

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica

**Espressione e purificazione di mutanti della proteina
E7 del Papilloma Virus Umano**

Expression and purification of mutants of E7 protein from
Human Papilloma Virus

Relatore:

Prof.ssa Roberta Pierattelli

Tesi di Laurea di:

Niccolò Sciortino

Anno Accademico 2011/2012

Indice:

1. Introduzione	
1.1 Il virus del papilloma umano.....	4
1.2 La proteina E7 dallo HPV16.....	5
1.3 Incidenza e rischio.....	8
1.4 Motivo dello studio dell'E7.....	10
2. Scopo del lavoro	
2.1 Analisi dei metodi di purificazione.....	11
2.2 La mutazione.....	12
3. Materiali e Metodi	
3.1 Purificazione con IMAC contenente Ni.....	13
3.2 PD 10 test e purificazione IMAC con Zn.....	14
3.3 Mutagenesi	
3.3.1 Disegno primer, sequenze DNA.....	15
3.3.2 PCR.....	16
3.3.3 Trasformazione.....	17
3.3.4 Purificazione plasmidi.....	18
3.3.5 Induzione.....	20
3.3.6 Purificazione.....	21
3.3.7 Spettroscopia NMR.....	22
3.4 Disegno primer regione CR3.....	23
4. Risultati.....	25
5. Conclusioni.....	32
6. Prospettive.....	33
7. Bibliografia.....	34

1) Introduzione

Molte proteine funzionali o loro segmenti sono prive di una struttura secondaria o terziaria stabile ed esistono come insiemi molto dinamici di conformazioni. Queste proteine sono conosciute con nomi differenti tra cui uno dei più utilizzati è intrinsecamente disordinate. Analisi bioinformatiche hanno rivelato che le IDP¹ comprendono una larga frazione di differenti proteomi e quindi sono parte importante e rilevante per quanto riguarda lo studio e la comprensione dei processi biochimici. A questa tipologia di proteine sono state associate numerose funzioni a livello biochimico: il riconoscimento molecolare, la segnalazione molecolare e la regolazione^[1]. Le proteine disordinate presentano strutture in gran parte estese ed esposte, e spesso presentano brevi segmenti di aminoacidi che rendono la proteina capace di interagire con diversi partner. Questi brevi segmenti vengono denominati SLiMs^[2], acronimo di *Short Linear Motifs*. E' stato proposto che la presenza di SLiMs sia particolarmente rilevante per i virus, ed in particolare quelli con un genoma capace di esprimere solo un numero limitato di proteine, che necessitano di modi semplici per interferire con le funzioni della cellula ospite^[2].

¹ Intrinsically disordered protein

1.1) Il virus del papilloma umano

Il virus del papilloma umano (HPV²) (Figura 1) ha un genoma a doppio filamento di DNA codificante nove proteine^[3,4] (Figura 2). Queste infettano il tessuto epiteliale squamoso stratificato della cute e della mucosa e sono suddivisi in virus a basso rischio (LR) e ad alto rischio (HR), in dipendenza della malignità della patologia. I primi possono causare l'insorgere di verruche genitali

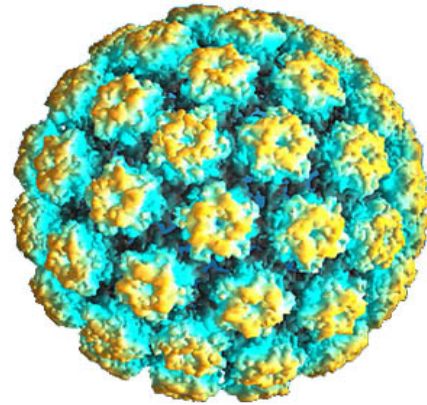


Figura 1) Modello del virus del papilloma umano

benigne mentre gli ultimi sono implicati nello

sviluppo di carcinomi del tratto genitale, della testa, del collo e dell'epidermide.

