso in 2 domini R e T distinti. Tratto da (16)

L'attivazione del proenzima avviene sulla superficie cellulare da parte di una furina, ovvero di un enzima appartenente alla classe delle idrolasi, che provoca un taglio tra i due frammenti A e B, che rimangono momentaneamente tenuti assieme dal legame disolfuro tra le cisteine 186 e 201. La riduzione del ponte S-S, che libera il frammento catalitico A, avviene solo dopo la traslocazione all'interno della cellula; in tal modo la tossina è in grado di esprimere la propria tossicità nel citosol (11).

2.2.3 Interazione con la membrana

Nel 1992, Eidels & collaboratori identificarono come recettore per la tossina difterica il precursore del fattore di crescita epidermico legante l'eparina (*Heparin Binding Epidermal Growth Factor*, ovvero proHB-EGF) (17) espresso in molti tipi cellulari in forma ancorata alla membrana cellulare (proHB-EGF) e presente anche in forma solubile (HB-EGF). Inoltre, tale fattore di crescita HB-EGF è sovraespresso in alcuni tipi di tumori umani conferendo alla tossina difterica e, di conseguenza anche alle varianti come il CRM197, una potenziale azione antitumorale (18).

L'attività tossica della proteina DT inizia con la formazione del legame con il recettore cellulare mediante il frammento B (più precisamente mediante il dominio R) e procede con il processo di endocitosi vescicolare mediata da recettore. Il dominio T, a seguito di

una modifica conformazionale dovuta all'acidificazione dell'ambiente interno all'endosoma, crea un canale nella membrana vescicolare mediante inserimento delle eliche idrofobiche (17). In questo modo il frammento A può essere traslocato nel citoplasma:

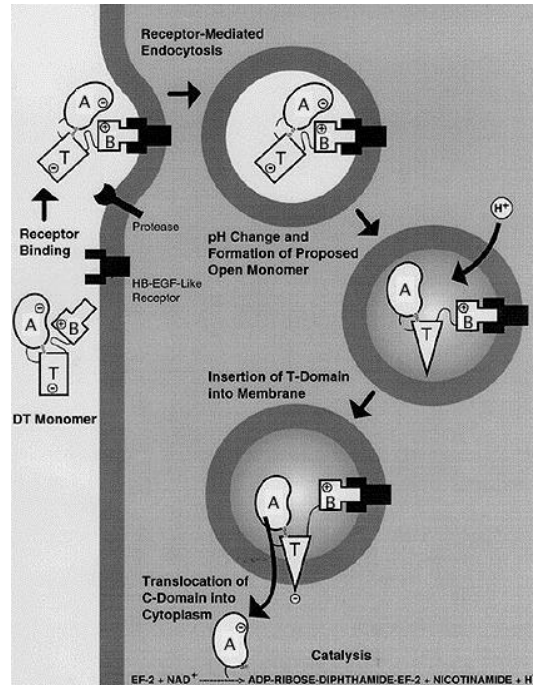


Fig. 2.2: Schema riassuntivo della penetrazione della tossina difterica nella cellula bersaglio. Tratto da (19)

Il meccanismo che porta a questa traslocazione non è del tutto chiaro ed esistono due teorie al riguardo:

- Il dominio T riesce a generare un classico poro nella membrana vescicolare;
- La traslocazione avviene in seguito ad “unfolding” assistito da chaperone (proteine il cui compito è quello di aiutare il folding proteico) (20).

Prima della traslocazione nel citosol, avviene la riduzione dei ponti disolfuro intramolecolari che porta al distacco del frammento A dal frammento B. Una volta nel citoplasma, il frammento A può dare avvio all'azione catalitica.

2.2.4 Attività catalitica

La prima attività associata alla tossina difterica fu la capacità di bloccare la sintesi proteica cellulare con conseguente inibizione di varie vie biochimiche della cellula (21) (22). Successivi studi dimostrarono che in questo meccanismo è coinvolta anche una molecola di nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) ed, in particolare, che il glutammato 148 del frammento A riusciva a legare questa molecola (23) (24) inserendola

in una tasca all'interno della proteina stessa (25). Il bersaglio dell'azione catalitica fu in seguito identificato come il fattore di allungamento 2 (EF-2), ovvero la proteina che catalizza la traslocazione dei due tRNAs e dell'mRNA dopo la formazione del legame peptidico all'interno del ribosoma durante la sintesi proteica (26). Due laboratori indipendenti riuscirono a dimostrare che la tossina difterica era in grado di trasferire il gruppo ADP-ribosio del NAD all'EF-2 (27) (28), catalizzando quindi l'ADP-ribosilazione dello stesso e bloccando la sintesi proteica. Questo processo venne chiarito quando si scoprì che EF-2 possiede un residuo istidinico modificato in diftamide (16), che risulta essere il bersaglio dell'ADP-ribosilazione:

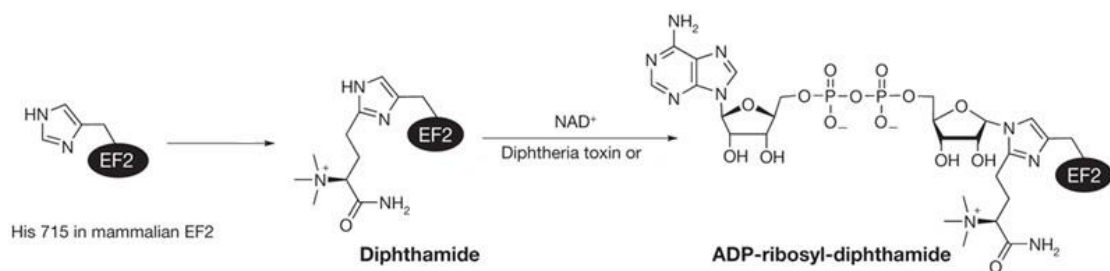


Fig. 2.3: Trasformazione del residuo istidinico a diftamide e ADP-ribosilazione

Studi più recenti hanno indicato la possibilità che la tossina difterica possieda anche una seconda attività catalitica, ovvero la capacità di degradazione il DNA con un'attività endonucleasica (29). La presenza di questa attività spiegherebbe il fenomeno di lisi cellulare a cui vanno incontro le cellule in seguito all'infezione. La tossina, quindi, sarebbe in grado di tagliare il DNA presente nel citoplasma in maniera aspecifica, idrolizzando il legame fosfodiesterico tra nucleotidi. Sembra, inoltre, che l'attività nucleasica e quella ADP-ribosilasica siano indipendenti l'una dall'altra. Come la DNasi I bovina, la tossina difterica taglia DNA a singolo e doppio filamento e richiede cationi bivalenti come magnesio e calcio per svolgere l'attività catalitica (30).

2.3 Il CRM197

Il Crossing Reacting Material 197 (CRM197) è una proteina ricombinante ottenuta per mutagenesi con nitrosoguanidina del DNA dei corinefagi β in cui è contenuto il gene *tox*. Di conseguenza, il ceppo di *Corynebacterium diphtheriae* infettato da tali fagi mutati, esprime e rilascia nell'ambiente extracellulare diverse versioni della tossina difterica che risultano inattive o caratterizzate da attività ridotta. Queste varianti sono state denominate "cross reacting materials". Le mutazioni possono provocare perdita dell'attività catalitica, se sono a carico del frammento A, o possono portare a variazione della capacità di interagire con la membrana cellulare, in seguito a mutazioni nel frammento B. Di entrambe le categorie sono noti diversi esempi: il CRM197, il CRM228 ed il CRM176 che hanno subito variazioni del frammento A, mentre il CRM45 e il CRM30 che hanno subito cambiamenti del frammento B. Queste varianti furono selezionate proprio per la loro bassa attività ADP-ribosilante pur mantenendo invariata la loro sierologia.

2.3.1 Caratteristiche generali

Il CRM197 differisce dalla tossina difterica wild type solo per una singola mutazione della tripletta GGG in posizione 52, codificante per l'amminoacido glicina, che risulta trasformata in GAG, codificante per l'acido glutammico; questo cambiamento non comporta, quindi, una variazione del peso molecolare (31) ma riduce la tossicità della tossina totalmente o quasi (32). Recenti studi (33) hanno dimostrato che la mutazione G52E, nonostante coinvolga un amminoacido interno al sito catalitico, non influisce sulla capacità di legame del CRM197 con il NAD, indice del fatto che la mutazione non comporta una variazione nella struttura quaternaria della proteina o della capacità di legame del substrato, ma piuttosto che influenza il meccanismo di catalisi.

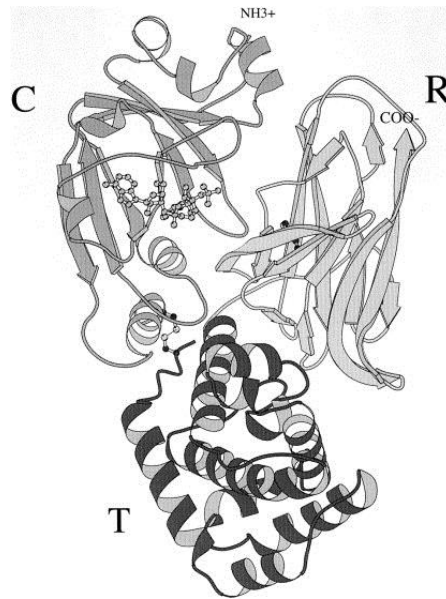


Fig. 2.4: Struttura della tossina difterica assimilabile a quella del CRM197 (34).

2.4 Principali metodiche di produzione

Considerando il grande utilizzo della tossina difterica inattivata e/o del CRM197 per la preparazione dei vaccini coniugati, è stato necessario isolare dei ceppi batterici iperproduttori in grado di sostenere una produzione industriale (35). Il ceppo più utilizzato attualmente per tale scopo è il *Corynebacterium diphtheriae* PW8 (Park-Williams 8) (36). Questo ceppo, infatti, presenta due particolarità che favoriscono la produzione della proteina, secreta nel terreno di coltura:

- Due siti di integrazione per il profago β ; in questo modo per ogni cellula si può avere l'interazione con due fagi e l'inserzione di due geni *tox* (36).
- Il profago può integrarsi nel cromosoma batterico in loci consecutivi (tandem), raddoppiando, quindi, le rese di produzione.

2.4.1 Tossina difterica in *C. diphtheriae*

In generale, la produzione di una proteina per via biochimica avviene prevalentemente facendo crescere il batterio di interesse all'interno di un bioreattore durante la fase di fermentazione. La fase successiva prevede la separazione del prodotto di interesse dalle cellule e dalle altre proteine presenti all'interno del brodo colturale.

Nel caso specifico della tossina difterica, esistono diversi brevetti industriali riguardanti la sua produzione e purificazione (37) (38) (39) (40). La fase fermentativa viene eseguita

in reattori di tipo batch o fed-batch e dura 20 ore, in presenza di terreno completo CY¹ bollito e filtrato in carta Whatman (0,22µm) per trattenere eventuali impurezze. Al brodo colturale vengono aggiunti 2 mL di soluzione I², 1 mL di soluzione II³ e 3 mL di soluzione III⁴ e una concentrazione di ioni Fe²⁺ non superiore ai 100 µg/L. Il recupero della proteina (DT o CRMs) risulta facilitato dalla sua secrezione nel brodo colturale e non è, quindi, necessaria alcuna lisi cellulare ma si eseguono semplicemente vari passaggi di microfiltrazione/diafiltrazione e successive centrifugazioni.

In Fig.2.5 è riportato schematicamente i passaggi fondamentali di un ciclo di produzione in un reattore batch da 100 L a partite dalla preparazione dell'inoculo batterico fino alla separazione del brodo colturale dai microrganismi.

¹ Composto da: estratto di lievito (20 g/L), idrolizzato di caseina (10 g/L), KH₂PO₄ (5 g/L), triptofano (10 g/L) e pH = 7,4.

² Composta da MgSO₄ (225 g/L), Alanina (1,15 g/L), Acido nicotinico (0,075 g/L), CuSO₄ (10 g/L), ZnSO₄ (10 g/L), MnCl₂ (10 g/L) e HCl concentrato 0,03 L.

³ Composta da Cistina (200 g/L) e HCl concentrato 0,2 L.

⁴ Composta da Maltosio (500 g/L), CaCl₂ (500 g/L) e KH₂PO₄ (10 g/L)

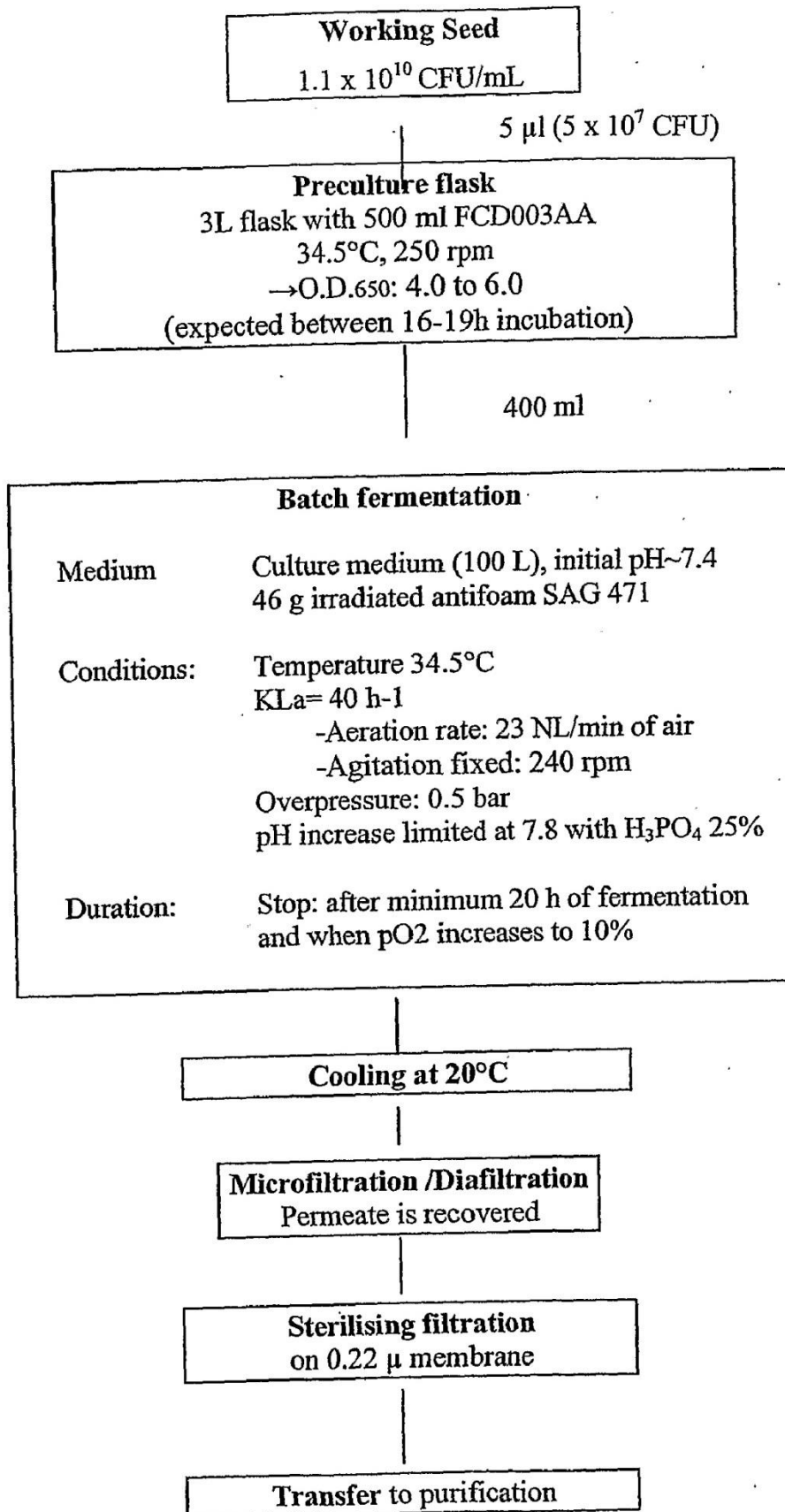


Fig. 2.5: Processo fermentativo del ceppo *C. diptheriae* PW8 tratto dal brevetto US 2008/0193475 (40)

I tamponi più utilizzati in questi processi sono quelli a bassa forza ionica quali Tris, Tricina, MES, Bis-Tris, MOPS o il tampone fosfato, le concentrazioni di questi possono variare tra i 10 mM - 50 mM con un pH vicino alla neutralità (7,4 – 7,6). Le rese ottenute da questi processi sono molto elevate, raggiungendo il 70% circa delle proteine totali (39). Prima di procedere con la purificazione della proteina il brodo colturale viene sottoposto ad alcuni trattamenti preliminari:

- Si chiarifica il terreno di coltura per eliminare tutti i residui cellulari attraverso una centrifugazione e microfiltrazione (membrane a fibre cave 0,1 µm-0,2 µm).
- In seconda fase si procede con una concentrazione fino a 20 volte del prodotto mediante precipitazione o ultrafiltrazione.
- Terzo passaggio facoltativo, utile nel caso si voglia sfruttare una cromatografia a scambio ionico, è la diafiltrazione per rimuovere eventuali sali ed evitare possibili perdite di prodotto durante la cromatografia. (39)

I trattamenti preliminari permettono di ottenere svariati vantaggi:

- Effettuare una prima fase preliminare di purificazione.
- Ridurre il volume di prodotto proteico da manipolare, limitando così, oltre ai costi di impianto, anche i tempi in cui la proteina è esposta a temperatura ambiente.
- Abbassare la forza ionica in previsione della prima fase cromatografica a scambio ionico.
- Aumentare le rese finali.

La purificazione che segue prevede due diversi passaggi di cromatografia:

1. Cromatografia a scambio ionico

Utilizzando una resina Q-sepharose, si sfrutta l'attrazione tra gruppi funzionali a carica opposta per separare tipi di proteine differenti; la diversa carica presente nelle proteine comporta, perciò, un distacco dalla resina a forze ioniche differenti. In questo caso, si tratta di cromatografia a scambio anionico, nella quale si lavora a pH superiore rispetto al punto isoelettrico della proteina di interesse, in modo da conferirle carica negativa e favorire il legame alla resina. La colonna viene condizionata con un tampone a bassa forza ionica, mentre il campione viene eluito mediante un gradiente lineare di KCl fino ad una concentrazione massima di 500 mM a pH 7.6. L'eluizione della tossina difterica avviene ad una concentrazione salina compresa fra i 100 mM e i 150 mM. Le frazioni recuperate dalla colonna cromatografica vengono sottoposte a diafiltrazione per

aumentare la forza ionica nel tampone (500 mM) e facilitare, quindi, il legame della proteina nella successiva cromatografia.

2. Cromatografia ad interazione idrofobica

Per questa cromatografia si usano delle resine polimeriche, quali l'agarosio, funzionalizzate con gruppi apolari (butilici, acetilici, fenilici) che permettono di creare delle interazioni con i residui idrofobici della proteina di interesse. La colonna cromatografica viene condizionata e lavata con un tampone di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 500 mM mentre l'eluizione viene effettuata riducendo la forza ionica con un gradiente lineare decrescente da 1 M a 0 M. L'eluizione della DT avviene ad una concentrazione salina pari a 700 mM.

Questo processo, che utilizza il ceppo doppio lisogeno PW8 cresciuto in cicli ripetuti di fed-batch, permette di ottenere una produzione di tossina pari a circa 100 mg/mL con valori di crescita batterica pari a 46-60 OD_{590} (in 50 L di coltura). Le fasi di purificazione mediante cromatografia assicurano una purezza finale del prodotto pari a circa il 98 % permettendo l'utilizzo nelle preparazioni farmaceutiche (39).

Tuttavia, tale processo attualmente in uso presenta alcuni limiti; infatti, la tossina prima di poter essere utilizzata per fini medici deve essere sottoposta ad un trattamento con formaldeide (0,4 – 0,7 %) per 30-40 giorni affinché avvenga la trasformazione a tossoide non patogeno. In certi casi si può avere la reversione alla forma tossica (41). Inoltre, la richiesta da parte del microrganismo di basse concentrazioni di ferro nel terreno di fermentazione comporta diverse complicazioni:

- Un aumento dei costi perché tutti i substrati dovranno avere basse o nulle concentrazioni di ferro.
- Il metabolismo del microrganismo risulterà rallentato, limitando la produzione della tossina e la resa del processo.

