

Daniele Mungianu danielemungianu@gmail.com

Expression, purification and initial characterization of the viral oncoprotein E7 from human papillomavirus 16 (HPV16)

Espressione, purificazione e caratterizzazione iniziale della oncoproteina virale E7 del papilloma virus umano 16 (HPV16)

Relatore: Prof.ssa Isabella Caterina Felli; felli@cerm.unifi.it

Correlatore: Prof.ssa Roberta Pierattelli; pierattelli@cerm.unifi.it

Abstract

Le proteine intrinsecamente disordinate (IDPs) sono proteine caratterizzate dalla mancanza di struttura terziaria e questa proprietà conferisce loro notevoli vantaggi funzionali. Le IDPs svolgono un ruolo fondamentale per le funzioni biochimiche, incluso il riconoscimento molecolare, la segnalazione e la regolazione di vari processi con varie implicazioni in molte malattie umane. Grazie alla loro sequenza primaria estesa ed esposta, le proteine intrinsecamente disordinate mostrano brevi sequenze amminoacidiche (short-linear motives - SLIMs) che hanno la possibilità di interagire con numerosi partner. La strategia di utilizzare gli SLIMs per interagire con partner proteici sembra uno dei meccanismi chiave utilizzati dai virus, i quali in virtù del loro piccolo genoma, necessitano modi alternativi per interferire con la cellula ospite, rispetto all'utilizzo di proteine strutturate. Tra le proteine virali, abbiamo deciso di concentrarsi su una di esse che gioca un ruolo chiave nell'oncogenesi, la proteina E7 del papilloma virus umano 16 (HPV16).

L'oncoproteina HPV16 E7 è costituita da 98 amminoacidi, con un peso molecolare di circa 12 kDa.; questa presenta analogie con la proteina E1A dell'adenovirus e con l'antigene T del Simian virus 40 (SV40). Nonostante la sua apparente semplicità, non esistono dati strutturali ad alta risoluzione. Le poche informazioni strutturali disponibili sono relative ad alcuni moduli della E7 da varianti del virus a rischio più basso (HPV 45, HPV1). Le analisi bioinformatiche della HPV 16 E7 mostrano proprietà strutturali eterogenee, confermando la presenza sia di domini molto disordinati che di un dominio più strutturato all'interno della proteina, come schematicamente indicato in Figura 1. Inoltre sono state identificate in letteratura numerose interazioni della E7 con varie proteine umane, tramite le quali il virus interferisce con la cellula ospite (Figura 1).

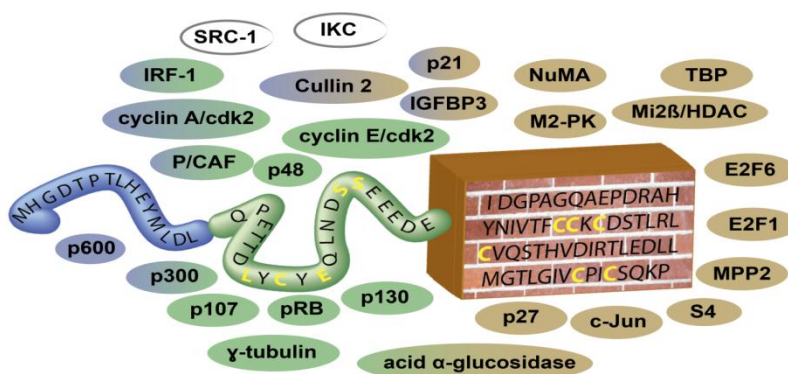


Figura 1 – Illustrazione schematica delle numerose interazioni dell'E7 con le proteine umane, grazie alle quali interferisce con numerosi processi biologici.