Le proteine codificate dallo HPV hanno diverse funzioni: le proteine E1 ed E2 sono coinvolti nella replicazione virale e nella regolazione della trascrizione

precoce. E1 si lega all'origine della replicazione e presenta ATPasi (classe di enzimi che catalizza una specifica reazione grazie all'energia ricavata dall'idrolisi di ATP in ADP e P) nonché attività elicastica (capace aprire e "srotolare" il DNA), mentre E2 forma un complesso con E1,

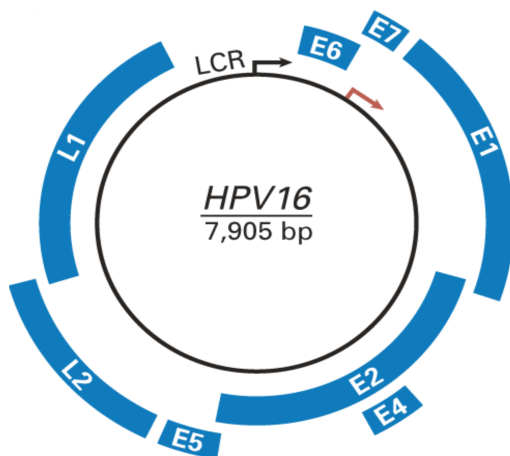


Figura 2) Proteine espresse dal codice genetico del virus

facilitando il suo legame all'origine della

replicazione del virus. E4 è la proteina più espressa nel ciclo di vita produttivo dello HPV e svolge una serie di ruoli importanti nel promuovere la

² Human papilloma virus

differenziazione e la dipendenza della fase produttiva del ciclo virale. La proteina E5 ha deboli capacità di trasformazione in vitro, supporta funzioni HPV *late*³ e disturba la maturazione dei geni implicati nel riconoscimento degli antigeni da parte del sistema immunitario. L1 è la principale proteina capside e L2 è la proteina capside minore. Arriviamo infine alle ultime due proteine: E6 e E7.^[17] Esse sono le principali responsabili della progressione maligna della cellula, che porta in ultima analisi, ad un carcinoma invasivo.^[5] Le proteine E6 ed E7 funzionano come oncoproteine nei HPV ad alto rischio, prendendo di mira i regolatori del ciclo cellulare p53 e pRb, rispettivamente.

In questo lavoro di tesi abbiamo studiato la proteina E7 espressa dalla variante 16 della HPV, un fenotipo particolarmente maligno.

1.2) La proteina E7 da HPV16

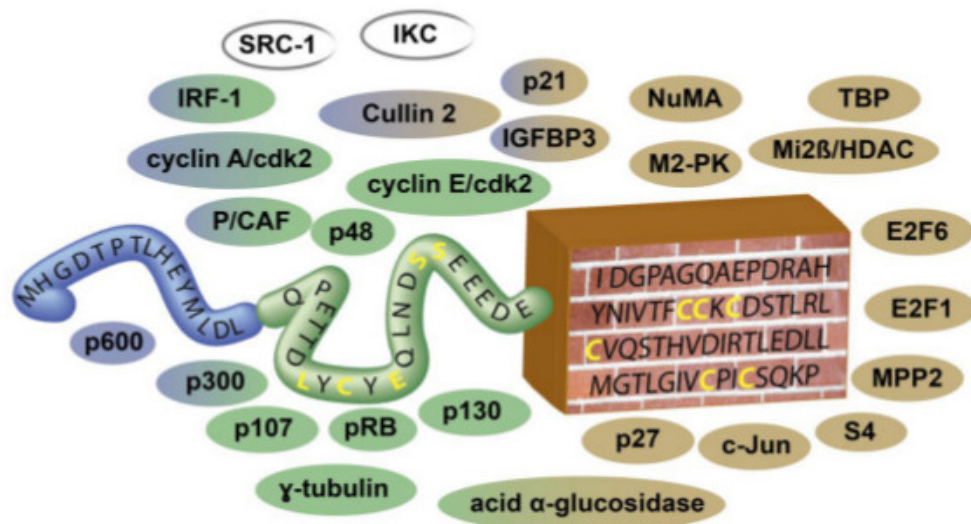


Figura 3) Sintetico schema che descrive l'E7 e le proteine umane con le quali interagisce, interferendo con molti processi biologici.