2.4.2 CRM197 in *C. diphtheriae*

Gli stessi principi utilizzati per la produzione della tossina difterica vengono sfruttati anche per la sintesi del CRM197, anche se con costi minori per via delle condizioni più semplici di sintesi e di purificazione. Ad esempio, l'atossicità della proteina diminuisce i costi di sicurezza del processo e rende inutile il trattamento finale con formaldeide, portando ad un risparmio generale dell'intero processo (41). Tuttavia, rimangono presenti i problemi riguardanti l'inibizione del metabolismo a causa delle basse concentrazioni di

ferro richieste. Le rese di questo processo arrivano a valori stimabili di 150 mg/L grazie all'utilizzo del ceppo PW8 doppio lisogeno. Un limite che influenza negativamente l'intero processo ed è legato a questo ceppo iperproduttore, è il drastico calo della resa produttiva che si verifica dopo 20 ore di fermentazione, proprio durante la fase esponenziale di crescita (Fig. 2.6). Questo calo probabilmente è dovuto alla secrezione di proteasi nel brodo di coltura durante la fase stazionaria, responsabili della degradazione di una parte del CRM197 accumulato.

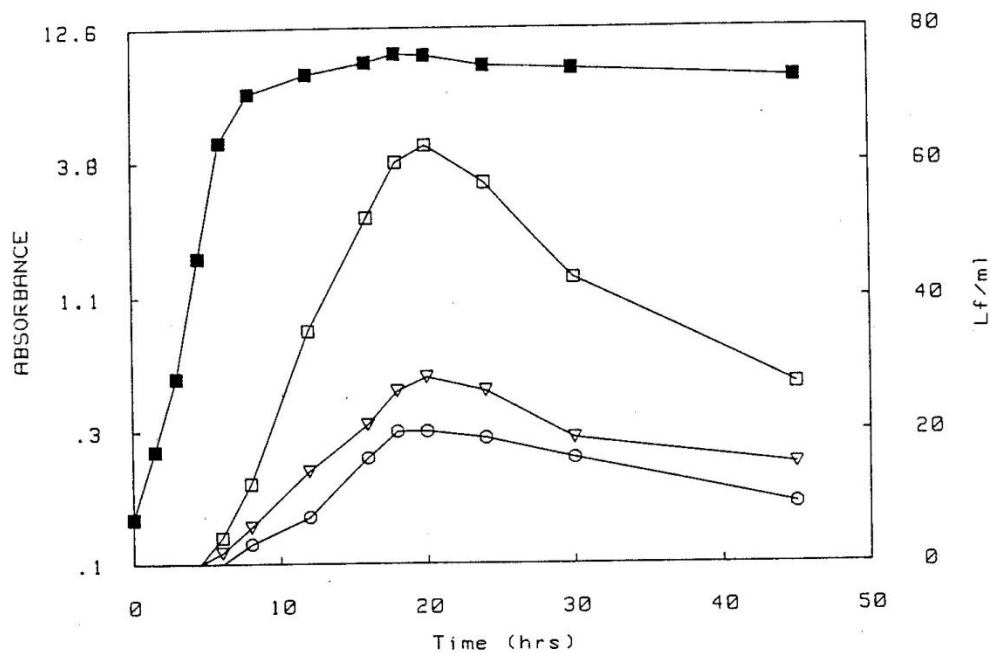


Fig. 2.6: Le diverse curve indicano la relazione fra il tempo e l'OD raggiunto durante la fase di crescita (■), la concentrazione del CRM197 ottenuto da ceppi di *C. diphtheriae* non tandem (□), tandem (Δ) e del ceppo monolisogeno (○). Tratto da (41).

2.4.3 Produzione eterologa di CRM197

Si parla di produzione eterologa di una proteina di interesse quando si eseguono delle modifiche a livello del genoma di un microrganismo per permettere l'espressione di proteine specifiche normalmente non prodotte. Fino ad alcuni anni fa, la tossina difterica (ed il CRM197) sono stati prodotti esclusivamente in *C. diphtheriae*. Nonostante i vantaggi citati nei capitoli precedenti, l'utilizzo di *C. diphtheriae* presenta alcuni aspetti negativi che limitano l'applicazione di questo processo biotecnologico, aspetti negativi connessi principalmente alla natura del microrganismo sfruttato:

- L'elevata tossicità della tossina difterica (la dose letale di tossina è di 0,1 µg/Kg peso) (11);
- *C. diphtheriae* richiede un substrato di fermentazione con basso contenuto di ferro di conseguenza il metabolismo risulta rallentato portando a calo della resa della proteina;
- La degradazione della proteina dopo 20 ore di fermentazione in batch a causa della secrezione di proteasi extracellulari (41) implica l'utilizzo di sistemi fed-batch con conseguente aumento dei costi del processo.

Proprio per questi motivi, negli ultimi anni si stanno sperimentando nuove vie di espressione eterologa del CRM197 in diversi microrganismi come *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* ed *Escherichia coli*. Purtroppo nei primi due casi non sono stati ottenuti risultati adeguati alla produzione industriale.

Escherichia coli è un microrganismo procariotico, perciò unicellulare, facile da coltivare e molto noto dal punto di vista genetico; attualmente è uno dei batteri più utilizzati per la produzione di proteine eterologhe, essendo in grado di crescere utilizzando diverse fonti carboniose e di accumulare una grande quantità di biomassa in poco tempo. Questi vantaggi hanno portato allo sviluppo di diversi ceppi iperproduttori mirati alla produzione industriale di proteine di interesse (42). Il CRM197 non fa eccezione e negli ultimi anni sono stati eseguiti numerosi studi mirati alla produzione di questa variante della tossina difterica in *E. coli*. Un primo tentativo fu eseguito per la produzione di una proteina ricombinante (ABM508) che consisteva in una proteina chimerica formata dalla parte N-terminale della tossina difterica fusa con l'ormone di stimolazione dei melanociti α (α -MSH). Furono create alcune varianti, diverse in lunghezza, la cui espressione venne posta sotto il controllo del promotore *tox* di *C. diphtheriae*, o sotto il controllo del promotore λ termo inducibile. Tuttavia non si riuscì ad ottenere in nessun caso un'espressione adeguata. Probabilmente la rimozione di circa 50 amminoacidi presenti all'N-terminale della tossina difterica esponeva una regione altamente idrofobica favorendo i fenomeni di aggregazione e di proteolisi. Furono eseguiti tentativi anche con costrutti dotati di una sequenza per la secrezione periplasmatica, ma la sovraespressione risultò letale per il ceppo batterico (43) (44).

A seguito di questi fallimenti, la ricerca si è focalizzata sull'espressione dei singoli frammenti del CRM197, in particolar modo del dominio B, responsabile del legame con il ricettore cellulare, del dominio catalitico A e di forme intermedie. Mentre è stato

possibile esprimere in *Escherichia coli* il solo dominio A, più difficoltosa risulta la produzione del frammento B a causa della sua elevata instabilità e tendenza ad aggregare. In letteratura è presente un unico lavoro in cui viene descritta una metodica per il clonaggio, l'espressione in *E. coli* (nel ceppo BL21) e la purificazione del frammento B della tossina difterica (45). Nel plasmide di espressione utilizzato (pQE-30), a valle del codone di inizio trascrizione, è stata inserita una sequenza di sei istidine consecutive per permettere una facile separazione mediante cromatografia di affinità. La proteina ricombinante, infatti, conterrà una regione aggiuntiva (detta "his-tag") che ne facilita la purificazione attraverso due passaggi cromatografici. Il primo passaggio prevede una cromatografia di affinità che sfrutta la capacità del tag istidinico di legare cationi divalenti, quali nichel, zinco, rame. In generale, si utilizza una resina opportunamente funzionalizzata in grado di coordinare ioni divalenti che a loro volta legheranno l'anello imidazolico dei residui istidinici. Il secondo passaggio cromatografico prevede una cromatografia ad esclusione molecolare, che discrimina le proteine in base alle dimensioni molecolari. Tuttavia, questa cromatografia ha evidenziato che circa il 70 % del frammento B prodotto con questa metodica si accumulava in aggregati insolubili impossibili da recuperare.

In letteratura non sono, perciò, reperibili lavori in cui venga descritta l'espressione in *E. coli* della tossina difterica intera o del CRM197.

2.5 Espressione eterologa in *Escherichia coli*

La possibilità di esprimere geni in sistemi eterologhi (diversi dal sistema naturale) deriva dalla necessità di ottenere grandi quantità di proteine di interesse. Attualmente sono noti e caratterizzati numerosi sistemi di espressione in procarioti; tali sistemi sono basati su opportuni "vettori di espressione" che consentono il clonaggio e la successiva espressione di un gene di interesse. In generale, la procedura prevede la costruzione di una molecola di DNA ricombinante formata dal vettore e dal gene bersaglio. Tale costrutto viene, quindi, inserito nella cellula ospite adatta alla produzione. L'espressione della proteina di interesse viene eseguita durante la crescita del microrganismo, utilizzando diversi sistemi di induzione. Al termine della crescita, la biomassa viene raccolta e si procede alla lisi cellulare ed alla successiva purificazione del prodotto di interesse.

I plasmidi (vettori di espressione) sono molecole circolari di DNA superavvolto a doppia elica, presenti nel citoplasma e distinguibili dal cromosoma batterico per le loro dimensioni. Questi plasmidi, una volta clonato al loro interno il gene bersaglio, vengono introdotti artificialmente all'interno della cellula ed in genere conferiscono la resistenza a determinati antibiotici (questo facilita la selezione dei microrganismi "trasformati"). Il gene codificante la proteina di interesse viene clonato a valle di un promotore (regione del DNA dove inizia la trascrizione) che è attivato solo in determinate condizioni ambientali, come la presenza o l'assenza di un particolare substrato. In questo lavoro di tesi, il sistema di espressione prevede l'utilizzo del ceppo di *Escherichia coli* BL21AI e del plasmide pET9a. In particolare, il ceppo BL21AI è stato opportunamente ingegnerizzato in modo da inserire, nel suo cromosoma, una copia del gene codificante l'RNA polimerasi del fago T7 a valle del promotore araBAD, inducibile semplicemente mediante aggiunta di arabinosio nel terreno di coltura. L'operone araBAD è molto importante in *Escherichia coli* wild-type e dirige l'espressione dei geni che codificano per gli enzimi necessari al metabolismo dell'arabinosio. Nel ceppo BL21AI, invece, l'operone è mutato (inserzione del gene T7 RNAP) perciò l'arabinosio diventa un semplice induttore gratuito e non viene metabolizzato. Nel plasmide pET9a, inoltre, è presente il promotore specifico riconosciuto dalla RNA polimerasi del fago T7. Il gene codificante il CRM197 viene clonato a valle del promotore T7, di conseguenza l'RNA polimerasi T7 funge da attivatore per la sua trascrizione. Si tratta, quindi, di un sistema di espressione a cascata, come si può notare nella figura 2.7:

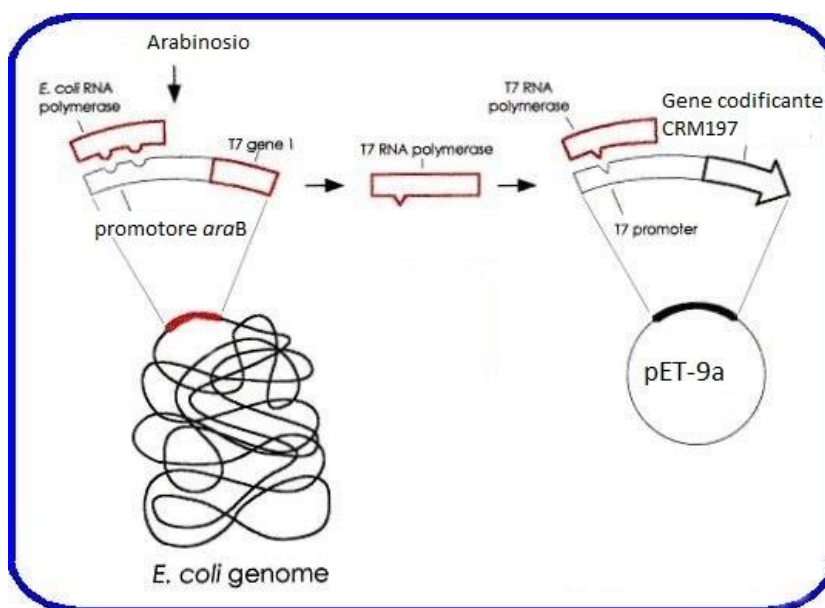


Fig. 2.7: Schema di una cellula BL21AI/pET-9a al momento dell'induzione con arabinosio (46).

In questo modo la sintesi della proteina di interesse può essere avviata al momento in cui la crescita cellulare ha già raggiunto il massimo della curva di crescita, evitando così che la produzione di biomassa venga rallentata dalla sintesi della proteina. Inoltre, il livello di espressione basale è praticamente nullo in assenza di arabinosio. Un sistema di espressione alternativo a quello descritto, che utilizza sempre la RNA polimerasi del fago T7 ed il plasmide pET9a, utilizza il ceppo di *Escherichia coli* BL21(DE3). In questo caso, l'espressione eterologa è controllata dal promotore dell'operon del lattosio (promotore *lac*) e l'induttore è il galattoside artificiale IPTG (isopropiltiogalattopiranoside). Si tratta anche in questo caso di un sistema di attivazione a cascata. Il gene codificante per l'RNA polimerasi T7 è presente nel cromosoma del ceppo BL21(DE3) a valle del promotore *lac*, di conseguenza l'aggiunta di IPTG nel terreno di coltura, determina la sintesi della polimerasi T7 e la trascrizione del gene di interesse.

2.6 Principali caratteristiche e applicazioni potenziali del CRM197

Il CRM197 risulta essere una molecola ideale da sfruttare per la vaccinazione anti-difterica, sia per la similarità della struttura con la tossina stessa, sia per la mancanza di tossicità e la contemporanea stimolazione del sistema immunitario. Inoltre queste caratteristiche rendono il CRM197 un ottimo candidato per altri utilizzi clinici, ad esempio nei vaccini glicoconiugati o nella terapia innovativa in campo oncologico (35).

In sintesi le caratteristiche principali del CRM197 sono:

- Rispetto alla DT ha una singola sostituzione amminoacidica all'interno del frammento A, questo indica che:
 - Ha lo stesso sito di legame per gli anticorpi monoclonali.
 - Si lega al doppio strato fosfolipidico
 - Ha la stessa lunghezza di catena della DT
 - Può essere coniugato indirettamente a varie molecole attraverso un linker
- E' privo di tossicità
- Largamente utilizzato nelle vaccinazioni.

Queste proprietà rendono il CRM197 un ottimo candidato per diversi utilizzi in ambito medico:

- Vaccini glicoconiugati

I vaccini sono preparati contenenti materiale genetico o proteine di membrana provenienti da microorganismi infettivi, opportunamente trattati per mantenere inalterate le proprietà antigeniche in maniera che, una volta somministrati, conferiscano immunità attiva al soggetto. I vaccini di nuova generazione prevedono la coniugazione di una porzione polisaccaridica della capsula proteica del batterio a una proteina immunogena che funge da carrier (47). La molecola carrier dei vaccini coniugati è fondamentale per la determinazione dell'efficacia del vaccino finale. Questa molecola deve essere atossica ma possedere una spiccata immunogenicità, in modo tale che il sistema immunitario possa riconoscere l'antigene coniugato sulla sua superficie. Il CRM197, per le sue innate proprietà, è adatto ad essere utilizzato come carrier perché stimola la risposta immunitaria dei linfociti B "della memoria". Sono numerosi i vaccini attualmente in uso in cui è contenuto il CRM197: il vaccino HibTITER contro *Haemophilus influenzae* tipo b, Prevnar contro *Streptococcus pneumoniae*, Menjugate contro *Neisseria meningitidis*. Anche il vaccino trivalente DPT (difterite-pertosse-tetano) contro *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani* e *Corynebacterium diphtheriae* utilizza il CRM197.

- Potenziale azione antitumorale

Recenti studi hanno evidenziato che il CRM197, legandosi al precursore di crescita epidermico proHB-EGF, può risultare utile nel trattamento di alcune tipologie di tumore (35). In alcuni tipi di cellule tumorali, infatti, il recettore risulta sovraespresso ed anche i livelli di HB-EGF solubile sono superiori rispetto alle situazioni normali. Tale fattore di crescita controlla numerosi processi biologici cellulari ed è coinvolto anche nell'acquisizione di malignità. L'interazione specifica con il CRM197 inibisce la maturazione del fattore di crescita HB-EGF (48) (49) (50) (51) (52), di conseguenza tale proteina potrebbe risultare una valida lotta allo sviluppo tumorale, evitando la sua proliferazione.

- Riduzione di placche arteriosclerotiche

L'arteriosclerosi consiste nell'indurimento ed ispessimento di alcuni vasi arteriosi dovuto a accumuli lipidici al suo interno. Questo provoca la diminuzione o il blocco totale del flusso ematico in quella zona. Recenti studi hanno evidenziato una riduzione di questi cumuli a seguito di somministrazioni di CRM197 (53), anche se ancora il meccanismo d'azione del CRM197 in questa applicazione non sia ancora ben chiaro.

- Drug delivery

Un altro fattore che rende interessante il CRM197 dal punto di vista terapeutico è la capacità di oltrepassare facilmente la barriera emato-cefalica (BBB, blood brain barrier) Sfruttando tale proprietà, farmaci che prima erano bloccati da questa barriera potrebbero oltrepassarla semplicemente coniugandoli con il CRM197, sviluppando un nuovo metodo di “drug delivery” per la cura di molte malattie neurodegenerative (35).

3. Materiali e metodi

3.1 Ceppi batterici

Per l'espressione della variante della tossina difterica CRM197 sono stati utilizzati i ceppi di *Escherichia coli* BL21AI⁵ e BL21(DE3)⁶. Una caratteristica comune di questi ceppi è la presenza, a livello cromosomale, di una copia del gene codificante per la RNA polimerasi del fago T7 posto sotto il controllo del promotore dell'operone dell'arabinosio (pBAD nel BL21AI) o del promotore dell'operone del lattosio (placUV5 nel BL21(DE3)):

- BL21AI: F⁻ *ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA*
- BL21(DE3): F⁻ *ompT lon hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3)*

3.2 Plasmidi

Per il clonaggio e l'espressione della proteina CRM197 in *Escherichia coli* è stato scelto il plasmide pET9a² in cui il gene di interesse è stato clonato a valle del promotore T7 riconosciuto dalla RNA polimerasi del fago T7 che, in condizioni di induzione, inizia la trascrizione del gene bersaglio. La sequenza genica clonata all'interno del plasmide differisce dalla sequenza di espressione del CRM197 per l'aggiunta di 28 amminoacidi all'N-terminale tra cui una sequenza esaistidinica per facilitare il processo di purificazione. La sintesi chimica ed il clonaggio del gene codificante il CRM197his sono stati effettuati dalla ditta Entelechon GmbH (Germany). Qui di seguito viene riportata la sequenza proteica del'His-CRM197 con il tag istidinico scritto in maiuscolo e sottolineato:

```
MGGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDDDDK gaddvvdssk sfvmenfssy hgtkpgyvds  
iqkgiqkpks gtqgnydddw kefystdnky daagysvzne nplsgkaggv vkvtypgltk  
vlalkvdnae tikkellgsl teplmeqvg eefikrfgdg asrvvlslpf aegsssveyi  
nnweqakals veleinfetr gkrqgdame ymaqacagvr vrrsvgssls cinldwdvir  
dktktkiesl kehgpi knm sespnktvse ekakqyleef hqtalehpel selktvtgtn  
pvfaganyaa wavnvaqvid setadnlekt taalsilpgi gsvmgia dga vhhnteeiva  
qsialsslmv aqaipvl gel vdigfaaynf vesiinlfqv vhnynrpay spghktqpfl  
hdgyavswnt vedsirtgf qgesghdiki taentplpia gvllptipgk ldvnkskthi  
svngrkirmr craidgdvtf crpkspvyvg ngvhanlhva fhrsssekih sneissdsig  
vlgyqktvdh tkvnsklslf feiks
```

⁵ Commercializzato dalla ditta Invitrogen (USA).

⁶ Commercializzato dalla ditta Novagen (Germania).