È quindi molto importante riuscire a caratterizzare HPV16 E7 a risoluzione atomica e, viste le sue proprietà strutturali e dinamiche eterogenee, la spettroscopia NMR risulta la tecnica più indicata per ottenere informazioni a risoluzione atomica. Per poter sfruttare al massimo le potenzialità della tecnica NMR sono necessari campioni arricchiti isotopicamente ^{13}C – ^{15}N ad elevata concentrazione. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di ottimizzare il protocollo di espressione e purificazione della HPV16 E7 e di identificare le condizioni sperimentali più adatte per procedere alla caratterizzazione completa della proteina tramite NMR.

Il protocollo di espressione e purificazione dell'E7 in mezzo minimo (arricchito isotopicamente con ^{13}C e ^{15}N) è stato ottimizzato. Adesso è possibile ottenere una resa elevata di ^{13}C , ^{15}N HPV16 E7 per l'analisi NMR ad alta risoluzione della proteina. Studi NMR sulla dipendenza dal pH e dalla concentrazione hanno rivelato proprietà dinamiche e strutturali molto eterogenee, più complesse di quanto fino ad adesso ipotizzato (un dominio altamente disordinato e uno ben strutturato). La caratterizzazione NMR della proteina costituisce inoltre la base necessaria per procedere allo studio delle interazioni della HPV16 E7, che sembra comportarsi come una proteina "hub", con i suoi molteplici partner. In conclusione sembra quasi impossibile che la HPV16 E7, una piccola proteina di meno di 100 amminoacidi, sia capace interferire con molteplici processi di regolazione cellulare e contribuire così all'insorgere di tumori.

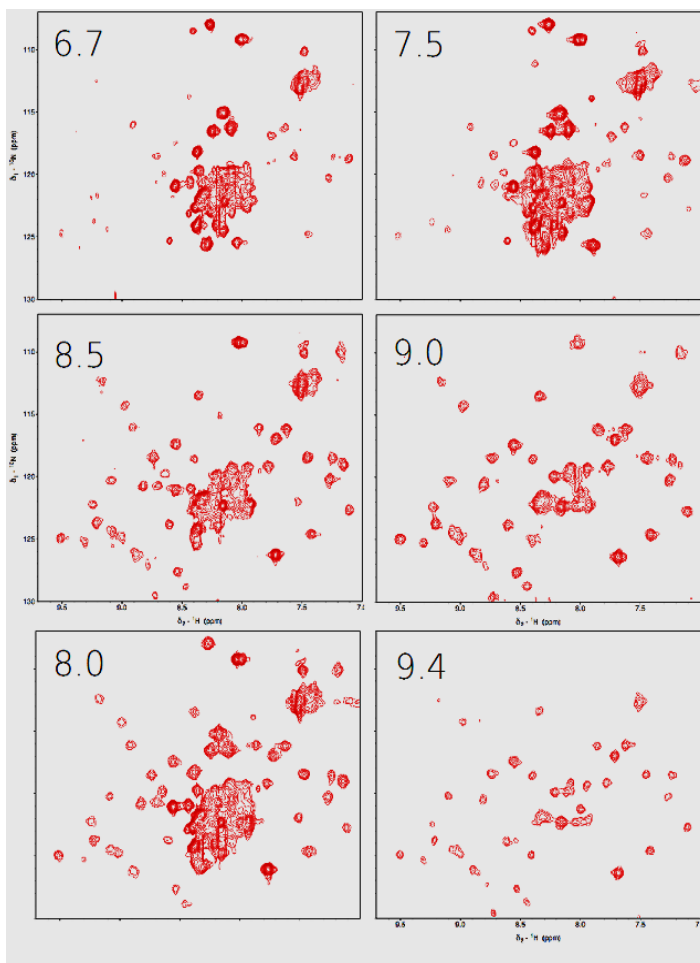


Figura 2 – Spettri 2D ^1H - ^{15}N SFHMQC registrati a pH differenti. Queste grandi variazioni degli spettri in funzione del pH sono indice di eterogeneità strutturale all'interno della proteina.