³ funzioni relative alle proteine tardive L1 e L2 aventi compiti strutturali

HPV16 è conosciuto per essere il ceppo virale più cancerogeno e l'E7 gioca un ruolo chiave nell'infezione, interferendo nella crescita cellulare e nella trasformazione, nella trascrizione del gene, nell'apoptosi, nella trascrizione del DNA e in molti altri processi [6] (Figura 3).

L'E7 è una proteina composta da 98 aminoacidi (peso molecolare di circa 12kDa) che condivide sequenze e caratteristiche funzionali con proteine come l'adenovirus E1A e l'antigene T del Simian Virus di tipo 40 (SV40)[7]. Sulla base di questa somiglianza, la proteina E7 può essere suddivisa in tre regioni strutturalmente conservate: CR1 (aminoacidi 2-15), CR2 (aminoacidi 16-38) e CR3 (aminoacidi 39-98) [8].



Figura 4) Modello della parte C-terminale della proteina E7 che lega uno ione Zn(II)

Sebbene l'omologia strutturale e funzionale tra E7 e E1A sia limitata al lato N-terminale, entrambe le proteine condividono la capacità di legare Zn²⁺ attraverso il C-terminale. Nella proteina E7 questa peculiarità è dovuta alla presenza di due motivi Cys-X-X-Cys (Figura 4) separati da 29-30 residui. Il dominio del legame con lo Zn sembra essere responsabile della capacità di dimerizzare/oligomerizzare dell'E7.

Le interazioni più rilevanti della E7 sono quelle stabilite con le proteine della famiglia del retinoblastoma (Rb) appartenenti alle "pocket proteins", ovvero una famiglia di proteine che regolano il ciclo cellulare: pRb [9], p107 e p130 [10].

E7 si lega alla pRb tramite un motivo LXCXE, presente nella regione non strutturata della proteina, che rappresenta il sito di legame canonico per le *pocket proteins*. Questo motivo è comune a molte altre proteine cellulari che interagiscono con il Rb e a altre oncoproteine virali capaci di inattivare funzionalmente la pRb, come l'adenovirus E1A e il T-antigene del Simian Virus 40. [10,11,12] Come detto in precedenza il motivo LXCXE appartiene alla regione senza

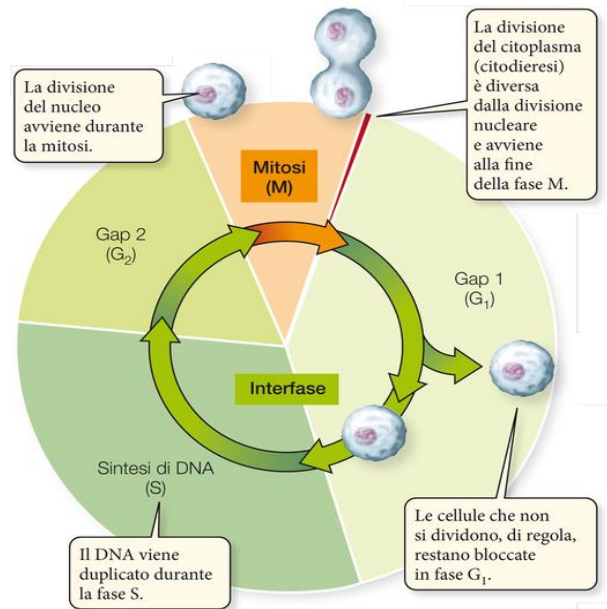


Figura 5) Schema delle fasi del ciclo cellulare

struttura, in particolare a CR2, questa porzione di proteina è altamente flessibile. La presenza di questo motivo che funge da sito di legame in una posizione così mobile, può rappresentare un modo per mantenere il sito di legame della pRb sempre accessibile alla pRb stessa. pRb gioca un ruolo cruciale nel ciclo cellulare attraverso l'interazione con i membri della famiglia dei fattori di trascrizione E2F^[13,14]. Gli E2F sono eterodimeri contenenti un E2F (E2F1-8) e subunità DP (DP-1, DP-2) e sono regolatori critici di passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare (Figura 5). Quando pRb è legata a E2F, il complesso agisce come soppressore della crescita cellulare. Si può facilmente giungere alla conclusione che l'azione di inibizione di un fattore di inibizione (pRb) da parte dell'E7 comporta una situazione di replicazione incontrollata caratteristica delle situazioni tumorali. In generale la presenza del motivo LXCXE è sufficiente per poter legare pRb, ma molti dati suggeriscono che altre regioni dell' HPV16 E7 sono coinvolte nel