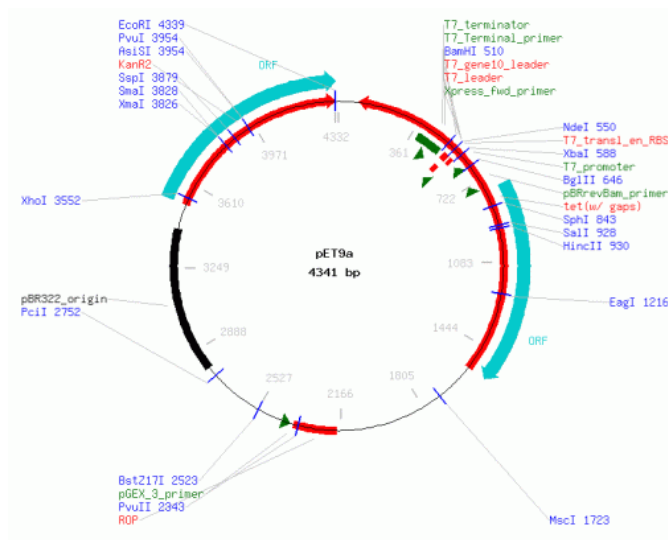


Fig. 3.1: Schema del plasmide pET9a

3.3 Crescita ed espressione⁷

I ceppi di *Escherichia coli*, BL21AI o BL21(DE3), contenenti il plasmide di espressione pET9a-CRM197his sono conservati a -20 °C in presenza di glicerolo 15 %. Ciascun ceppo viene scongelato su piastre Petri con terreno di crescita solido LB⁸ addizionato di kanamicina (0,04 mg/mL) ed incubato a 37 °C overnight. Colonie singole vengono cresciute in 1 mL di LB liquido con kanamicina e lasciate crescere per circa 8 h a 37 °C, quindi viene eseguita una diluizione 1:1000 in 5 mL di terreno fresco e la coltura viene cresciuta overnight a 37 °C. Il mattino seguente, si inoculano (diluizione 1:100) le beute contenenti 150 mL di LB addizionato di kanamicina. Dopo circa 3 h di crescita in agitazione a 37 °C viene effettuata una lettura alla spettrofotometro (OD₆₀₀) per determinare la quantità di cellule presenti nella sospensione batterica e stimare il grado di crescita della coltura. A valori di assorbanza compresi tra 0,5-0,6 viene indotta la produzione di CRM197his aggiungendo arabinosio 13 mM nel caso del ceppo BL21AI, oppure IPTG 1 mM nel caso del ceppo BL21(DE3). Di seguito è riportato uno schema del meccanismo di induzione nel ceppo BL21AI:

⁷ La scelta del ceppo da utilizzare e le condizioni ottimali di crescita ed espressione sono stati argomento di studio di precedenti lavori di Tesi (Ravagli Lorenzo 2009 e Presta Enrica 2010).

⁸ Composto da triptone 10 g/L, estratto di lievito 5 g/L, NaCl 10 g/L e agar 15 g/L.

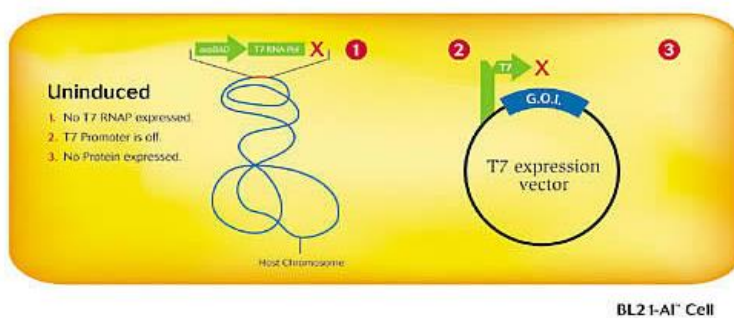


Fig. 3.2 Schema della cellula di *Escherichia coli* BL21AI-pET9a in assenza di induzione

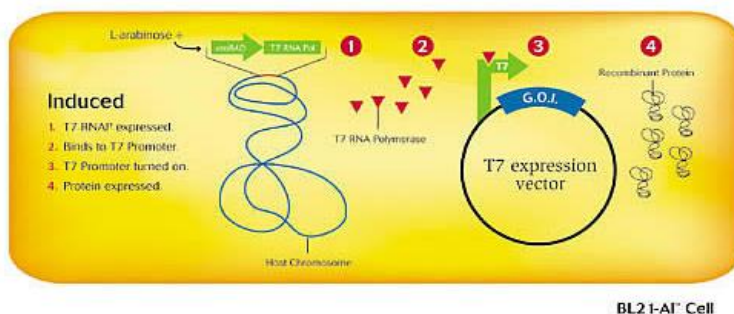


Fig. 3.3. Schema della cellula di *Escherichia coli* BL21AI-pET9a in seguito ad induzione

Trascorso un periodo di induzione di 4 h, le cellule vengono recuperate mediante centrifugazione a 4000g per 30 min a 4 °C (Allegra 21R centrifuge Beckman Coulter) ed i pellet cellulari ottenuti vengono conservati a -20 °C in congelatore.

3.4 Lisi, estrazione e solubilizzazione

I pellet cellulari vengono risospesi completamente nel tampone di Lisi 1⁹ utilizzando l'omogeneizzatore PotterTM per migliorarne la sospensione ed aggiungendo PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) 1 mM come inibitore di proteasi. Il campione viene sottoposto a tre cicli di sonicazione¹⁰ di una durata complessiva di 4 minuti in cui si alternano 15 secondi di pausa e 15 secondi di sonicazione ad una potenza di 18 W. Il campione viene, quindi, lasciato in agitazione in ghiaccio per 1 ora e poi sottoposto a centrifugazione a 10.000g per 30 minuti a 4 °C. Il surnatante, contenente la frazione proteica solubile, viene scartato. Il pellet residuo, contenente la proteina di interesse in forma insolubile, viene risospeso nel tampone di solubilizzazione Lisi 2¹¹, utilizzando nuovamente il PotterTM, e viene lasciato in agitazione per 3 ore a 30 °C. Alla fine dell'agitazione si

⁹ Composto da Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM e Triton X-100 1% W/V, pH 7.5.

⁶ Sonicatore Misonix Sonicator 3000.

¹¹ Composto da Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, urea 6M e Triton X-100 1 % W/V, pH 7.5.

centrifuga il campione a 10.000g a 18 °C per 30 minuti e si recupera il surnatante che contiene la proteina di interesse in forma denaturata. Il volume di Lisi 1 utilizzato durante la fase di lisi è pari ad 1/5 del volume di coltura batterica, mentre il volume di Lisi 2 è pari ad 1/40 del volume di coltura.

3.5 SDS-PAGE

L'SDS-PAGE¹² è una tecnica analitica che permette l'analisi di estratti proteici, separando le proteine tramite elettroforesi in gel di poliacrilammide sulla base della loro massa molecolare. L'SDS è un forte agente denaturante delle proteine in quanto interferisce con le interazioni idrofobiche intramolecolari; inoltre, aggiungendo questo detergente anionico in largo eccesso, è possibile ottenere proteine denaturate tutte cariche negativamente. Altro ruolo fondamentale in questa tecnica è svolto dal gel di poliacrilammide, suddiviso in due parti:

3.5.1 Stacking gel: porzione superiore del gel che ha la funzione di concentrare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutte le proteine comincino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza.

3.5.2 Running gel: parte inferiore del gel ed ha la funzione di separare le proteine in funzione della loro massa molecolare. E' costituito dagli stessi componenti dello stacking gel ma con una quantità variabile di acrilammide per ottenere la porosità desiderata.

Per eseguire la corsa lungo lo stacking gel si applica un potenziale di 80 V per 30', mentre la separazione attraverso il running gel viene effettuata a 120 V per circa 60'. I campioni, prima del caricamento in gel, vengono bolliti per 5' in presenza di una soluzione di sample buffer¹³ e la corsa elettroforetica si considera terminata quanto il colorante del sample buffer ha percorso tutto il gel.

Nel presente lavoro sono stati utilizzati dei gel di acrilammide al 10 % (preparati manualmente di volta in volta) per analizzare i vari campioni ed identificare la proteina di interesse (il CRM197his ha massa molecolare di circa 60 kDa).

Conclusa la corsa elettroforetica, il gel viene colorato per 2 ore in una soluzione di Coomassie Blue R-250¹⁴ in agitazione e, successivamente, viene decolorato con una

¹² Sodium dodecyl sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

¹³ Composto da TrisHCl 250 mM, SDS 10 %, glicerolo 30 %, β-mercaptoetanolo 50 mM, blu di bromofenolo 0.01 %.

¹⁴ Composta da etanolo 40 %, acido acetico 10 %, Coomassie Blue R-250 1 g/L.

soluzione di decolorazione (etanolo 30 %, acido acetico 10 %) per almeno 1 ora in agitazione. Quando risultano visibili le bande proteiche, il gel viene posto in acqua distillata.

3.6 Quantificazione proteica

Per l'analisi quantitativa delle proteine sono state usate due differenti tecniche:

3.6.1 Saggio Bradford (18): analisi spettrofotometrica eseguita a 595 nm. Questo saggio prevede l'utilizzo del reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 come molecola in grado di legare residui aromatici e basici in forma anionica (arginina, triptofano, tirosina e fenilalanina). La quantificazione viene eseguita calcolando una retta di taratura usando come standard diluizioni note della proteina di riferimento (BSA¹⁵ 1 mg/mL). Il reagente Coomassie 5X (Bio-Rad Protein Assay¹⁶) viene diluito opportunamente con acqua in 5 mL di soluzione. Gli standard, preparati in doppio, contengono una frazione variabile di proteina BSA (10, 20 e 30 µg). I campioni vengono preparati in modo analogo (si effettuano sempre in doppio, volume variabile tra i 5 µL e i 50 µL a seconda della concentrazione che ci si aspetta di trovare). Utilizzando la retta di taratura, è possibile determinare la concentrazione proteica del campione incognito dal valore di assorbanza misurato allo spettrofotometro.

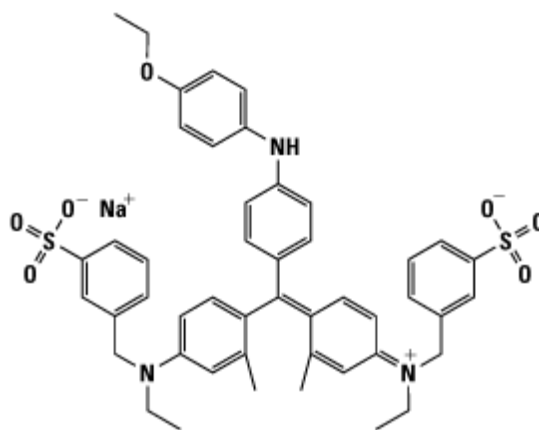


Fig. 3.4 Struttura del Coomassie G-250

¹⁵ Albumina di siero bovino (Sigma-Aldrich).

¹⁶ Commercializzato dalla ditta Bio-Rad.

3.6.2 ImageJ (19): software open source, programmato in JAVA, che nasce con l'obiettivo di emulare le funzionalità dei più comuni software commerciali per l'immagine processing. ImageJ offre la possibilità di calcolare l'area e le statistiche sui valori dei pixel relative a porzioni dell'immagine selezionate dall'utente. Nel nostro caso, una volta eseguita la colorazione e la scansione dei gel di acrilammide, è stata ricavata l'area e l'intensità delle bande contenenti la proteina di interesse per avere una stima della resa del processo in esame.

3.7 Purificazione mediante cromatografia

L'obiettivo di una efficiente purificazione di proteine è l'eliminazione di ogni altra specie contaminante mediante un processo che permetta contemporaneamente di concentrare la proteina di interesse. Generalmente la purificazione di una proteina viene eseguita mediante tecniche cromatografiche. Risulta, quindi, fondamentale scegliere accuratamente il gruppo funzionale della resina costituente la colonna cromatografica: maggiore sarà la specificità di legame, migliore sarà il processo.

Nel caso in esame, questa specificità è assicurata dalla presenza, nella proteina di interesse, di un tag di sei istidine¹⁷ il cui gruppo funzionale caratteristico è un anello di imidazolo. Questo eterociclo aromatico presenta una forte affinità per ioni metallici divalenti. Utilizzando una resina funzionalizzata con un chelante in grado di legare il Nichel, a sua volta in grado di legare le istidine attraverso il gruppo imidazolo, sarà possibile ottenere un'eccellente purificazione. Tale cromatografia viene denominata "cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati" o abbreviata, in inglese, "IMAC" (Immobilized metal ion Affinity Chromatography).

In lavori di Tesi precedenti¹⁸ la cromatografia è stata eseguita utilizzando la colonna commerciale HiTrap Chelating (GE Healthcare); si tratta di una colonna pre-impaccata con una resina a base di agarosio (6%) funzionalizzata con un gruppo chelante formato dall'acido imminodiacetico. Tale chelante tridentato è distanziato dalla resina da una catena di 7 atomi di carbonio, e legato alla resina mediante legame etereo:

¹⁷ Come descritto nel paragrafo 3.2

¹⁸ Longanesi Luca, 2011

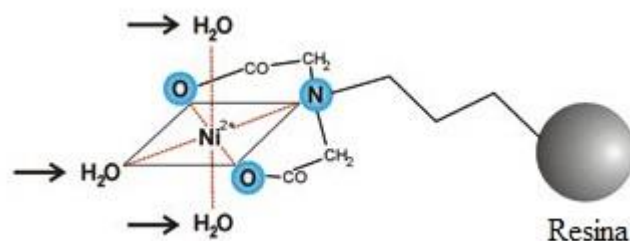


Fig. 3.5 Schema del legame dell'acido imminodiacetico con il Ni^{2+} ; in evidenza le posizioni di legame libere per la proteina (frecce).

I tentativi di purificazione con questa resina non hanno dato i risultati sperati poichè la proteina non si concentrava in un unico picco di eluizione ma veniva eluita lungo tutto il gradiente di eluizione; si è ipotizzato che la proteina instaurasse dei legami aspecifici con la resina stessa, influenzando così l'efficienza di purificazione. Si è, quindi, deciso di confrontare altre due resine di differente tipologia ma caratterizzate dallo stesso gruppo chelante (IDA). Le resine IMAC utilizzate e le loro caratteristiche sono elencate nella Tabella 3.1:

Nome	Produttore	Resina	Granulometria
Protino Ni-IDA	Macherey-Nagel	Silice macroporosa	90 μm
Profinity IMAC	Bio-Rad	UNOsphere*	45-90 μm

Tab 3.1: Resine

*La composizione della resina usata per questa colonna è brevettata e non è nota.

Le cromatografie IMAC eseguite per tentare di purificare il CRM197his si possono distinguere in due differenti tipologie: cromatografia totalmente denaturante oppure cromatografia con “refolding” in colonna (per ottenere la proteina in condizioni native). I primi passaggi sono comuni ad entrambe le procedure e consistono nei lavaggi preliminari della resina con acqua distillata, nella funzionalizzazione e nel condizionamento. Tutte le soluzioni vengono filtrate e degasate; tali passaggi vengono eseguiti a flusso costante pari a 1 mL/min. Di seguito sono descritte le due procedure:

3.7.1 Cromatografia denaturante: la proteina rimane denaturata per tutta la durata della cromatografia mantenendo la concentrazione di urea pari a 6 M in tutte le soluzioni. La colonna, conservata in una soluzione di acqua ed etanolo al 20 %, viene lavata con 4 volumi di colonna con acqua, quindi viene

funzionalizzata facendo passare 5 volumi di colonna di nichel solfato 0.1 M (in questo modo il Ni^{2+} si legherà all'acido imminodiacetico). L'eccesso di nichel viene eliminato eseguendo un lavaggio con 4 volumi di colonna di acqua. Prima di caricare il campione, la colonna viene condizionata con la soluzione in cui è solubilizzata la proteina¹⁹, in modo da ottenere la linea di base per il cromatogramma. Il caricamento del campione viene eseguito con flusso pari a 0.5 mL/min. Terminato il caricamento, la colonna viene lavata con la soluzione di Lisi 2 per rimuovere tutte le proteine non legate al nichel; si termina questo lavaggio quando il cromatogramma è tornato alla linea di base. L'eluizione viene, quindi, effettuata con un gradiente di 5 volumi di colonna aumentando la concentrazione di imidazolo da 0 a 500 mM. Al termine dell'eluizione, la colonna viene lavata con EDTA 50 mM (5 volumi) per eluire tutto il nichel e rimuovere anche l'eventuale proteina non eluita durante il gradiente di imidazolo. Infine, si effettua un lavaggio con acqua (5 volumi, flusso 1 mL/min) per eliminare l'EDTA seguito da un lavaggio con una soluzione di acqua ed etanolo 20 % per conservare la colonna a 4 °C.

3.7.2 Cromatografia con refolding in colonna: abbassando la quantità di urea presente in soluzione gradualmente durante i vari passaggi in colonna è possibile rinaturare la proteina e ripristinare la sua struttura nativa. Il refolding in colonna è una procedura molto efficace frequentemente utilizzata nei protocolli di purificazione di proteine. La colonna viene trattata inizialmente in maniera analoga alla procedura descritta nel paragrafo precedente (lavaggio con acqua, funzionalizzazione, condizionamento). Eseguito il caricamento del campione ed il successivo lavaggio per rimuovere i contaminanti non legati alla resina, vengono introdotti alcuni passaggi necessari per la rinaturazione prima di eseguire l'eluizione. In particolare, il refolding prevede tre diversi stadi: 1) si esegue un primo lavaggio (3 volumi di colonna) in cui si abbassa la concentrazione di urea da 6 M a 4.8 M; 2) si prosegue con un primo gradiente inverso di urea in cui la concentrazione del denaturante viene abbassata da 4.8 M a 2 M (3 volumi di colonna); 3) si termina con un secondo gradiente che porta la concentrazione di urea da 2 M a 0 (5 volumi di colonna). L'eluizione viene, quindi, eseguita con un gradiente di 5 volumi di

¹⁹ Lisi 2

colonna aumentando la concentrazione di imidazolo da 0 a 500 mM (in tampone Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, Triton X-100 1%). Al termine dell'eluizione la colonna viene rigenerata con EDTA 50 mM (5 volumi). Gli ultimi passaggi prevedono un lavaggio con acqua per eliminare l'EDTA e un lavaggio con acqua ed etanolo 20 % per 45 minuti a 1 ml/min. La colonna si conserva a 4 °C.

Aliquote delle frazioni ottenute dalla cromatografia sono state separate in elettroforesi (SDS-PAGE) per visualizzare le bande corrispondenti al CRM197his e valutare il grado di purificazione. Inoltre, la concentrazione proteica delle frazioni più significative è stata determinata mediante saggio Bradford.

Il confronto delle due resine "PROTINO Ni-IDA" e "Profinity IMAC" è stato eseguito utilizzando due diverse tipologie di colonne:

- 1) Un primo screening è stato condotto con colonne contenenti 250 mg di resina, eseguendo i vari passaggi di condizionamento, lavaggio ed eluizione per semplice gravità. Nel caso della resina di silice sono state utilizzate delle colonnine pre-impaccate PROTINO 1000, mentre nel caso della resina polimerica (Profinity) è stato necessario impaccare manualmente delle colonnine con un volume totale di 5 cm³.
- 2) Successivamente sono state utilizzate delle colonne contenenti 2.5 g di resina, collegate all'apparato cromatografico Gradi Frac²⁰ dotato della pompa peristaltica LKB·Pump P₁¹⁷, analizzando il flusso in uscita con lo spettrofotometro LKB Optical Unit UV₁¹⁷ e registrando il cromtogramma con LKB Rec102¹⁷. Le colonne in questo caso sono state impaccate manualmente all'interno di un supporto di 7 cm³.

3.8 Analisi IR della resina Profinity IMAC

Poichè la composizione della resina Profinity IMAC (Bio-Rad) è incognita, si è deciso di sottoporla ad analisi spettroscopica IR per tentare di capire a quale classe polimerica appartenga. Una piccola quantità di resina è stata essiccata prima di preparare le pastiglie di KBr. L'analisi è stata eseguita analizzando lo spettro IR dai 4000 cm⁻¹ ai 400 cm⁻¹ e utilizzando lo spettrofotometro FTIR spectrum 2000²¹.

²⁰ Prodotto dalla ditta Pharmacia Biotech.

²¹ Prodotto dalla ditta Perkin Elmer.

3.9 Dialisi

La dialisi rappresenta una metodica molto utilizzata durante la fase di purificazione di proteine perchè consente di modificare il tampone in cui si trova la soluzione proteica di interesse oltre a permettere anche il refolding di proteine denaturate. In questo caso è stata utilizzata per rimuovere l'imidazolo dalle frazioni eluite dalla colonna cromatografica. Per il processo di dialisi è stata utilizzata una membrana in cellulosa rigenerata Spectrapor (cut-off 12/14 kDa) previamente bollita in acqua ed EDTA 1 mM per 10 min per eliminare il rivestimento di glicerina. La membrana, riempita con le frazioni contenenti il CRM197his eluite dalla colonna, è stata lasciata immersa in una soluzione con Tris 50 mM, NaCl 500 mM e Triton X-100 1% (w/v) per 8 ore a 4 °C in modo da abbattere la concentrazione di imidazolo presente in soluzione e consentire quindi il congelamento e la conservazione della proteina a - 20 °C.

3.10 Saggi di attività DNAsica

I campioni recuperati dalla dialisi sono stati sottoposti ad un saggio di attività DNAsica per capire se la proteina parzialmente purificata possiede una struttura tridimensionale nativa; la presenza di attività biologica, infatti, indica che il processo di purificazione e/o di refolding è avvenuto correttamente.