legame con pRb. Un generico peptide contenente la sequenza LXCXE è circa 100 volte meno efficiente dell'intera proteina E7 nell'inibire pRb.^[13] E' stato inoltre dimostrato che i fattori E2F non contengono un motivo LXCXE e i siti di legame dell'E7 nel *pocket domain* della pRb non si sovrappongono ma si legano in due siti differenti. Pertanto, la presenza del motivo di legame LXCXE dell'E7 non può spiegare "da solo" né l'associazione né l'inattivazione funzionale della pRb ed è di primaria importanza riuscire a studiare la proteina nel suo insieme.

1.3) Incidenza e rischio

Come detto precedentemente, sappiamo che gli HPV sono agenti causanti papillomi benigni e sono fattori di rischio per lo sviluppo di carcinomi^[15]; il cancro da HPV rappresenta fino al 15% del totale dei tumori nelle donne e fino al 5% negli uomini^[16]. Quasi il 100% dei casi di cancro alla cervice è attribuibile all'HPV di tipo 16, 18, 31 e 45. In particolare, il cancro cervicale è il secondo tumore più comune tra le donne, la prima causa di morte per cancro nelle donne e rappresenta un quinto di tutti i decessi per cancro con 550'000 casi all'anno e fino a 270'000 decessi/anno. Per i tumori associati allo HPV è stato parzialmente realizzato un programma di diagnosi precoce e terapia con l'introduzione di programmi di Pap test, che ha causato una diminuzione del 70% dei casi di cancro del collo dell'utero e successivamente grazie allo sviluppo di vaccini profilattici, che potenzialmente procurano una riduzione supplementare del 70%. Questi vaccini, tuttavia, non hanno efficacia terapeutica in soggetti che sono già stati infettati, e ci vorranno decenni prima che questi vaccini abbiano un impatto misurabile sui tassi di incidenza dei tumori associati allo HPV. Inoltre, non è chiaro se altri tipi di HPV ad alto rischio, per cui

momentaneamente non si studia un vaccino, riempiranno il vuoto lasciato dalla eliminazione dei tipi vaccinati attualmente prevalenti: HPV16 e HPV18. [6]

(Figura 6)

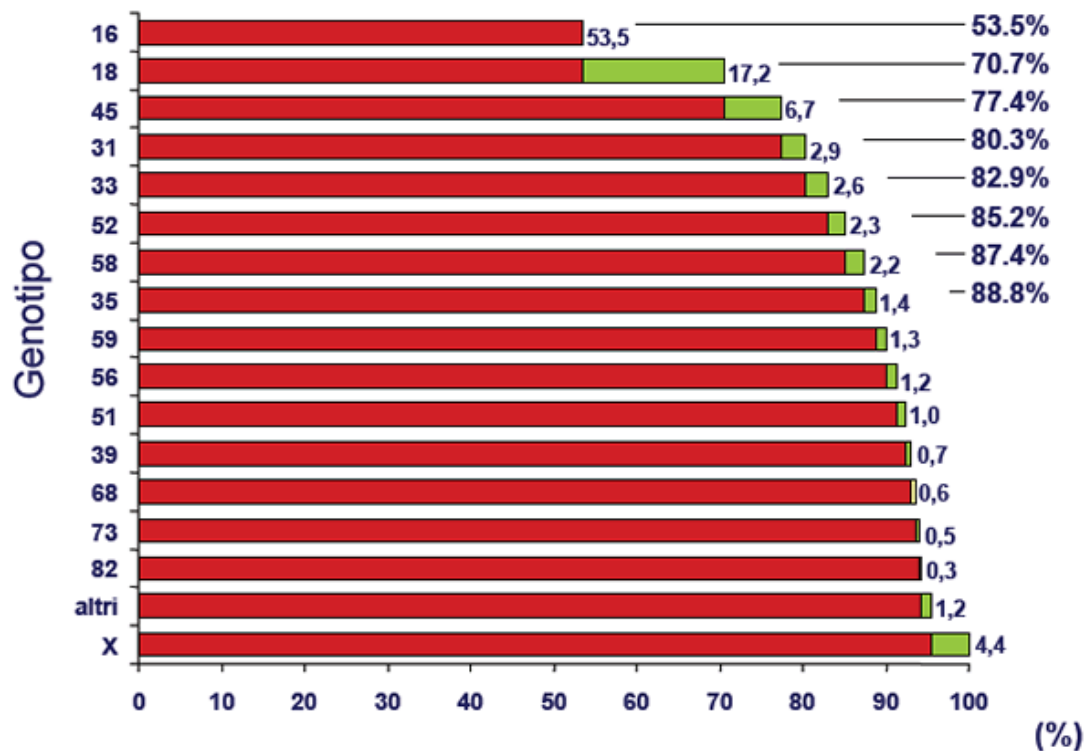


Figura 6) Casi di carcinoma alla cervice attribuiti ai genotipi di HPV

Il problema più importante, tuttavia, è che il costo elevato degli attuali vaccini vieta il loro uso in situazioni isolate, dove, a causa di uno screening inadeguato, i tumori associati allo HPV sono particolarmente diffusi. Di conseguenza, la ricerca di base finalizzata allo sviluppo di strategie terapeutiche per i tumori associati allo HPV deve continuare ad essere una priorità assoluta.

Per una terapia mirata contro il cancro, lo studio delle oncoproteine dell' HPV rappresenta la scelta più interessante dato che è stato provato che esse sono le responsabili principali dello sviluppo della trasformazione maligna.

1.4) Motivi dello studio dell'E7

A causa dell'implicazione profonda della E7 nella oncogenesi, l'inibizione dell'attività di questa proteina potrebbe essere un approccio efficace per bloccare il processo di trasformazione maligna. Inoltre la proteina E7 ha il vantaggio di essere espressa solo in cellule HPV-positive pertanto è un target specifico e per le cellule pre-cancerose e cancerose, senza alcun effetto sulle altre cellule. Attualmente la caratterizzazione strutturale della parte C-terminale della proteina, che contiene un motivo di legame con lo Zn (due frammenti CXXC), è stata ottenuta per brevi costrutti comprendenti solo la parte C-terminale della variante HPV1 mediante raggi X^[14] e per la variante HPV45 attraverso NMR^[18], le due tecniche principali per accedere alle informazioni di risoluzione atomica di proteine. Tuttavia la proteina intera, anche per le varianti 1 e 45 del virus, non ha dato cristalli e/o non è stata completamente caratterizzata tramite NMR. Molti studi biofisici sono stati condotti sulla forma dell'E7 di HPV16, sia sulla proteina intera che su piccoli costrutti, fornendo informazioni interessanti. Ad oggi, nonostante i tentativi di caratterizzazione sia con NMR che con raggi X, , nessun dato di strutturale ad alta risoluzione è disponibile sull'intero costrutto della E7. Ed è quindi di interesse cercare le migliori condizioni sperimentali per caratterizzare la struttura e la dinamica della E7 da HPV16.

2) Scopo del lavoro

Gli scopi di questo lavoro sono principalmente due: analizzare possibili differenze nel metodo di purificazione con colonna cromatografica a chelazione metallica e realizzare l'espressione di mutanti della proteina E7 del papilloma virus umano con successiva purificazione con metodi alternativi alla cromatografia.

2.1) Analisi dei metodi di purificazione

Per la purificazione della proteina E7 si può utilizzare una colonna cromatografica a chelazione metallica, previa mutazione proteica con inserimento di una coda di istidine. Solitamente è utilizzata una colonna contenente Ni^{2+} all'interno della matrice. Il nostro obiettivo è verificare se durante la purificazione possa avvenire uno scambio del metallo tra la matrice della colonna e la proteina stessa, che contiene un sito di legame per lo ione Zn(II) . Si effettua un test di gradiente di concentrazione di imidazolo per trovare le condizioni adatte all'utilizzo dello ione Zn(II) con l'utilizzo di una colonna PD10 e la nostra proteina pura. Alla fine si confronterà la proteina eluita in questo processo con la precedente. In questo modo se avvenisse lo scambio del metallo si noterebbero differenze in uno spettro NMR.