Il saggio di attività viene eseguito in un volume complessivo di 25 µL con quantità costanti di CRM197his (1 µg), quantità costanti di DNA²² (500 ng) e tampone di reazione contenente Tris-HCl 50 mM pH 7.6, una concentrazione di Ca²⁺ 2,5 mM e di Mg²⁺ di 2,5 mM . I campioni così preparati vengono incubati a 25 °C in un termociclatore TC-3000²³. A diversi tempi (0, 1h, 2h, 3h, 5h) vengono prelevate aliquote al fine di determinare l'efficienza del taglio in relazione al tempo. Infine, le reazioni vengono bloccate aggiungendo EDTA 5 mM. La visualizzazione di tali campioni viene eseguita mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% in presenza di tampone TAE (Tris-HCl 40 mM, acido acetico 40 mM, EDTA 10 mM) utilizzando opportuni marcatori di peso molecolare (DNA Gene Ruler 1 kbp Plus²⁴) e come colorante dei campioni

²² Ottenuto seguendo il protocollo di estrazione del kit QIAGEN® Plasmid Purification Midi da 30 mL di coltura di *Escherichia coli* ceppo TOP10 contenente il plasmide pBAD.

²³ Prodotto dalla ditta Techne (Bibby Scientific).

²⁴ Commercializzato dalla ditta Fermentas (Thermo Scientific).

l'Orange Loading Dye²⁵ 6x. Conclusa la corsa (90 V per circa 60 minuti), il gel viene colorato immergendolo in una soluzione contenente etidio bromuro (0,5 µg/mL) e la rivelazione delle bande è stata eseguita utilizzando il sistema GelDoc (Bio-Rad), costituito da un transilluminatore dotato di 6 lampade UV (312 nm) e da una camera per la cattura dei segnali di fluorescenza emessi dal colorante dopo eccitazione.

²⁵ Commercializzato dalla ditta Fermentas (Thermo Scientific).

4. Risultati sperimentali

4.1 Espressione batterica

Il primo passaggio per la definizione di un valido protocollo di produzione di una proteina di interesse industriale è l'ottimizzazione del processo di crescita batterica e della fase di espressione proteica. A tale scopo sono state eseguite delle prove preliminari per confrontare i diversi ceppi disponibili ed individuare quello più adatta tra:

BL21AI/pET9a-CRM197

BL21AI/pET9a-CRM197His

BL21(DE3)/pET9a-CRM197

BL21(DE3)/pET9a-CRM197His

Le prove sono state condotte incubando le colture batteriche a 37° C in beuta (30mL di terreno) in agitazione. Sono stati effettuati dei prelievi a diversi tempi di induzione per verificare il livello di crescita (misurando l'assorbanza a 600 nm) ed il livello di proteina presente negli strati proteici (mediante analisi SDS-PAGE). Di seguito sono riportate le cinetiche di crescita di entrambi i ceppi BL21AI e BL21(DE3):

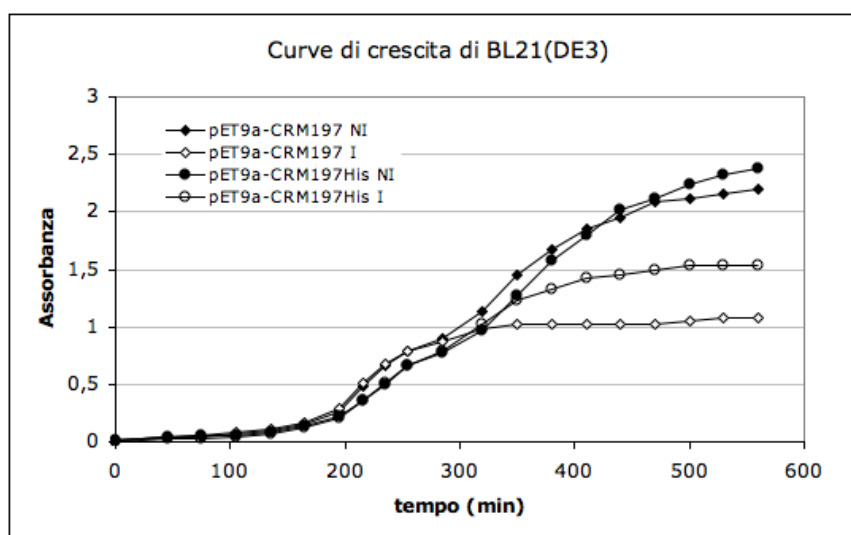


Fig. 4.1 a: Curve di crescita del ceppo BL21(DE3); sono riportate le curve di crescita in presenza (I) o assenza (NI) di induttore (IPTG). I rombi indicano la proteina senza il tag di istidine, i cerchi indicano la proteina dotata di his-tag.

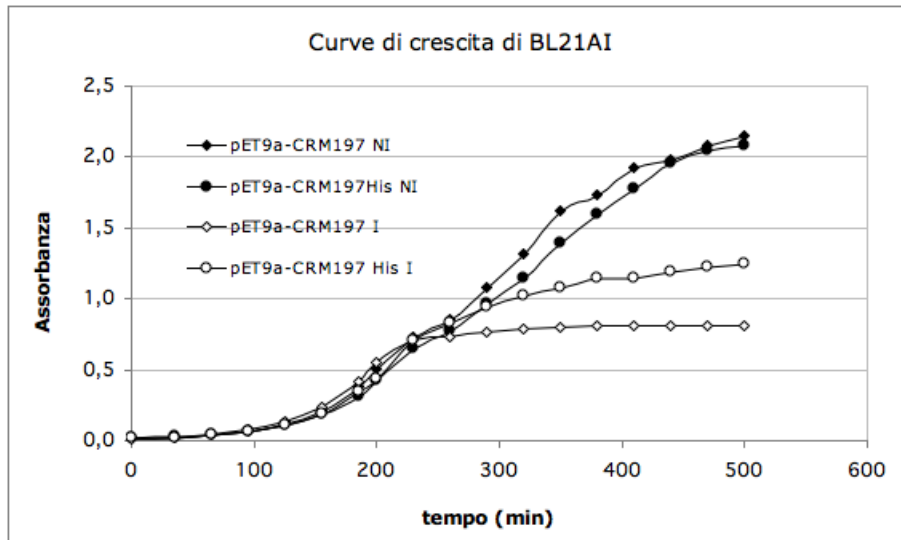


Fig. 4.1 b: Curve di crescita del ceppo BL21AI; sono riportate le curve di crescita in presenza (I) o assenza (NI) di induttore (arabinosio). I rombi indicano la proteina senza il tag di istidine, i cerchi indicano la proteina dotata di his-tag.

Il confronto delle cinetiche di crescita permette di ottenere alcune indicazioni utili:

- 1) l'induzione provoca un rallentamento della crescita, dovuto al consumo energetico per la sintesi proteica;
- 2) i ceppi contenenti il costrutto pET9a-CRM197, in cui la proteina non presenta il tag istidinico, presentano un rallentamento più drastico nella crescita, fino ad un vero e proprio arresto, in seguito ad induzione.

Le prove di espressione hanno, inoltre, evidenziato che l'espressione della proteina avviene solo in presenza del tag istidinico presente all'estremità N-terminale, mentre la proteina nativa, come si può vedere in Fig. 4.2, non viene prodotta dal batterio. Questo mancato accumulo potrebbe essere dovuto ad un'azione tossica della proteina nei confronti del batterio, oppure ad una degradazione mediata da proteasi batteriche.

Di conseguenza, i ceppi BL21AI/pET9a-CRM197 e BL21(DE3)/pET9a-CRM197 non sono stati più utilizzati negli esperimenti successivi.

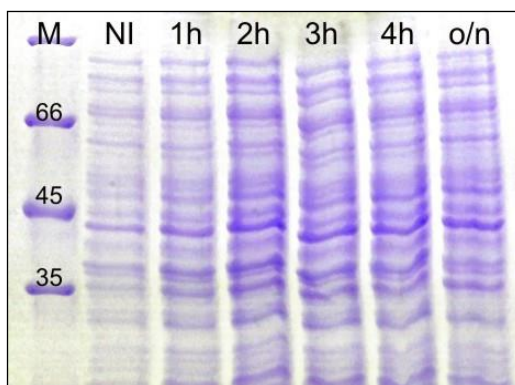


Fig. 4.2: prova di espressione del CRM197 senza His-tag; i tempi indicati rappresentano la durata dell'induzione (o/n: overnight; NI: campione non indotto).

Le prove di espressione della proteina dotata del tag istidinico hanno, invece, evidenziato un accumulo elevato durante la fase di induzione, come visibile in gel analizzando gli estratti proteici totali (Fig. 4.3). Infatti, risulta ben visibile la banda corrispondente al CRM197His (massa molecolare 60 kDa), al di sotto del marcatore di massa pari a 66 kDa:

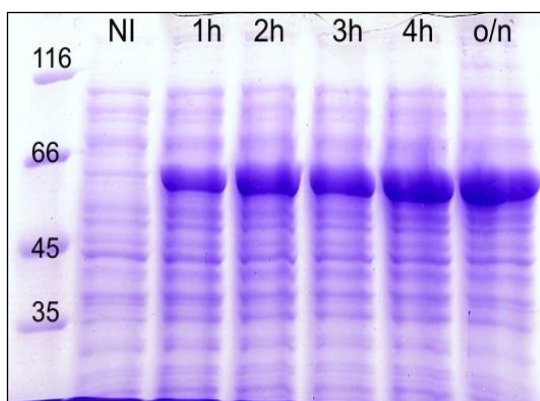


Fig. 4.3: prova di espressione del CRM197His-tag; i tempi indicati rappresentano la durata dell'induzione (o/n: overnight; NI: campione non indotto).

Alla fine di questa fase, si è deciso di proseguire lo studio utilizzando solo il ceppo BL21AI/pET9a-CRM197His, basato sul sistema di espressione-regolazione controllato dall'arabinosio (induttore gratuito). Prove successive hanno permesso di determinare la localizzazione della proteina nella frazione cellulare insolubile (Fig. 4.4), probabilmente all'interno di aggregati insolubili che si formano a causa dell'elevata idrofobicità del dominio B. Il recupero della proteina di interesse può essere eseguito solubilizzando tali aggregati con agenti denaturanti, come urea 6M.

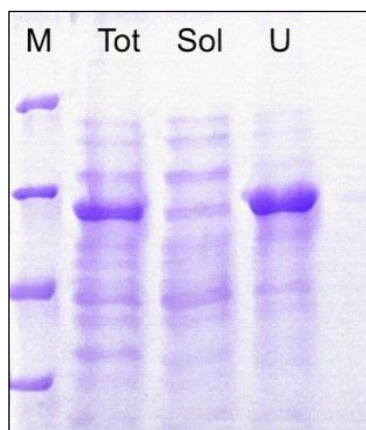


Fig. 4.4: prova di localizzazione del CRM197His. Corsia M: marcato di peso molecolare; corsia Tot: estratto proteico totale; corsia Sol: estratto proteico solubile; corsia U: estratto proteico solubilizzato in condizioni denaturanti (urea 6M)

4.2 Lisi cellulare ed estrazione

In un precedente lavoro di tesi è stato messo a punto un protocollo per l'estrazione proteica, basato sull'utilizzo del sonicatore per lisare le cellule batteriche recuperate mediante centrifugazione. Tale procedura prevede la crescita di 300 mL di coltura batterica ed un'induzione di 4 h per accumulare una quantità di proteina sufficiente per ogni ciclo di purificazione. La composizione ed i volumi delle soluzioni di estrazione e di lisi cellulare da utilizzare sono descritti nella sezione dei materiali e metodi. Fondamentale è l'utilizzo di urea 6M come agente denaturante per solubilizzare il CRM197His estratto dalle cellule. La proteina così ottenuta è in forma denaturata e solubile, adatta ad essere sottoposta alla cromatografia per affinità (primo passaggio di purificazione).

4.3 Purificazione estratto proteico

La presenza del tag istidinico nella struttura primaria della proteina fa sì che il primo passaggio di purificazione più conveniente sia la cromatografia di affinità. Studi precedenti sono stati eseguiti utilizzando una colonna cromatografica contenente una resina di agarosio funzionalizzata con acido imminodiacetico. Tali studi hanno portato alla conclusione che la proteina formasse dei legami aspecifici con la resina stessa poiché solo parte della proteina veniva eluita dalla colonna, questo portava, quindi, ad un

abbassamento della resa del processo e ad un rapido deterioramento della resina che richiedeva numerosi cicli di rigenerazione.

Si è deciso, perciò, di confrontare diversi tipi di resine per verificare l'ipotesi dei legami aspecifici resina-proteina e per identificare la resina più idonea alla purificazione del CRM197His. Come si può vedere nel paragrafo 3.7 le resine scelte come alternativa sono di diversa natura, una resina a base di silice microporosa e una resina polimerica artificiale. Con entrambe le resine sono state eseguite inizialmente delle cromatografie per gravità e, successivamente, delle cromatografie liquide su colonna in pressione, sfruttando una pompa peristaltica. Quest'ultima procedura è stata sfruttata anche per eseguire il refolding della proteina in colonna, ovvero per ridurre gradualmente la concentrazione di urea e riportare la proteina nella sua struttura nativa.

4.3.1 Cromatografia per gravità

Studi approfonditi di cromatografia su colonna per gravità sono stati eseguiti con la resina a base di silice microporosa Protino Ni-IDA. La preparazione del campione da separare in colonna è descritta nei paragrafi 3.3 e 3.4. In particolare, gli aggregati insolubili ottenuti da 200 mL di coltura cellulare, sono stati solubilizzati con 5 mL di tampone di lisi contenente urea 6 M. Le prove descritte di seguito, quindi, sono state eseguite mantenendo il CRM197His in condizioni denaturanti.

Le colonne Protino Ni-IDA 1000 sono colonne impaccate con 250 mg di resina, in grado di legare 5 mg di proteina His tag. (capacità di legame 20mgP/g di resina) Ad ogni ciclo di cromatografia sono stati caricati in colonna 6-6,5 mg di proteina totale (quantificazione eseguita con il saggio Bradford).

Di seguito sono riportati i vari passaggi per ciascuna separazione cromatografica:

- Lavaggio della colonna (10 mL di acqua)
- Caricamento del Ni²⁺ (5 mL di NiSO₄ 0,1 M)
- Lavaggio dell'eccesso di Ni²⁺ (5 mL di acqua)
- Condizionamento della colonna (5 mL)
- Caricamento del campione Si prelevano i campioni Pre e FT
- Lavaggio della colonna (2 mL di Lisi2) Prelievo del campione Wash₁
- Lavaggio della colonna (2 mL di Lisi2) Prelievo del campione Wash₂
- Eluizione (1 mL di soluzione Eluizione1²⁶) Prelievo del campione E₁

²⁶ Composizione identica alla Lisi2 ma con una concentrazione di Imidazolo pari a 250mM

- Eluizione (1 mL di soluzione Eluizione1) Prelievo del campione E₂
- Eluizione (1 mL di soluzione Eluizione1²⁷) Prelievo del campione E₃
- Lavaggio (stripping) con 1 mL di EDTA 50 mM Prelievo del campione EDTA₁
- Secondo lavaggio con EDTA 50 mM Prelievo del campione EDTA₂

La prova eseguita attenendosi a questo protocollo ha fornito i seguenti risultati:

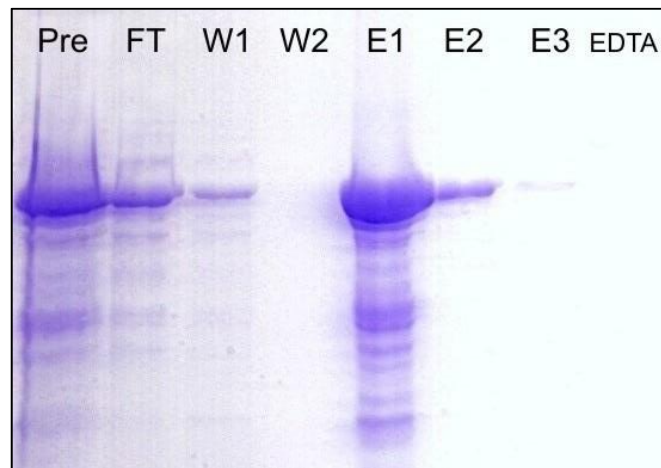


Fig. 4.5: SDS-PAGE ottenuta dalla cromatografia in colonna con flusso per gravità

I campioni prelevati da questa prova vengono quantificati tramite il saggio Bradford

Prova	Proteina caricata (PRE)	FT		E1		E2		Rec
		mg	%	mg	%	mg	%	%
1° ciclo	6,7	2,6	39	3,04	45	0,22	3	48

Tab 4.1: Quantificazione Bradford dei campioni ottenuti mediante cromatografie in colonna (resina Protino-IDA)

Da questa prima prova si può osservare che la resa di purificazione è elevata (48 %), anche se la proteina risulta ancora contaminata da altre proteine indesiderate.

Si nota, inoltre, che la quantità di proteina presente nel campione FT (flow trough), ovvero la quantità di proteina che non si lega affatto alla colonna, rappresenta una elevata percentuale rispetto al totale. Poiché il CRM197His è predominante in questa frazione, si è deciso di ricaricare il campione FT in un nuovo ciclo cromatografico per valutare se la proteina fosse incapace di legarsi alla colonna.

²⁷ Composizione identica alla Lisi2 ma con una concentrazione di Imidazolo pari a 500mM

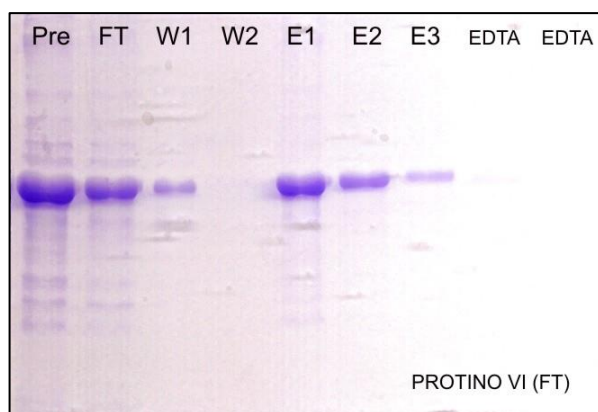


Fig. 4.6: Prova di ri-caricamento: il campione FT è stato caricato nuovamente in colonna.

Le quantificazioni del contenuto di proteina nei vari campioni è riportata in tabella:

Prova	Proteina caricata (PRE)	FT		E1		E2		Rec
		mg	%	mg	%	mg	%	%
2° ciclo	2,3	0,35	15	0,4	17	/	/	17

Tab. 4.2: quantificazione mediante Bradford dei campioni ottenuti ricaricando il FT

I risultati ottenuti evidenziano come la proteina non riesca a legarsi completamente alla resina durante un unico ciclo di purificazione. Quando si ricarica il FT in colonna, una parte del CRM197His è in grado di legarsi nuovamente alla resina, anche se in percentuale tale (17 %) da rendere un secondo passaggio in colonna non vantaggioso. La presenza di proteina nel campione FT potrebbe, quindi, essere dovuta a diverse cause: ad un problema di disponibilità del tag istidinico, ad un'eccessiva grandezza dei pori della resina, o ad un debole legame nichel-resina che porta all'eluizione di una parte del metallo durante la fase di condizionamento. Si è deciso, quindi, di analizzare l'influenza del volume di condizionamento sulla resa della cromatografia, passando da 5 a 2 mL.

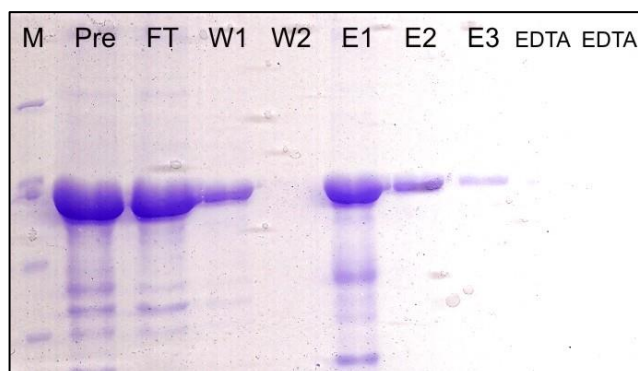


Fig. 4.7: SDS-PAGE dei campioni (volume di condizionamento di 2 mL)

L'analisi dei campioni separati in gel non mostra rilevanti variazioni rispetto alla metodica precedente. Tuttavia, la banda corrispondente al FT è abbondante e la resa finale (32 %) cala rispetto al processo che prevede un condizionamento con 5 mL di soluzione

Prova	Proteina caricata (PRE)	FT		E1		E2		Rec
		mg	%	mg	%	mg	%	%
1° ciclo	5,3	2,4	45	1,5	28	0,25	4,7	33

Tab. 4.3: quantificazione mediante Bradford dei campioni ottenuti dalla cromatografia (volume di condizionamento della colonna pari a 2 mL)

Si può concludere, quindi, che il volume di condizionamento influenza la capacità della resina di legare il CRM197His abbassando la resa del processo. Non si può, in ogni caso, escludere che la presenza di proteina nel FT possa dipendere anche dalla proteina stessa (ad esempio a causa del mascheramento del tag istidinico) o dall'impaccamento della colonna.

A tale scopo, è stato deciso di effettuare un confronto con altre due resine disponibili in commercio, una resina polimerica (Profinity IMAC) e la resina a base di agarosio (HiTrap Chelating). E' stata seguita la stessa procedura utilizzata con la resina a base di silice Protino Ni-IDA, caricando 6,7 mg di proteina in ciascuna colonna (campione PRE). Di seguito sono riportati i risultati ottenuti (Fig. 4.7 e tabella 4.4.):

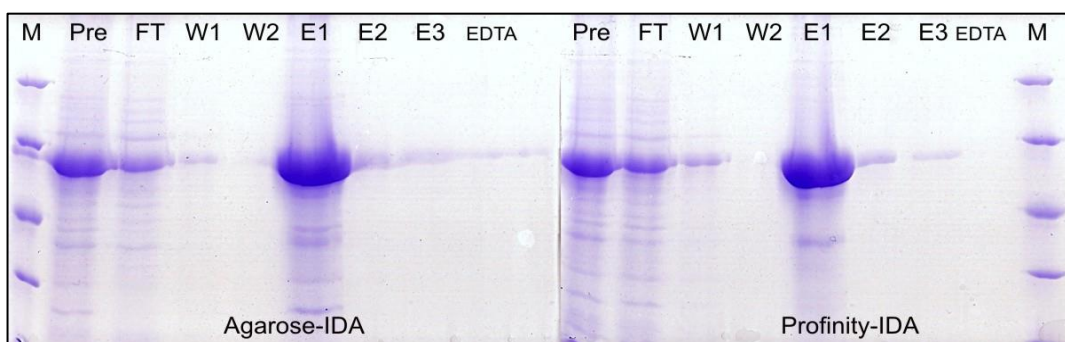


Fig. 4.8: SDS-PAGE dei campioni ottenuti mediante cromatografia con resina di agarosio (a sinistra) e con la resina polimerica (a destra).

Resina	Proteina caricata (PRE)	FT		E1		E2		Rec
		mg	%	mg	%	mg	%	%
Agarose-IDA	6,7	2,26	34	3,2	48	0,1	1	49
Profinity-IMAC	6,7	3,7	55	2,7	40	0,1	1	41

Tab. 4.4: Quantificazione Bradford dei campioni ottenuti mediante cromatografie in colonna (resina Agarose-IDA e Profinity-IMAC)

I valori ottenuti in queste due prove sono paragonabili alle rese ottenute con la resina a base di silice Protino Ni-IDA (ca 48 %), di conseguenza si può ipotizzare che il processo cromatografico eseguito per gravità in condizioni denaturanti non sia particolarmente influenzato dal tipo di resina utilizzata per la purificazione della proteina di interesse.

E' stata eseguita anche una prova utilizzando un campione di caricamento (7,6 mg di proteina totale) diluito in un volume di 7,5 mL (invece di 1,5 – 2 mL). In questo modo si può osservare l'influenza della concentrazione proteica (1 mg/mL) sulla resa di purificazione. Di seguito sono riportati i risultati:.

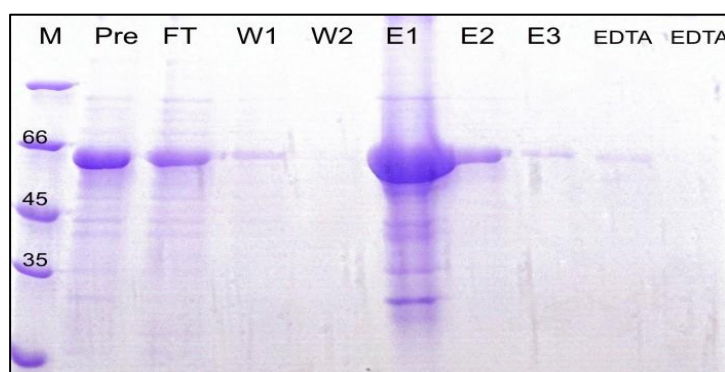


Fig. 4.9: SDS-PAGE dei campioni ottenuti mediante cromatografia in colonna Protini Ni-IDA. Volume di campione (PRE) pari a 7,5 mL

Il contenuto proteico delle varie frazioni (quantificazione mediante Bradford) e la resa finale sono visibili in tabella:

Prova	Proteina caricata (PRE)	FT		E1		E2	Rec	
		mg	%	mg	%	mg	%	%
1° ciclo	7,6	3,7	49	3,1	41	0,15	2	43

Tab. 4.5: Quantificazione Bradford dei campioni ottenuti mediante cromatografia in colonna. Volume di campione (PRE) pari a 7,5 mL

I valori ottenuti (resa pari al 43%) non differiscono con i risultati ottenuti in precedenza evidenziando che anche questo parametro non influenza la resa del processo. Questo permette di operare con elevata libertà, utilizzando campioni proteici più o meno concentrati a seconda dei casi.

In definitiva, si può affermare che nessuna delle condizioni analizzate e dei cambiamenti apportati, permette di evitare la perdita di una parte di CRM198His, garantendo al massimo recuperi pari al 45-48 %. Anche la possibilità di ricaricare il campione FT una seconda volta in colonna non risulta particolarmente conveniente.

Considerando, comunque, che le rese ottenute sono promettenti, sono state eseguite 5 prove consecutive con la stessa colonna mantenendo invariato il protocollo e senza rigenerare la resina al fine di valutare la riproducibilità del processo e la stabilità della resina stessa.

In figura 4.9 sono riportati i gel corrispondenti alle 5 purificazioni, eseguite utilizzando 5 diverse preparazioni proteiche e caricando la stessa quantità di proteina ad ogni ciclo di purificazione (6,7 mg totali). Il contenuto proteico dei vari campioni prelevati durante le fasi di purificazione è stato determinato con la metodica Bradford (valori riportati in Tabella 4.6) per calcolare il recupero finale di ogni ciclo.

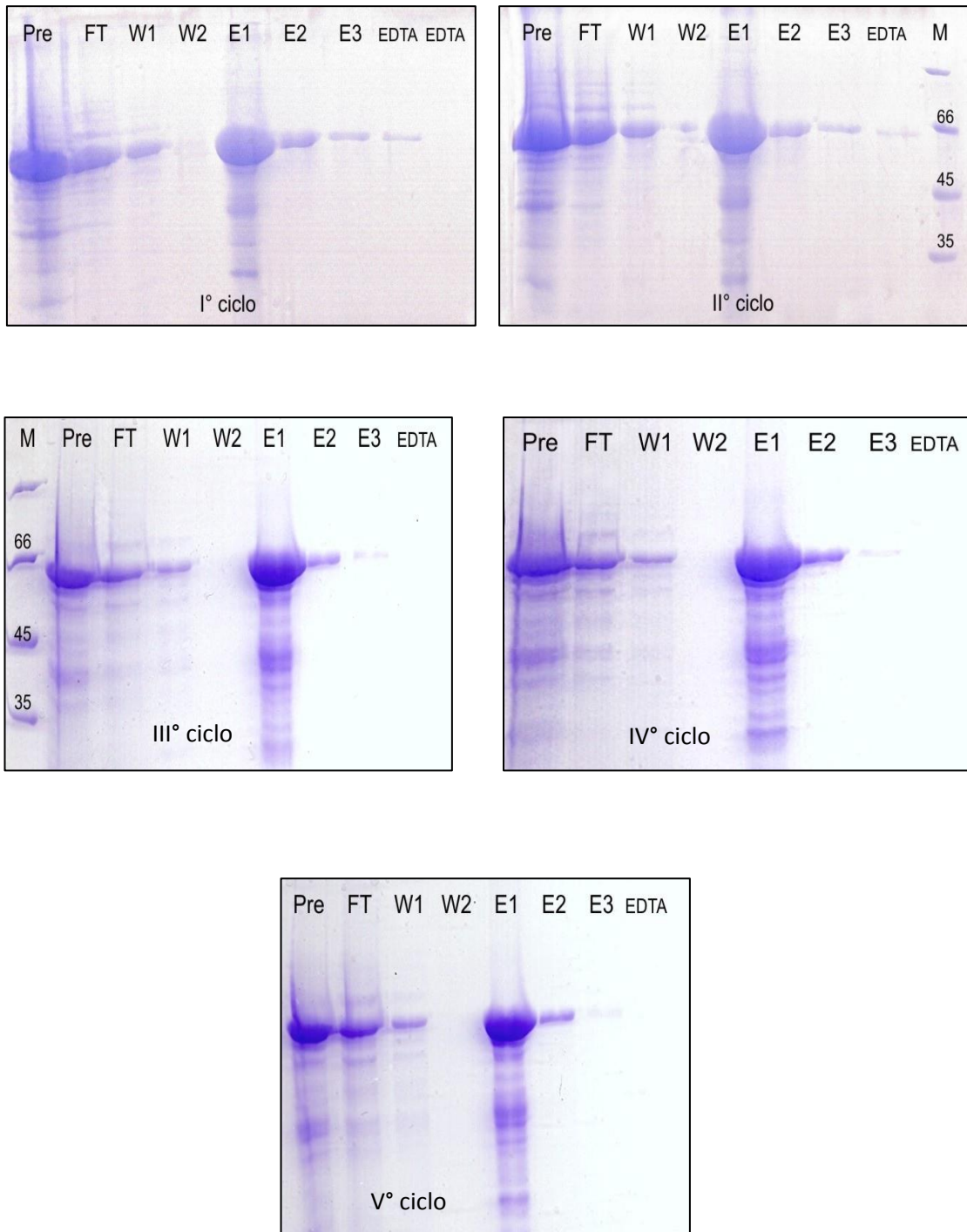


Fig. 4.10: prova di longevità della colonna Protino Ni-IDA.

Prova	Proteina caricata (PRE)	FT		E1		E2		Rec
	mg	mg	%	mg	%	mg	%	%
1	6,74	2,8	42	2,5	37	0,3	4	42
2	6,74	2,5	37	2,8	41	0,3	4	46
3	6,74	2,6	39	3,0	45	0,2	3	47
4	6,74	2,3	34	2,9	43	0,2	3	46
5	6,74	2,61	38	2,8	41	0,2	3	45

Tab. 4.6: Quantificazione Bradford dei vari campioni (5 cicli di purificazione).

Come si può osservare dai valori delle rese ottenuti nei cinque cicli consecutivi, la colonna non sembra subire alcun peggioramento né perdere capacità di legame (le rese ottenute sono simili fra di loro, tra il 41 e il 48 %).

In conclusione, le prove di purificazione parziale mediante cromatografia su colonna per gravità presentano una resa di purificazione pari al 45 %, valore che può essere considerato un buon risultato, dal momento che la resa è scarsamente influenzata da vari fattori, quali concentrazione del campione ed il tipo di matrice utilizzata. Tuttavia, l'analisi dei campioni separati in SDS-PAGE indica uno scarso grado di purificazione probabilmente dovuto alla impossibilità di effettuare l'eluizione mediante un gradiente lineare di imidazolo. Per tale motivo, le prove successive sono state eseguite in colonna a bassa pressione.

4.3.2 Cromatografia in pressione in condizioni denaturante

Le colonne cromatografiche usate durante questo studio di purificazione sono colonne impaccate con 2,5 g di resina. In questi esperimenti è stato seguito un protocollo del tutto simile a quello usato per la purificazione su colonna per gravità, modificando semplicemente i volumi nei vari passaggi. L'apparato cromatografico, GradiFrac (Pharmacia Biotech), era dotato di una pompa peristaltica P-1.

Di seguito sono riportati le fasi di ogni separazione cromatografica, indicando i volumi ed i flussi teorici:

- Lavaggio della colonna (50 mL di acqua con un flusso di 1 mL/min)
- Caricamento del Ni²⁺ (25 mL di NiSO₄ 0,1 M con un flusso di 1 mL/min)

- Lavaggio dell'eccesso di Ni²⁺ (25 mL di acqua al flusso di 1 mL/min)
- Condizionamento della colonna (50 mL con un flusso di 1 mL/min)
- Caricamento del campione con un flusso di 0,5 mL/min
- Lavaggio delle proteine non legate (15 mL di Lisi2 al flusso di 1 mL/min)
- Eluizione della proteina con un gradiente di Imidazzolo da 0 M a 500 mM (25 mL al flusso di 1 mL/min)
- Lavaggio (*stripping*) della colonna con una soluzione di EDTA 50mM.

I campioni da purificare sono stati preparati secondo le metodiche descritte nei paragrafi 3.3 e 3.4. In dettaglio, gli aggregati insolubili ottenuti da 300 mL di colturale batterica sono stati risospesi in 7,5 mL di soluzione di Lisi contenente urea 6 M. Il campione da caricare in colonna (PRE) è stato quantificato mediante saggio Bradford (quantità di proteina estratta compresa tra 30-38 mg)

In precedenti lavori di tesi, per purificare il CRM197His, la cromatografia di affinità a cationi divalenti era stata effettuata con la colonna “HiTrap Chelating” (GE-Healthcare) impaccata con una resina di agarosio e funzionalizzata con l'acido imminodiacetico. Queste prove rappresentano il punto di partenza del corrente lavoro, e di seguito sono riportati i risultati ottenuti (gel SDS-PAGE e determinazione Bradford):

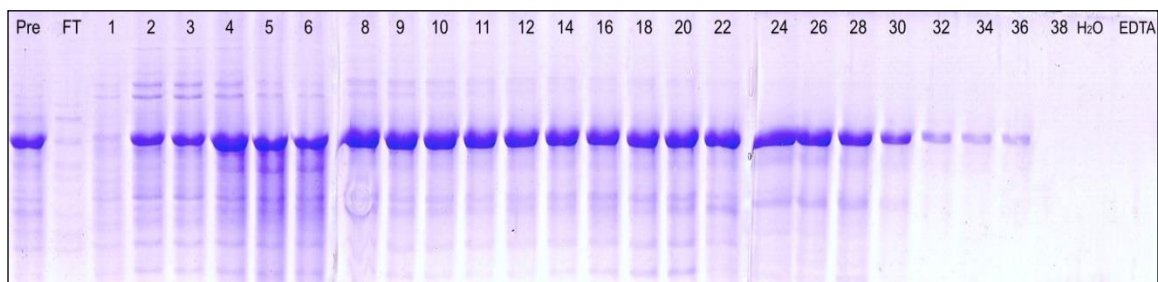


Fig. 4.11: SDS-PAGE delle frazioni ottenute dalla cromatografia con la colonna HiTrap-Chelating.

Come si osserva dal gel, il CRM197His era praticamente assente nel campione corrispondente al FT, mentre era visibile in tutte le frazione eluite dalla colonna (gradiente di imidazolo 0-500 mM). Le frazioni 2-30 erano state riunite per formare un unico pool proteico, poi quantificato:

RESINA	Proteina caricata (PRE)	Eluizione	Rec
		mg	%
HiTrap Chelating	38 mg	18,5	49

Tab. 4.7: Quantificazione Bradford del pool ottenuto dalla cromatografia di affinità in condizioni denaturanti (colonna HiTrap Chelating)

Questa metodica di purificazione, una volta ottimizzata, permetteva di recuperare nell'eluato quasi il 50 % della proteina di partenza. Tuttavia, come visibile in gel, il CRM197His non veniva eluito in poche frazioni concentrate, ma risultava diluito lungo tutto il gradiente di eluizione. Per spiegare tale risultato è stata ipotizzata l'esistenza di interazioni aspecifiche tra il CRM197His ed altri contaminanti ed, eventualmente, tra la proteina e la resina stessa. Di conseguenza, nonostante la resa elevata, tale passaggio deve essere migliorato per favorire anche i successivi passaggi di purificazione.

Si è deciso, quindi, di analizzare l'efficacia delle due resine già utilizzate nelle prove di purificazione per gravità. Mediante la procedura per pressione, è possibile, infatti, introdurre un gradiente di eluizione che dovrebbe, in linea teorica, migliorare la purificazione.

La prima prova è stata eseguita con una colonna cromatografica impaccata con la resina Protino Ni-IDA (a base di silice); i risultati relativi alla separazione delle frazioni in gel, alla quantificazione proteica ed al profilo cromatografico sono riportati in figura 4.11, in Tabella 4.8 e nella Tavola 4.1:

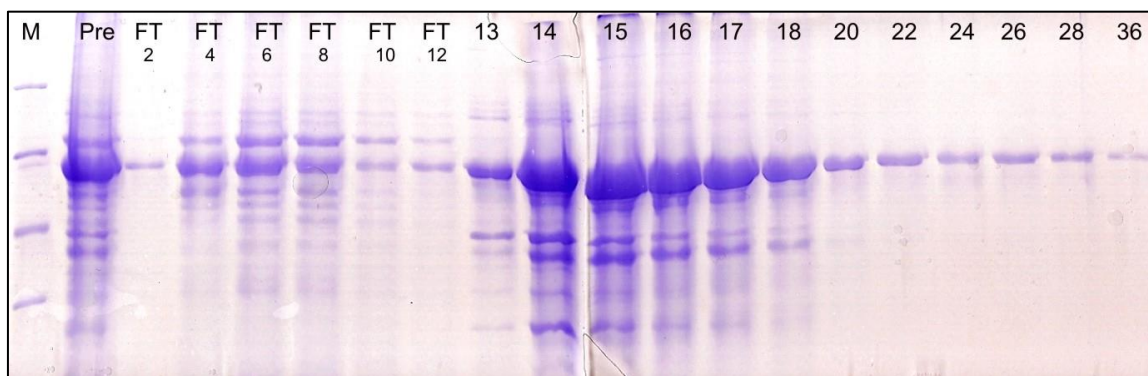


Fig. 4.12: SDS-PAGE delle frazioni ottenute in cromatografia di affinità con resina protino Ni-IDA in condizioni denaturanti.

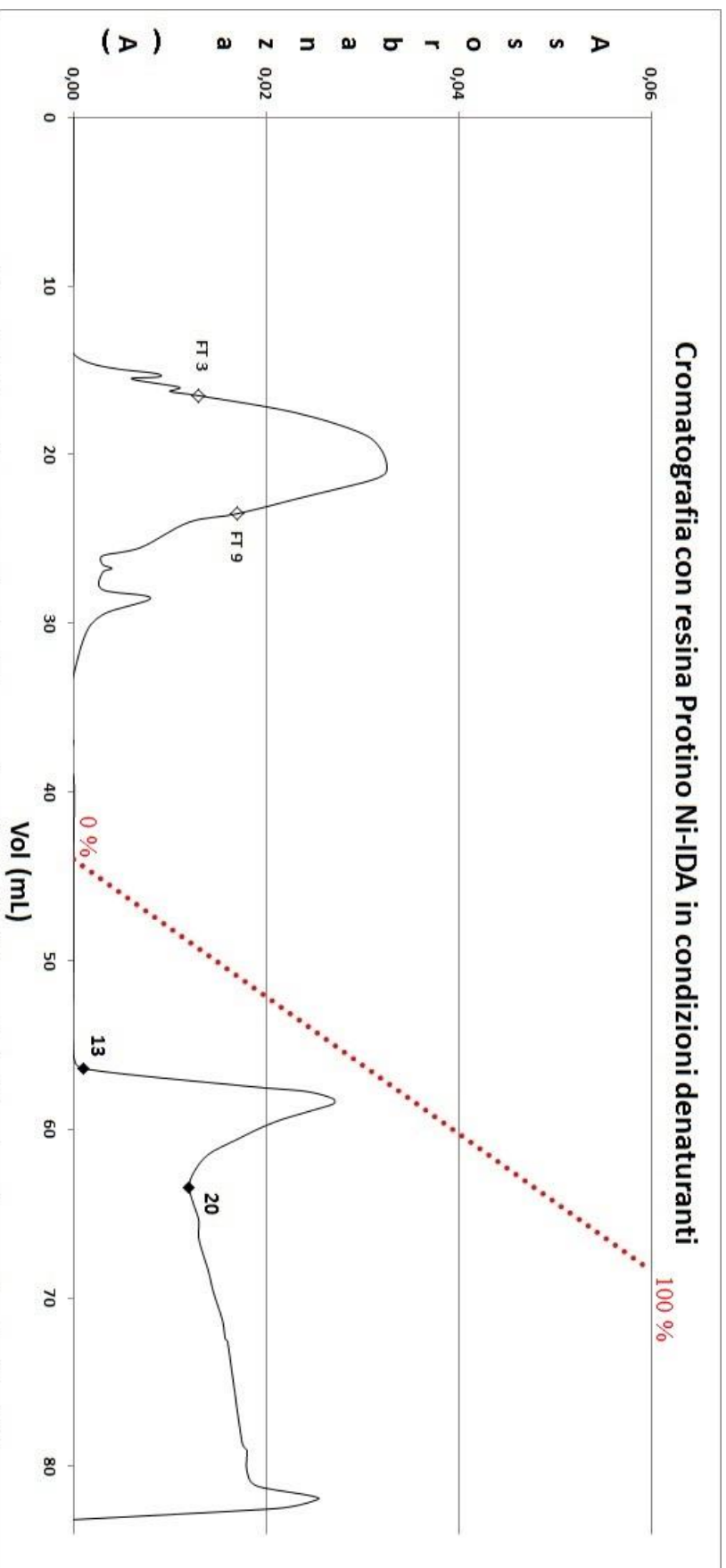
Le frazioni 3-9 del FT e le frazioni 13-20 corrispondenti all'eluizione con imidazolo sono stati riunite in due pool distinti per poterne eseguire la quantificazione Bradford.