2.2) La mutazione

La mutazione consiste nel taglio, attraverso l'utilizzo di *primers* specifici precostruiti, della coda di istidine presente sulla nostra proteina iniziale. La coda era stata espressa per rendere possibile la purificazione attraverso la colonna cromatografica, avendo le istidine una buona affinità con determinati ioni metallici. Il processo di mutazione prende il nome di mutagenesi ed è stato effettuato al fine di verificare che la coda di istidine non interferisca con il cluster $Zn^{2+}/Cys-X-X-Cys$ presente nella regione C-terminale della E7 molto esposto ad attacchi esterni.

Inoltre, a conclusione del lavoro abbiamo “disegnato” dei *primers* per una possibile futura espressione della sola regione *CR3* della proteina E7, ovvero solo la parte strutturata, così da constatare le possibili differenze dovute alla presenza del “disordine” e per verificare se questo agisce in modo significativo sulla funzione della proteina.

3) Materiali e Metodi

3.1) Purificazione con IMAC⁴ contenente Ni

- Pompa peristaltica.
- Colonna IMAC (volume max 5 ml) con Ni²⁺
- Tampone: 10 mM HEPES⁵ a pH 8.5, 50 mM KCl, 10 mM DTT⁶.



Figura 7) HiTrap IMAC FF 5ml (G&E)

La colonna contiene una matrice di NTA⁷, su questa è caricato il Ni²⁺ tramite *reloading* (*lavaggio in continuo*) di una soluzione di un sale di Ni(II). La colonna assume una colorazione azzurra. Anche il lisato contenente la proteina da purificare è caricato in colonna attraverso un *reloading*.

Si lava la colonna con imidazolo a gradiente di concentrazione crescente (10 e 50 mM), in modo da eliminare le impurezze non legate in colonna.

Si eluisce la proteina con imidazolo 200 mM. Si verifica la presenza di proteina con reattivo di Bradford⁸.

⁴ Immobilized Metal ion Affinity Chromatography

⁵ Acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (C₈H₁₈N₂O₄S)

⁶ Ditioneitrato (C₄H₁₀O₂S₂), uno dei più forti agenti riducenti conosciuti in campo biologico e di laboratorio, in grado di rompere i ponti disolfuro sia della maggior parte delle proteine che dei composti organici, anche a temperatura ambiente.

⁷ Acido nitriloacetato, chelante per gli ioni metallici

⁸ Colorante che forma forti complessi non covalenti con le proteine tramite interazioni elettrostatiche. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di proteina.

La frazione contenente la proteina E7 è caricata su una colonna di dissalazione PD10⁹ ed equilibrata con tampone 10 mM HEPES a pH 8.5, 50 mM KCl, 10 mM DTT. Successivamente è stata raccolta nel nuovo tampone e concentrata fino 500 µL

3.2) PD 10 test e purificazione IMAC con Zn(II)

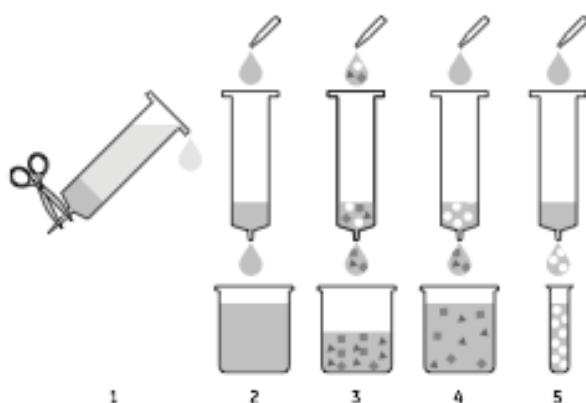


Figura 8) Meccanismo di funzionamento della PD10 His GraviTrap (G&E)

Pompa peristaltica; Colonna PD10 His GraviTrap con Zn²⁺;