Prova	Proteina caricata (PRE)	FT		Eluizione	Rec
		mg	%	mg	%
Protino Ni-IDA	24,5	8,9	36	13,3	54

Tab. 4.8: Quantificazione Bradford dei pool ottenuti dalla cromatografia su colonna a bassa pressione in condizioni denaturanti (resina Protino Ni-IDA)

Rispetto alle prove effettuate per gravità, si possono notare alcuni miglioramenti: 1) il CRM197His è meno abbondante nella frazione corrispondente al FT; 2) l'eluizione è concentrata in poche frazioni (circa 6-7) ed avviene ad una concentrazione di imidazolo pari a 250-270 mM; 3) la resa del processo migliora (54 %).

Tuttavia, l'aggiunta del gradiente di eluizione con imidazolo non sembra migliorare visibilmente il livello di purificazione. Rispetto ai risultati ottenuti in precedenza con la colonna HiTrap Chelating a base di agarosio, la principale differenza consiste nella concentrazione del campione in poche frazioni. Considerando, inoltre, il bilancio di massa, si può affermare che non si verificano problemi di interazione tra il CRM197His e la resina, dato che non rimane nulla legato in colonna alla fine del processo. Lo svantaggio principale di questa resina è, invece, lo scarso livello di purificazione che si ottiene: nelle frazioni in cui il CRM197His viene eluito dalla colonna sono, infatti, visibili in gel SDS-PAGE numerose proteine contaminanti.



Tav. 4.1: Cromatogramma ottenuto dalla cromatografia di affinità in condizioni denaturanti con resina Protino-IDA

E' stata, in seguito, effettuata un'altra prova di purificazione in condizioni denaturanti con la resina Profinity-IMAC, già utilizzata nelle prove per gravità. Il protocollo di purificazione e tutti i passaggi sono stati mantenuti invariati per poter eseguire un confronto con la resina precedente.

I risultati sono riportati in figura 4.12, in Tabella 4.9 e nella Tavola 4.2:

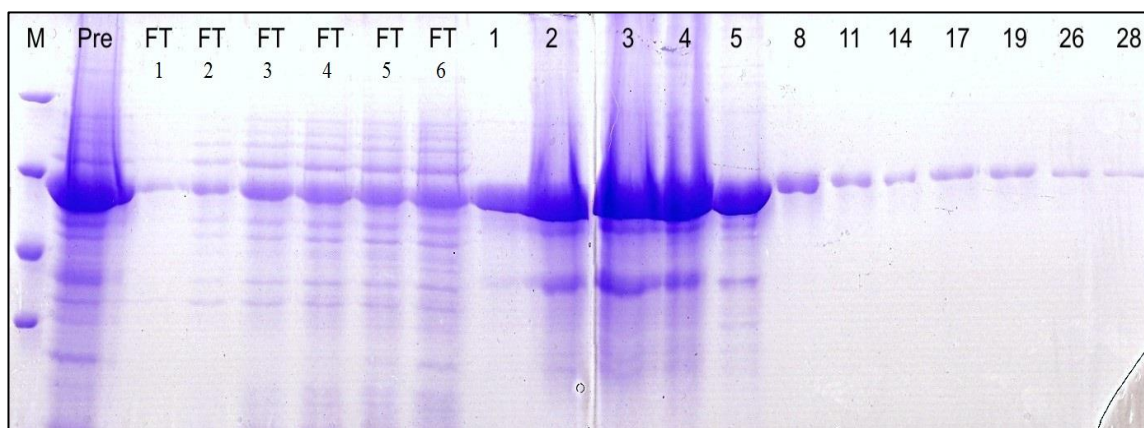


Fig. 4.13: SDS-PAGE delle frazioni ottenute in cromatografia di affinità a bassa pressione con la resina polimerica (Profinity-IMAC), in condizioni denaturanti.

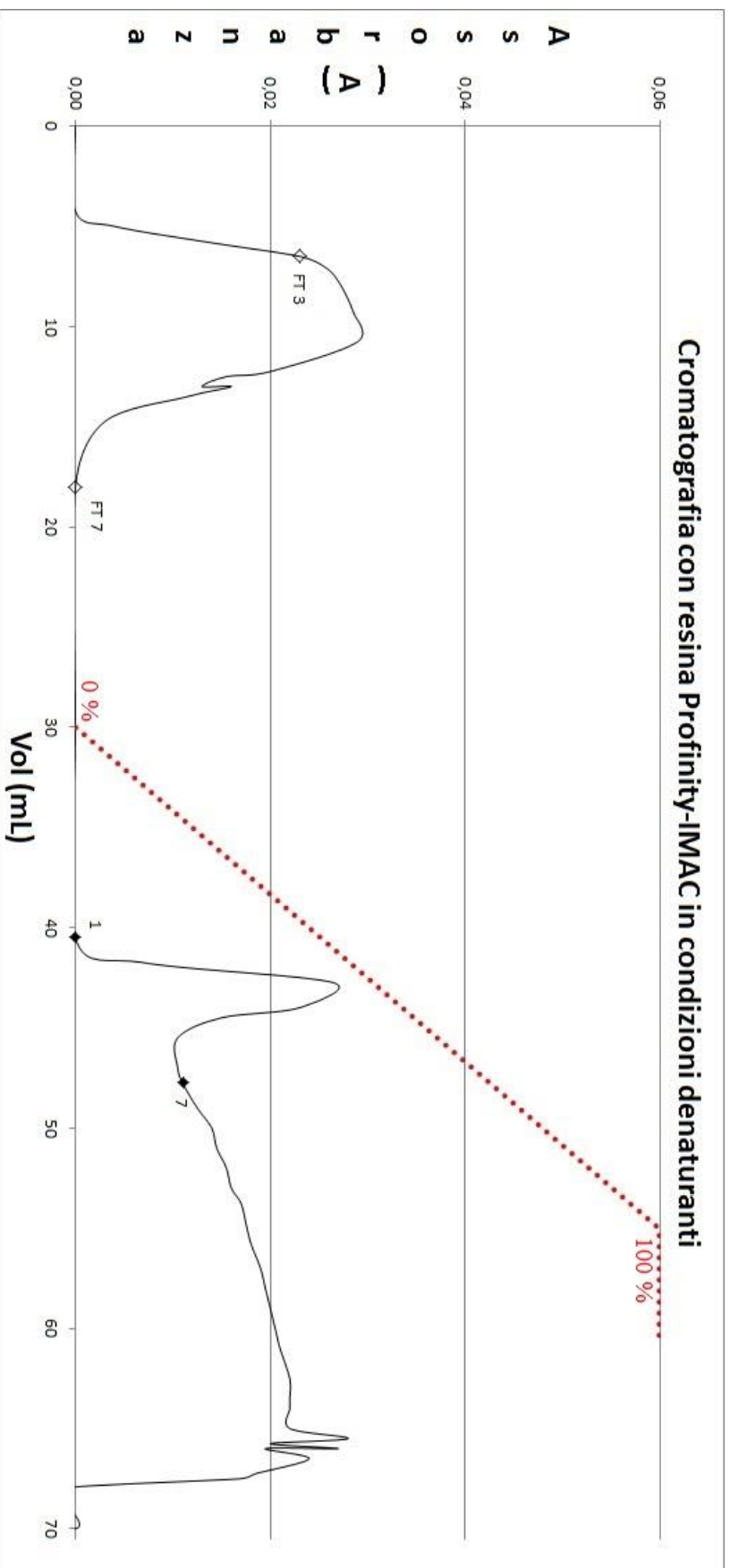
Le frazioni 3-6 corrispondenti al FT e le frazioni 1-7 corrispondenti all'eluizione sono state riunite in due campioni separati per eseguire la quantificazione mediante Bradford.

Prova	Proteina caricata (PRE)	FT		Eluizione	Rec
		mg	%	mg	%
Profinity-IMAC	33,3	7	21	18,3	55

Tab. 4.9: Quantificazione Bradford dei pool ottenuti dalla cromatografia su colonna con la resina Profinity-IMAC

I risultati ottenuti con questa resina sono paragonali ai precedenti: si ottiene una resa elevata (55 %), tuttavia il livello di purificazione rimane ridotto rendendo necessari ulteriori cicli di purificazione.

In conclusione, la resina polimerica e la resina a base di silice rappresentano una matrice adatta per la purificazione parziale del CRM197His in condizioni denaturanti; rispetto alla resina a base di agarosio migliorano la fase di eluizione, aumentando leggermente il recupero finale.



TAV. 4.2: Cromatogramma ottenuto dalla cromatografia per affinità in condizioni denaturanti con resina Profinity-IMAC

Una volta eseguite le prove di purificazione della proteina CRM197His in condizioni denaturanti confrontando tre diverse resine, si è deciso di proseguire lo studio effettuando la fase di refolding proteico durante la purificazione in colonna. Tale procedura permette di ottenere la proteina di interesse nella forma nativa e, quindi, biologicamente attiva.

4.3.3 Cromatografia in pressione con refolding proteico

Nelle cromatografie riportate finora, la proteina è stata mantenuta nello stato denaturato a causa della presenza di urea 6 M. La procedura cromatografica con refolding, spiegata nel paragrafo 3.7.2, si differenzia dalle precedenti per l'aggiunta di due passaggi denominati "gradiente inverso" I e II, durante i quali si diminuisce gradatamente la concentrazione dell' urea da 6 M a 0.

In precedenti lavori di tesi, i tentativi di refolding del CRM197 erano stati eseguiti mediante cromatografia di affinità a cationi divalenti con la colonna "HiTrap Chelating" (GE-Healthcare), impaccata con una resina di agarosio e funzionalizzata con l'acido imminodiacetico. Di seguito vengono illustrati i risultati ottenuti:

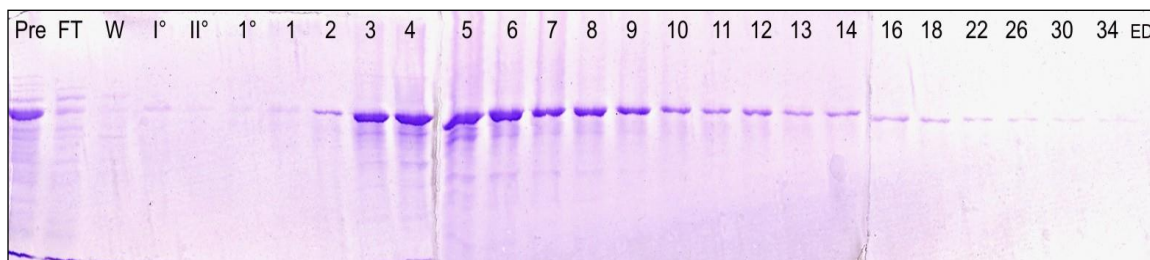


Fig. 4.14: SDS-PAGE delle frazioni ottenute in cromatografia di affinità HiTrap Chelating con refolding in colonna.

Confrontando tale gel con quello ottenuto mediante cromatografia denaturante (Fig. 4.11), si può osservare la presenza del CRM197His in un numero più concentrato di frazioni di eluizioni. Il pool proteico derivante dall'unione delle frazioni 3-10 è stato sottoposto ad analisi Bradford per quantificare la resa del processo.

Prova	Proteina caricata (PRE)	Eluizione	Rec
		mg	%
HiTrap Chelating	34	3,5	10

Tab. 4.10: Quantificazione Bradford dei pool ottenuti dalla cromatografia su colonna HiTrap Chelating

Nonostante i tentativi di ottimizzare il processo, non si è riusciti ad ottenere rese di purificazioni maggiori al 10 %. Tale risultato potrebbe essere dovuto dalla formazione di interazioni aspecifica CRM197-His-resina che ridurrebbero l'efficienza di eluizione. Questa ipotesi spiegherebbe anche l'eluizione incompleta della proteina poichè, come risulta dalla quantificazione Bradford, non si recupera tutta la proteina caricata in colonna, indice del fatto che una parte rimane legata alla resina. Si è deciso, quindi, di analizzare altre due resine disponibili in commercio già utilizzate nelle prove di purificazione mediante cromatografia su colonna in condizioni denaturanti (Protino Ni-IDA e Profinity IMAC).

Le prime prove cromatografiche sono state eseguite con la resina a base di silice porosa (Protino Ni-IDA) impaccata in una colonna da 5 mL. Le frazioni recuperate ed il cromatogramma corrispondente sono riportati di seguito:

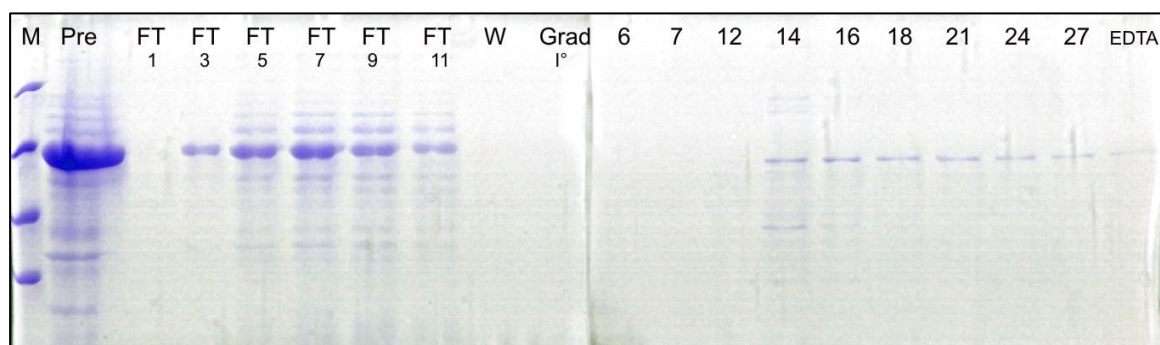
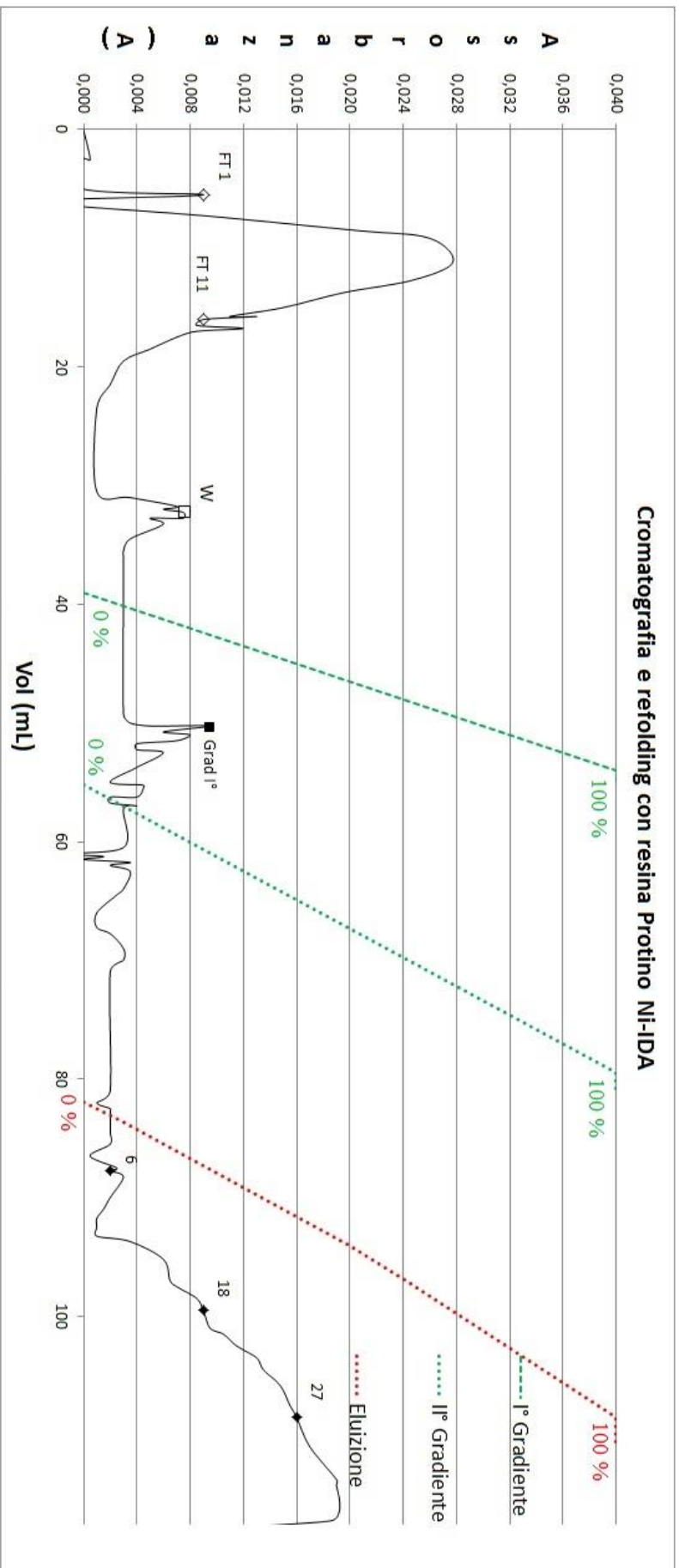


Fig. 4.15: SDS-PAGE delle frazioni prelevati dalla cromatografia in colonna.
(Protino Ni-IDA)

Come si può osservare in gel, il CRM197His è presente praticamente solo nelle frazioni del FT, mentre non si osserva nelle frazioni di eluizione; anche il cromatogramma (visibile in tavola 4.3) non evidenzia alcun picco di eluizione. Per tale motivo, si è deciso di eliminare il detergente Triton X-100 durante i lavaggi dopo il caricamento del campione per favorire il legame della proteina ed il suo mantenimento in colonna.



Tav. 4.3: Cromatogramma ottenuto dalla cromatografia con colonna Protino-IDA con refolding in colonna

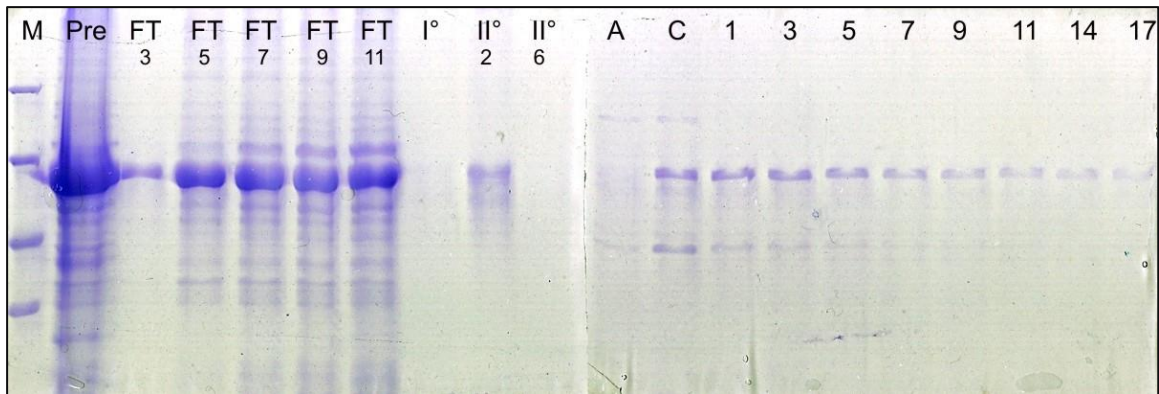


Fig. 4.16: SDS-PAGE delle frazioni prelevate dalla cromatografia eseguita in assenza di Triton X-100.
(Protino Ni-IDA)

Anche in assenza di Triton X-100, tuttavia, si ottiene un andamento del tutto simile alla precedente cromatografia. Il problema principale sembra essere l'incapacità del CRM197His di legarsi alla resina in maniera efficace, portando a rese molto basse di recupero. Una successiva modifica ha previsto l'aggiunta nei tamponi di glicerolo 20 % come disaggregante di eventuali aggregati insolubili, ma anche questa variazione non ha migliorato il processo.

La resina Protino Ni-IDA impaccata manualmente in colonna è costituita da particelle di dimensione media pari a 90 μm . La resina HiTrap Chelating usata in precedenza (che non dava problemi durante il caricamento del campione) era invece caratterizzata da particelle con una dimensione media di circa 34 μm . E' possibile ipotizzare che la diversa porosità sia la causa dello scarso legame del CRM197His alla matrice di silice quando si esegue la cromatografia su colonna per pressione.

In seguito, si è deciso di provare la resina polimerica Profinity-IDA, seguendo la metodica in presenza di Triton X-100, la cui rimozione non aveva portato alcun miglioramento. Di seguito il gel corrispondente:

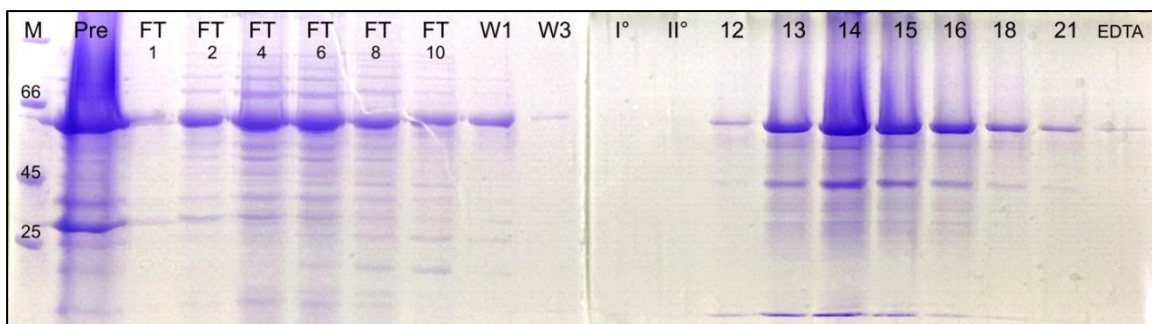


Fig. 4.17: SDS-PAGE delle frazioni prelevati dalla cromatografia in colonna a bassa pressione.
(Profinity-IMAC)

Si nota chiaramente come nelle frazioni dalla 13 alla 16 sia presente un buon livello di CRM197His, nonostante la proteina sia visibile anche all'interno nelle frazioni del FT. Le frazioni di eluizione sono state unite per la quantificazione mediante Bradford.

Prova	Proteina caricata (PRE)	Eluizione	Rec
		mg	%
Profinity-IMAC	32,3	4,3	13

Tab. 4.11: Quantificazione Bradford dei pool ottenuti unendo le frazioni cromatografiche (resina Profinity-IMAC)

La resa ottenuta dalla cromatografia non è elevata, ma risulta comunque un passo avanti rispetto alla cromatografia con resina in agarosio, poiché si è ottenuto una completa eluizione della proteina dalla colonna, infatti il bilancio di materia è prossimo allo zero.

E' stato, quindi, eseguito un confronto con le frazioni recuperate dalla cromatografia su colonna con la stessa resina polimerica Profinity-IDA ma in condizioni denaturanti.

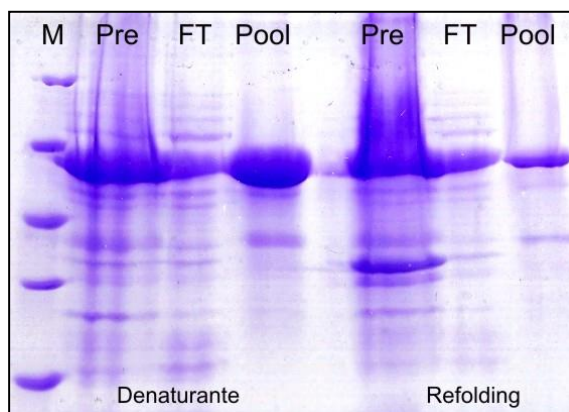
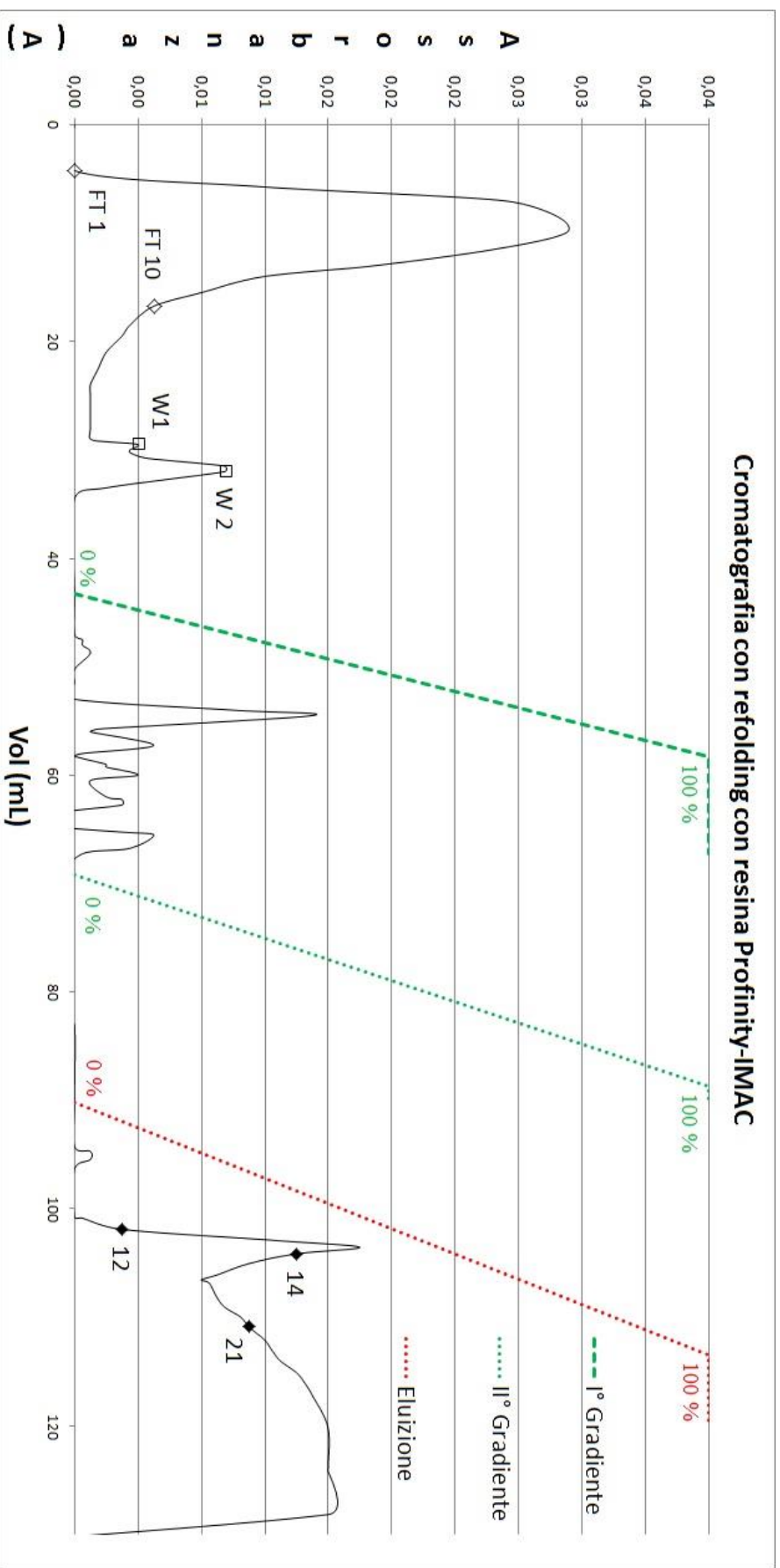


Fig. 4.18: SDS-PAGE dei pool ottenuti dalle cromatografie su colonna con la resina polimerica Profinity-IDA



Tav. 4.4: Cromatogramma ottenuto dalla cromatografia con colonna Profinity-IMAC con refolding in colonna

Il gel così ottenuto viene elaborato con il programma per computer Image-J che permette di calcolare la densità delle bande proteiche presenti in gel per confrontare le rese dei due processi eseguiti con la stessa resina (tabella 4.12), ma in condizioni differenti:

Prova	Campioni	Area Totali	Volume	Area x Volume	Rec (%)
Denaturante	Pre	26476	7.5	198574	68
	Eluizione	19004	7.1	134925	
Refolding	Pre	29224	7,5	219180	13
	Eluizione	4817	6	28904	

Tab 4.12: Quantificazione delle bande ottenute dall' SDS-PAGE (resina Profinity-IMAC)

Come prevedibile, la resa del processo in condizioni denaturanti risulta molto più elevata della resa del processo con refolding in colonna. Quest'ultima procedura, inoltre, non sembra essere influenzata particolarmente dal tipo di resina. Per tentare di ottimizzare il processo ed aumentare la resa finale, il campione proteico corrispondente al FT, ricco in CRM197His, è stato ricaricato in colonna. In tal modo si potrebbe aumentare la frazione di proteina in grado di legarsi alla resina mediante interazioni con i cationi divalenti.

Di seguito è riportato il gel SDS-PAGE in cui sono state analizzate le varie frazioni ottenute dalla cromatografia con ricircolo:

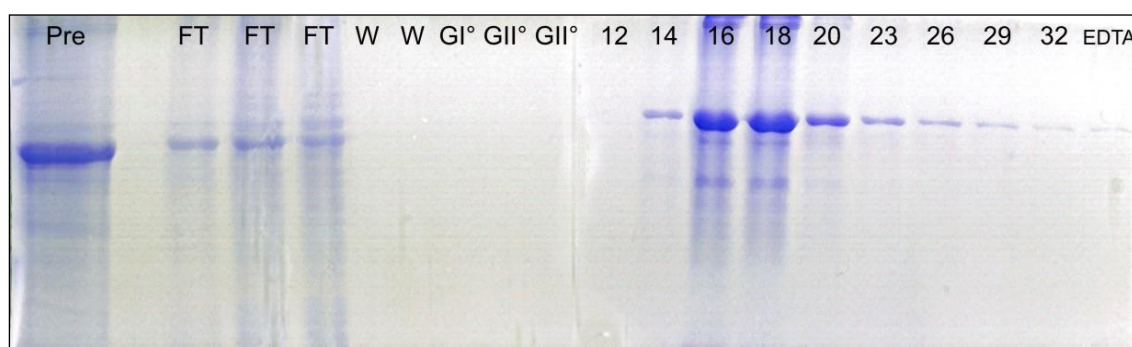


Fig. 4.19: SDS-PAGE delle frazioni ottenute dalla cromatografia su colonna con ricircolo.

Si può osservare un calo di intensità delle bande corrispondenti al FT oltre ad un leggero aumento del grado di purificazione delle frazioni di eluizione. Queste frazioni (13-18) sono state unite in un unico pool per la quantificazione proteica:

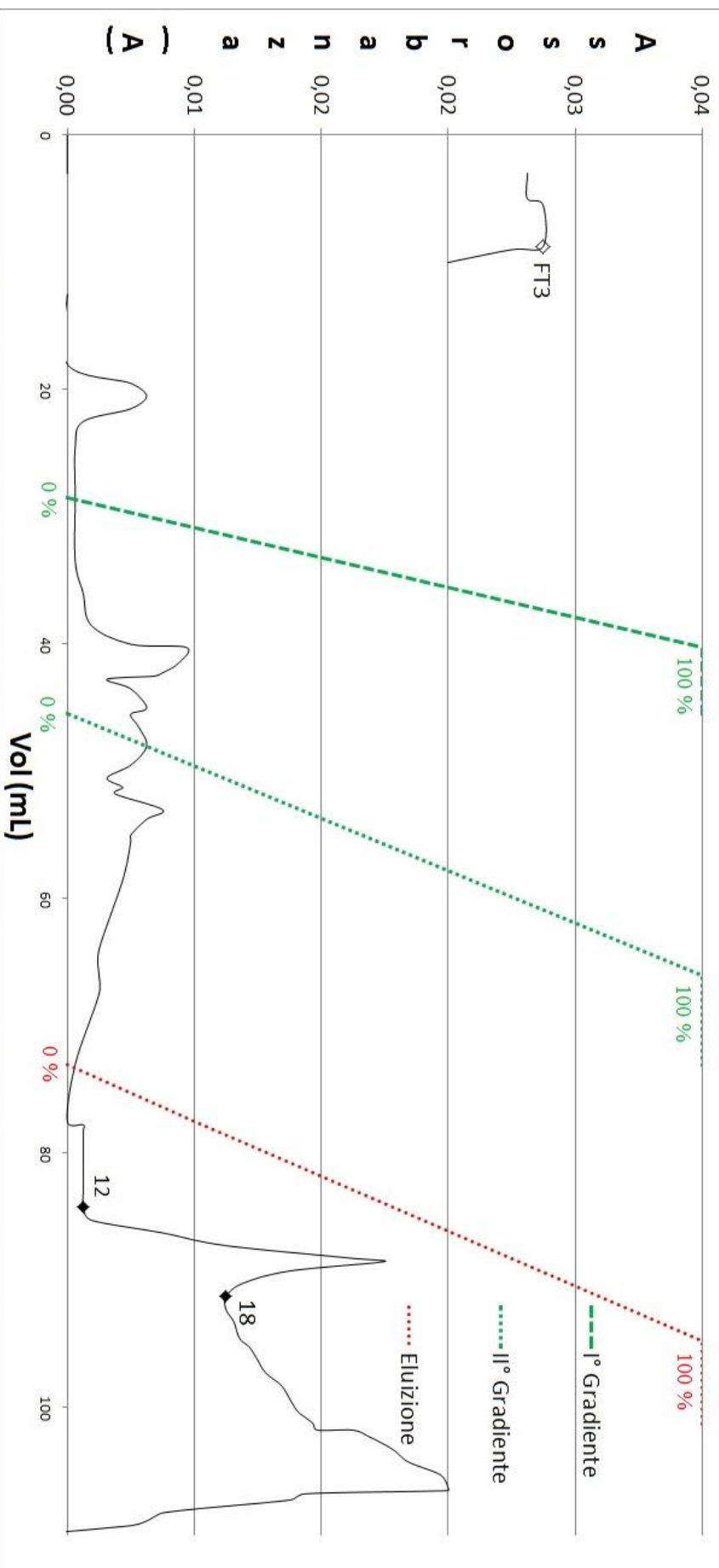
Prova	Proteina caricata (PRE)	FT1	FT2	FT3	Eluizione	Rec
		mg	mg	mg	mg	%
Profinity-IMAC	27	5,2	7	8,6	8,5	31

Tab 4.13: Quantificazione Bradford dei pool ottenuti con cromatografia in colonna e con il ricircolo del FT

Come prevedibile anche dall' SDS-PAGE, la resa finale del processo è aumentata rispetto alle prove precedenti (32 %). Questo aumento potrebbe essere dovuto all'eliminazione di vari contaminanti che, instaurando delle interazioni con il CRM197His, potrebbero ostacolare l'eluizione della proteina.

In conclusione, il confronto fra le tre matrici ha dimostrato come la resina polimerica sia la più adatta per una procedura di purificazione e di refolding in colonna del CRM197His. Con questo passaggio cromatografico, sfruttando il ricircolo in colonna del campione FT, si ottiene una buona resa di purificazione (32 %) che consente di proseguire con ulteriori purificazioni. Un altro fattore molto importante da considerare è il grado di purificazione della proteina; con questo processo, infatti, è possibile ottenere una preparazione proteica discretamente pura (come si può notare in SDS-PAGE). Di conseguenza, un'aliquota di questo campione di CRM197His è stato utilizzato per valutare la riuscita del refolding mediante saggi di attività. In parallelo, si è tentato di indagare la natura del polimero che compone la resina Profinity mediante analisi.

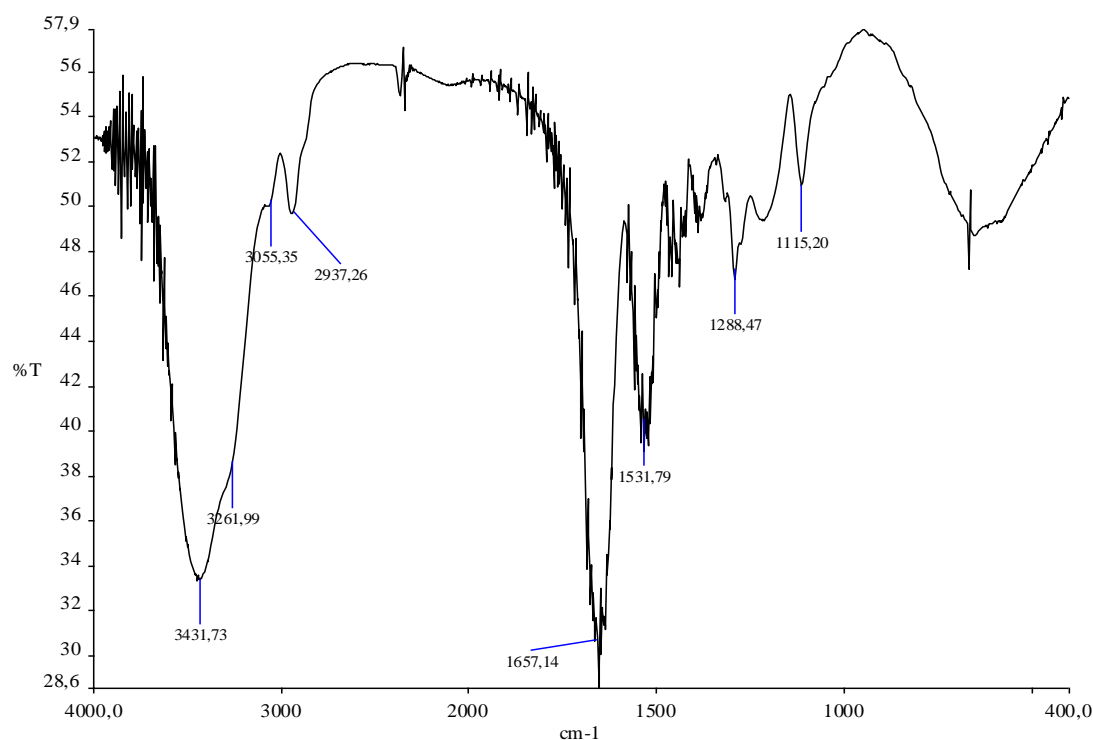
Cromatografia con refolding e ricircolo del FT con resina Profinity-IMAC



Tav. 4.5: Cromatogramma ottenuto dalla cromatografia con refolding e ricircolo del FT con resina Profinity-IMAC

4.4 Analisi IR della resina Profinity-IMAC

La resina Profinity-IDA, che è risultata la migliore di quelle considerate per la purificazione del CRM197His, è una resina polimerica artificiale prodotta dalla ditta Bio-Rad. Purtroppo la composizione di questa resina è protetta da brevetto e non è nota. Per capire la struttura chimica della resina si è deciso di sottoporla ad analisi IR, per ottenerne lo spettro (visibile in tavola 4.6) da cui ipotizzare la struttura polimerica:



Tav. 4.6: Spettro IR ricavato dall'analisi in pasticca di KBr della resina Profinity-IMAC

Dall'analisi dello spettro IR si notano subito le bande tipiche degli amminoacidi, (nella forma R_3NH^+/COO^-), in particolare si distinguono a:

- 3431 cm⁻¹: stretching dell'OH e degli N-H (si può notare infatti la spalla a 3260 cm⁻¹ che dimostra la presenza dei due gruppi)
- 1657 cm⁻¹: stretching del C=O (spostato a bassi numeri d'onda perché sotto forma di COO⁻ (54)).
- 1531 cm⁻¹: stretching del C-N accoppiato con una deformazione dell'N-H.
- 1288 cm⁻¹: deformazione combinate dei legami C-N e N-H
- 1115 cm⁻¹: stretching dei C-O-C e N-C-C-O

- circa 650 cm^{-1} : bending fuori dal piano del legame N-H.

Dall'analisi dello spettro non risulta, tuttavia, evidente nessun gruppo funzionale attribuibile alla resina. Si è quindi ipotizzato che questa sia composta semplicemente da una catena alifatica, ottenuta dalla polimerizzazione dell'acido 3-Allilossi-2-idrossi-1-propansolfonico (visibile in figura 4.20) per via radicalica, sfruttando un iniziatore radicalico termico in emulsione.

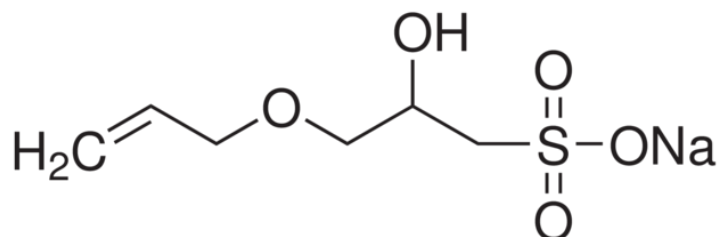


Fig. 4.20: Formula di struttura dell'acido 3-Allilossi-2-idrossi-1-propansolfonico

Il monomero polimerizzato presenterà dei gruppi solfonici che potranno essere derivatizzati con l'acido imminodiacetico per semplice sostituzione SN_2 , ottenendo, quindi, la resina di interesse.

4.5 Saggi di attività DNAsica

Un'aliquota del campione di CRM197His ottenuto mediante colonna cromatografica con la resina Profinity-IMAC e sottoposto a refolding è stato analizzato in un saggio di attività. Tali saggi sono fondamentali per accertare la corretta riuscita del processo di refolding proteico, poiché una proteina mantiene la sua attività enzimatica solo se la struttura quaternaria è quella nativa. Nel caso specifico del CRM197His, sono stati eseguiti dei saggi per valutare la presenza di attività DNAsica, ovvero la capacità di idrolizzare i legami fosfodiesterici tra i nucleotidi che formano il DNA.

La metodica, descritta nel paragrafo 3.10, è stata applicata alle frazioni di eluizione della cromatografia sottoposte a dialisi per abbattere la concentrazione di imidazolo (usato nel tampone di eluizione) e conservare i campioni congelati. La procedura di dialisi è illustrata al paragrafo 3.9.

Come DNA stampo è stato adoperato il plasmide pBAD vuoto (4100 bp), contenuto all'interno del ceppo *Escherichia coli* TOP10, ed estratto con il kit di estrazione QIAGEN Plasmid Purification Midi. Conclusa l'incubazione tra il DNA (500 ng) ed il

CRM197His (1 μg), le diverse reazioni (volume di 20 μL) sono state analizzate in gel elettroforesi per visualizzare le bande corrispondenti al DNA intero e/o tagliato (Fig. 4.22).

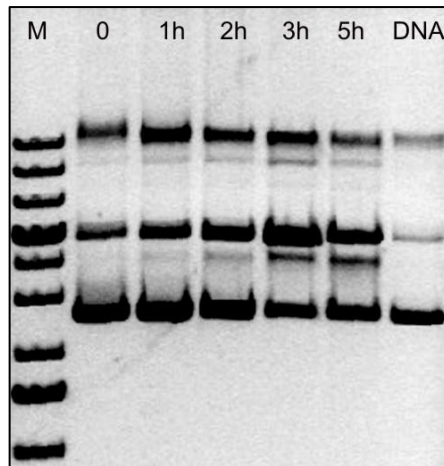


Fig. 4.21: Elettroforesi svolta con i campioni del saggio DNasico

Dopo colorazione dei gel di agarosio con etidio bromuro, è stato possibile evidenziare nel controllo (solo DNA) e nel campione al tempo zero le tre bande tipiche del DNA plasmidico: a partire dal basso, la banda corrispondente al DNA “superavvolto” (corre in gel velocemente), la banda intermedia del DNA “linearizzato” e la banda più alta corrispondente al DNA “rilassato”. Il plasmide in condizioni native si trova nella forma superavvolta ma, in seguito a tagli singoli (cioè in un solo filamento) perde la sua struttura, diventando rilassato, mentre a causa di un doppio taglio diventa linearizzato.

Osservando il gel in figura 4.22 si può notare come, dopo un’ora, la banda del DNA “linearizzato” sia più intensa, indice del fatto che il CRM197His ha già iniziato a catalizzare l’idrolisi dei legami del DNA. Questo andamento continua fino a generare, dopo 5 ore, una intensa banda corrispondente al DNA linearizzato oltre alla comparsa di due nuove bande probabilmente dovute ad un successivo taglio dopo la linearizzazione.

Tale risultato permette di supporre che il refolding del CRM197His in colonna abbia avuto un esito positivo generando una proteina attiva e allo stato nativo.

5. Conclusioni

La produzione industriale del CRM197, date le sue applicazioni in campo farmaceutico come carrier nei vaccini coniugati, ha assunto da tempo notevole importanza. Recentemente, inoltre, l'interesse verso questa proteina è aumentato dopo l'individuazione di nuovi potenziali utilizzi, come il possibile effetto antitumorale. Questo studio parte dai risultati ottenuti in altri lavori di tesi in cui era stato individuato un efficace protocollo di sovraespressione e di estrazione della proteina da *Escherichia coli*. In particolare, il CRM197 viene espresso con rese elevate come proteina eterologa nel ceppo di *E. coli* BL21AI come variante dotata di un tag esaistidinico all'estremità N-terminale. A causa della sua elevata idrofobicità, il CRM197His si accumula sotto forma di aggregati insolubili e, quindi, risulta necessario utilizzare una soluzione denaturante (urea 6 M) per solubilizzare la proteina prima della fase di purificazione. Questo richiede la messa a punto di una procedura di refolding proteico che consenta di ottenere il CRM197His in forma nativa e biologicamente attiva. Nei precedenti lavori di tesi, la fase di refolding è stata eseguita durante il primo passaggio di purificazione, basato sulla cromatografia di affinità a cationi divalenti con una colonna impaccata con una resina di agarosio. Tuttavia la procedura ha evidenziato problemi di interazioni aspecifiche del CRM197His con altri contaminanti o con la resina stessa, ottenendo basse rese di purificazione.

In questo studio, perciò, si è deciso di utilizzare altre resine presenti in commercio per effettuare un confronto con la matrice a base di agarosio che, in genere, è quella più frequentemente sfruttata per purificare proteine dotate di His-tag.

Inizialmente sono state eseguite delle cromatografie su colonna per gravità in condizioni denaturanti. Lo scopo era quello di valutare le diverse proprietà delle resine utilizzate, dovute alla loro diversa natura chimica. In particolare, le tre resine confrontate sono: la resina polimerica di agarosio, una resina polimerica a composizione incognita (da analisi IR si ipotizza essere composta dal polimero dell'acido 3-Allilossi-2-idrossi-1-propansolfonico) ed una resina in silice microporosa, tutte derivatizzate con l'acido imminodiacetico. Queste analisi preliminari non hanno evidenziato differenze significative fra le tre matrici; in tutti i casi è stato possibile ottenere una buona resa di processo, pari a circa il 45 %, accompagnata però da una scarsa purificazione della proteina.

Si è, quindi, proceduto a comparare le tre resine in cromatografia a bassa pressione, sempre in condizioni denaturanti. In queste caso, rispetto alle cromatografie svolte con la resina di agarosio, in cui l'eluizione del CRM197His era diluita in tutte le frazioni ottenute, con la resina in silice e con quella polimerica i risultati sono stati più incoraggianti. In particolare, la resa del processo risultava aumentata rispetto alle condizioni in gravità (fino al 55 %) e la proteina veniva eluita in un numero ristretto di frazioni pur presentando uno scarso grado di purificazione ed una notevole perdita di proteina nel FT.

Infine, sono state eseguite le prove di refolding del CRM197His in colonna. Nelle cromatografie svolte in precedenza, con la resina di agarosio, si otteneva al massimo una resa di purificazione pari al 10 %. Tale processo, oltre ad avere una bassa resa, portava ad una eluizione incompleta della proteina, che rimaneva in colonna e portava ad un rapido degrado della resina stessa in seguito a numerosi passaggi di rigenerazione. Le prove con la resina in silice (Protino Ni-IDA) hanno riportato un ulteriore calo della resa, probabilmente dovuto ad un'eluizione precoce di parte della proteina durante i gradienti inversi per rimuovere l'urea. Nel caso della resina polimerica (Profinity Ni-IDA), invece, la resa ottenuta era pari al 13 % e la proteina risultava concentrata in poche frazioni. Per tentare di ottimizzare il processo, il campione corrispondente al FT, ricco in CRM197His, è stato ricaricato nella stessa colonna cromatografica, in modo da favorirne il legame. I risultati ottenuti sono stati molto incoraggianti, poiché la resa finale è salita al 32 %, oltre ad ottenere un buon grado di purificazione ed una discreta concentrazione proteica.

Infine, per valutare l'efficacia del processo di refolding, un'aliquota del campione rinaturato è stata sottoposta ad analisi di attività DNAsica. I risultati di queste prove indicano che il CRM197His possiede attività DNAsica, di conseguenza il refolding proteico effettuato in colonna sembra essere andato a buon fine.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro sono incoraggianti e fanno ipotizzare un possibile scale-up del processo di espressione eterologa del CRM197His. Risulta, tuttavia, necessario ottimizzare ancora alcune fasi del processo per portare ad un miglioramento della resa e del grado di purificazione del campione.

Bibliografia

1. *Bacterial Toxin: Friends or Foes*. **Clare K. Schmitt, Karen C. Meysick, Allison D. O'Brien**. 2, 1999, Uniformed Services University of the Health Sciences Bethesda.
2. **Schlessinger D., Schaechter M.** Bacterial Toxin. [book auth.] Medoff G Schaechter M. *Mechanism of microbial disease*. Baltimore : Williams & Wilkins, 1993, pp. 162 - 175.
3. **Menestrina G., Schiavo G., Montecucco C.** Molecular mechanism of action of bacterial protein toxins. *Mol. Aspects. Med.* 1994, 15, pp. 79 - 193.
4. **F, Loellfer.** *Untersucungen uber de beutung der Mikroorganismen fur die Entstehung der Diphtherie beim Mneschen bei dur Taube und bein Kalbe.*
5. **Collier, R. J.** Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*. 2001, 39, pp. 1793 - 1803.
6. **Roux Jr. E., Yersin A.** Contribution a l'etude de la diphtherie. *Ann. Inst Pasteur*. 1888, 2, pp. 620 - 629.
7. **M.D., Eaton.** The purification and concentration of diphtheria toxin. *J. Bacteriology*. 1936, 31, pp. 347-383.
8. **Jr., Pappanheimer A. M.** Diphtheria toxin I. Isolation and characterization of a toxic protein from *C. diphtheriae* filtrates. *Biol. Chem.* 1937, 120, pp. 543 - 553.
9. **G., Ramon Jr.** Sur le pouvoir flocculant et sur les propiete immunisantes d'une toxine diphtherique rendue anatoxique (anatoxine). *Comptes reduces de la Academic de Sciences*. 1923, 177, pp. 1330 - 1338.
10. **John, Collier R.** Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriological reviews*. Mar 1975, pp. 54 - 85.
11. **Holmes, Randall K.** Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and tox gene. *J Infect Dis*. Feb 2000, Vol. Suppl 1:S, 181, pp. 156 - 167.
12. **Murphy J R, Bacha P.** Regulation of diphtheria toxin production. [book auth.] Shlessinger. *Microbiology*. 1979, pp. 181 - 186.
13. **Collier R J, Kandel J.** Structure and activity of Diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, pp. 1496 - 1503.
14. **Falnes PO, Sandvig K.** Penetration of protein into cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2000, 12(4), pp. 407 - 413.
15. **Alourf JE, Freer JH.** *The comprehensive sourcebook of bacterial toxins*. s.l. : Academic Press, 1999.
16. **Qing Deng, Joseph T Barbieri.** Molecular Mechanism of the Cytotoxicity of ADP-Ribosylating Toxins. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008, 62, pp. 271 - 288.

17. **Oh K J, Senzel L, Collier R J, Finkelstein A.** Translocation of the catalytic domain of Diphtheria toxin across planar phospholipid bilayer by its own T domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96, pp. 8467 - 8470.
18. **Kageyama T, Ohishi M, Miyamoto S, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E.** Diphtheria toxin mutant CRM197 possesses weak EF2 - ADP ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity. *J. Biochem.* 2007, 142, pp. 95 - 104.
19. **Todar, Kenneth.** *Online text book of bacteriology.* s.l. : University of Wisconsin Department of Bacteriology, 2008.
20. **B Spilsberg, K Sandvig, S Walchli.** Reconstitution of active diphtheria toxin based on hexahistidine tagged version of the B-fragment produced to high yields in bacteria. *Toxicon.* 2005, 46, pp. 900 - 906.
21. **N, Strauss Jr.** The effect of Diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells. *Exp. Med.* 1959, 109, pp. 145 - 163.
22. **Strauss Jr N, Hendee E D.** The effect of Diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells - II: effect on nucleic acid metabolism. *Exp. Med.* 1960, 112, pp. 351 - 359.
23. **Tweeten Jr R K, Barbieri J T, Collier R J.** Diphtheria toxin. Effect of substituting aspartic acid for glutamic acid 148 on ADP - ribosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, pp. 10392 - 10394.
24. **Kandel J, Collier R J, Chung D W.** Interaction of fragment A from diphtheria toxin with nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* 249, pp. 2088 - 2097.
25. **Charles E Bell, Todd O Yeats, David Eisenberg.** Unusual conformation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) bound to diphtheria toxin: a comparison with NAD bound to the oxidoreductase enzymes. *Protein Sci.* Oct. 1997, 6, pp. 2084 - 2096.
26. **J, Collier R.** Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factor. *J. Mol. Biol.* 1967, 25, pp. 83 - 98.
27. **Gill D M, Pappanheimer A M J, Brown R, Kurnock J T.** Studies on the mode of action of diphtheria toxin. VII Toxin simulated hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian cell extracts. *J. Exp. Med.* 1969, 129, pp. 1 - 21.
28. **Honjop T, Nishizuka Y, Hayaishi O.** Diphtheria toxin dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 1968, 243, pp. 3553 - 3555.
29. **Chang M P, Bramhall, J Graves, Bonavida B, Eisneski B J.** Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytotoxicity. Evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, pp. 15261 - 15267.
30. **Can Bruce, Rae Lynn Baldwin, Stephen L Lessnick, Bernadine J Wisneski.** Diphtheria Toxin and ADP-ribosyltransferase-defective homologue CRM197 possess deoxyribonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990, 87, pp. 2995 - 2998.

31. **Uchida T., Pappenheimer A. M., Greany R.** Diphtheria toxin and related proteins. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, pp. 3838 - 3844.
32. **Gill D. M., A M Pappenheimer Jr, T. Uchida.** The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic acid Research.* 1984.
33. **Enrico Malito, Badry Bursula, Connie Chen, Paola Lo Surdo, Monica Picchianti, Enrico Balducci, Marco Biancucci, Ansgar Brock, Francesco Berti, Matthew James Bottomley, Mikkel Nissum, Paolo Costantino, Rino Rappuoli, Glen Spraggon.** Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc Natl Acad Sci.* 2012, Vol. 109, 14, pp. 5229 - 5234.
34. **Choe S, Bennett M. J., Fujii G., Curmi P. N., Kantardjieff K. A., Collier R. J., Eisenberg D.** The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature.* 1992, 357, pp. 216 - 222.
35. **Michael Broker, Paolo Costantino, Lisa de Tora, E. David McIntosh, Rino Rappuoli.** Biochemical and biological characteristics of cross reacting material 197 (CRM 197), a non toxic mutant of diphtheria toxin: Use conjugation protein in vaccines and other potential clinical application. *Biologicals.* 2011, Vol. 4, 39, pp. 195 - 204.
36. **Rappuoli R, Michel JL, Murphy JR.** Integration of corynebacteriophages beta tox+, omega tox+ and gamma tox- into two attachment sites on the Corynebacterium diphtheriae chromosome. *J. Bacteriol.* 1983:1202e10, Vol. 15.
37. *WO 2006/100108.*
38. *WO 2005/056773.*
39. *WO 2000/050449.*
40. *US 2008/0193475.*
41. **Nadav Orr, James E. Galen, Myron M. Levine.** Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM197, and its fragments in Salmonella typhi vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect Immun.* 1999, Vol. 67, 8, pp. 4290 - 4294.
42. **W R Bishai, R Rappuoli and J R Murphy.** High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in Escherichia coli. *J Bacteriol.* Novembre 1987, Vol. 11, 169, pp. 5140 - 5151.
43. **Bishai W. R., Miyaanohara A., Murphy J. R.** Cloning and expression in Escherichia coli of three fragments of Diphtheria toxin truncated withing fragment. *B. J. Bacteriology.* 1987, 169, pp. 1554-1563.
44. **Nascimento DV, Lemes EM, Queiroz JL, Silva JG Jr, Nascimento HJ, Silva ED, Hirata R Jr, Dias AA, Santos CS, Pereira GM, Mattos-Guaraldi AL, Armoa GR.** Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 Corynebacteriu diphtheriae strain toxin. *Braz J Med Biol Res.* Maggio 2010, Vol. 5, 43, pp. 460 - 466.

45. **R Schneerson, O Barrera, A Sutton e J B Robbins.** Preparation, characterization and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. *J Exp Med.* 1980, 152, pp. 361 - 376.
46. <http://www.rhizobia.co.nz/research/bioprospecting>. [Online]
47. **Ron Dagan, Jan Poolman, Claire-Anne Siegrist.** Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review. *Vaccine.* Agosto 2010, Vol. 28, 34, pp. 5513 - 5523.
48. **Ito Y, Higashiyama S, Takeda T, Okada M, Matsuura N.** Bimodal expression of heparin-binding EGF-like growth factor in colonic neoplasms. *Anticancer Res.* 2001, 21(2B), pp. 1391 - 1394.
49. **Yotsumoto F, Oki E, Tokunaga E, Maehara Y, Kuroki M, Miyamoto S.** HB-EGF orchestrates the complex signals involved in triple-negative and trastuzumab-resistant breast cancer. *Int J Cancer.* 2010, 127(11), pp. 2707 - 2717.
50. **Ito Y, Takeda T, Higashiyama S, Noguchi S, Matsuura N.** Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2001, 67(1), pp. 81 - 85.
51. **Inui Y, Higashima S, Kawata S, Tamura S, Miyagawa J, Taniguchi N, Matsuzawa Y.** Expression of heparin-binding epidermal growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 1994, 107(6), pp. 1799 - 1804.
52. **Miyamoto S, Hirata M, Yamazaki A, Kageyama T, Hasuwa H, Mizushima H, Tanaka Y, Yagi H, Sonoda K, Kai M, Kanoh H, Nakano H, Mekada E.** Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res.* 2004, 64(16), pp. 5720 - 5727.
53. **Franklin H, Epstein M, D Editor.** Atherosclerosis - An inflammatory Disease. *N Engl J Med.* Gennaio 14, 1999, 340, pp. 115 - 126.
54. **Sheinker, Syrkin, Izvest. Akad. Nauk.** SSSR Ser Fiz. 1950, Vol. 14, p. 478.
55. **Naglich J. G., Metherall J.E., Russel D. W., Eidels L.** Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin binding EGF - like growth factor precursor. *Cell.* 1992, 69, pp. 1051 - 1061.
56. **Oh K. J., Senzel L., Collier R. J., Finkelstein A.** Translocation of the catalytic domain of Diphtheria toxin across planar phospholipid bilayer by its own T domain. 1999, 96, pp. 8467 - 8470.
57. **Kageyama T., Ohishi M., Miyamoto S., Mizushima H., Iwamoto R., Mekada E.** Diphtheria toxin mutant CRM197 possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity. 2007, 142, pp. 95 - 104.
58. **Bradford.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976, 72, pp. 248 - 254.
59. **Wayne, Rasband.** Bethesda, Maryland, USA : s.n. wayne@codon.nih.gov.

60. **Wolff C, Wattiez R, Ruyschaert J M, Cabiaux V.** Characterization of diphtheria toxin's catalytic domain interaction with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, 1661, pp. 166 - 177.
61. **De Lange R J, Drazin R E, Collier R J.** Amino-acid sequence of fragment A an enzymically active fragment from diphtheria toxin. *Natl. Acad. Shi*. 1976, 73, pp. 69 - 72.
62. **Hess J, Gentshev I, Szalay G, Ladel C, Bubert A, Goebel W, Kaufmann S H.** Listeria monocytogenes p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated Salmonella typhimurium. *Infect Immun*. 1995, 63, pp. 2047 - 2053.
63. **Hess J, Gentshev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, Kaufmann S H.** Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant Salmonella vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93, pp. 1458 - 1463.
64. **Baneyx F, Mujacic M.** Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat Biotechnol*. 2004, 11, pp. 1399 - 1408.
65. **Lindberg, Alf A.** Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine*. Ottobre 1999, Vol. Volume 17, Supplemento 2, pp. S28 - S36.
66. **S B Black, H R Shinefield.** Immunization with oligosaccharide conjugate Haemophilus influenzae type b (HbOC) vaccine on a large health maintenance organization population: extended follow-up and impact on Haemophilus influenzae disease epidemiology. *Pediatr Infect Dis*. 1992, Vol. 11, 8, pp. 610 - 613.
67. **Shinefield, Henry R.** Overview of the development and current use of CRM197 conjugate vaccines for pediatric use. *Vaccine*. 2010, Vol. 28, 27, pp. 4335 - 4339.
68. **Daisuke Nanba, Shigeki Higashiyama.** Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine & Growth factor Reviews*. Vol. 15, 1, pp. 13 - 19.