Tampone 50 mM di Na₂HPO₄, 300 mM di NaCl, 1mM DTT a pH 8,0; Tampone di lavaggio 50 ml con 10mM imidazolo; Tampone lavaggio 50 ml con 25mM imidazolo; Tampone di eluizione 25 ml con 250 mM di imidazolo

Purificazione con IMAC contenente Zn

Pompa peristaltica; Colonna IMAC con Zn²⁺. Metallo caricato per *reloading* con ZnCl₂ per 1-2 h; Tampone 50 mM di Na₂HPO₄, 300 mM di NaCl a pH 8,0

⁹ Colonna di dissalazione, è una colonna che si utilizza per cambiare il tampone e quindi la concentrazione di sale della soluzione in cui si ha il campione di proteina.

Successivamente si effettua uno spettro NMR della proteina purificata con questo processo.

3.3) Mutagenesi

Delezione della coda di 6 istidine. Si

è utilizzato il “QuickChange Multi

Site-Directed Mutagenesis Kit”

3.3.1)

Si è partiti dalla sequenza originale già presente all’interno di un plasmide pET20b (Figura 9):

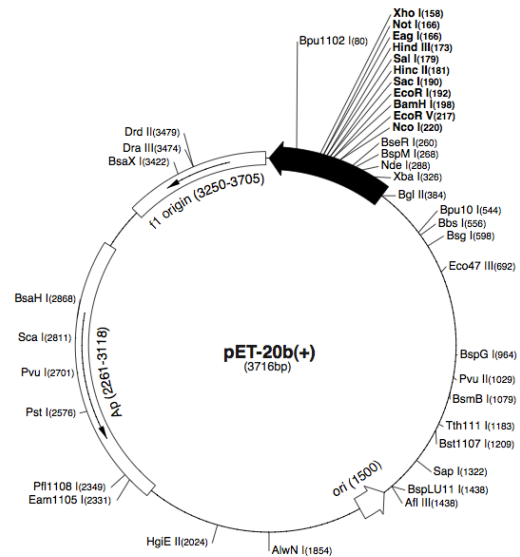


Figura 9) Plasmide pET20b

**MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLN
DSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCC
KCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGI
VCPICSQKPLEHHHHHH**

Di cui il DNA corrispondente è:

5'ATGCACGGAGATACACCAACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGA
CAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAAGATGAA
ATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCATTACAATATTGTAACC
TTTTGTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGAC
ATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGT
TCTCAGAAACCA**CTCGAGCACCACCACCACCAC** 3'

Sostanzialmente il “taglio” avviene includendo nella sequenza di basi un codone di stop TAG¹⁰ situato prima della sequenza costituente la coda di istidine.

I primer utilizzati in questo processo di mutagenesi sono¹¹:

¹⁰ sequenza di basi non codificante per nessun amminoacido

¹¹ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>

- Forward, sequenza di basi per la lettura da 5' a 3'

5' GTTCTCAGAAACCATAGCTCGAGCACCACCACC 3', Temperatura di fusione = 80.0 °C

- Reverse, sequenza di basi per la lettura da 3' a 5'

5' GGTGGTGGTGCTCGAGCTATGGTTTCTGAGAAC 3'

Avente temperatura di fusione = 80.0 °C

Alla fine del processo di mutagenesi la proteina dovrà avere una sequenza di 98 amminoacidi con punto isoelettrico = 4.2

**MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNI
VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICSQKP**

Per ottenere una sufficiente quantità di materiale genetico al fine di esprimere la nostra proteina è necessaria effettuare un PCR¹².

3.3.2) PCR

Partendo da una concentrazione di 95ng/μL procediamo con la PCR calcolando le esatte quantità date dal protocollo:

Tampone	5 μL	
DNA	2 μL	Da 95ng/μL -> 20ng/μL
Primer FW	2,5 μL	
Primer RV	2,5 μL	
dNTPs	1 μL	Nucleotidi da polimerizzare
Turbo	1 μL	Polimerasi
H ₂ O	37 μL	Distillata

¹² PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (*amplificazione*) di frammenti di acidi nucleici. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

Si imposta sullo strumento l'andamento del gradiente di temperatura desiderato al fine di ottenere un buona resa (Figura 10).

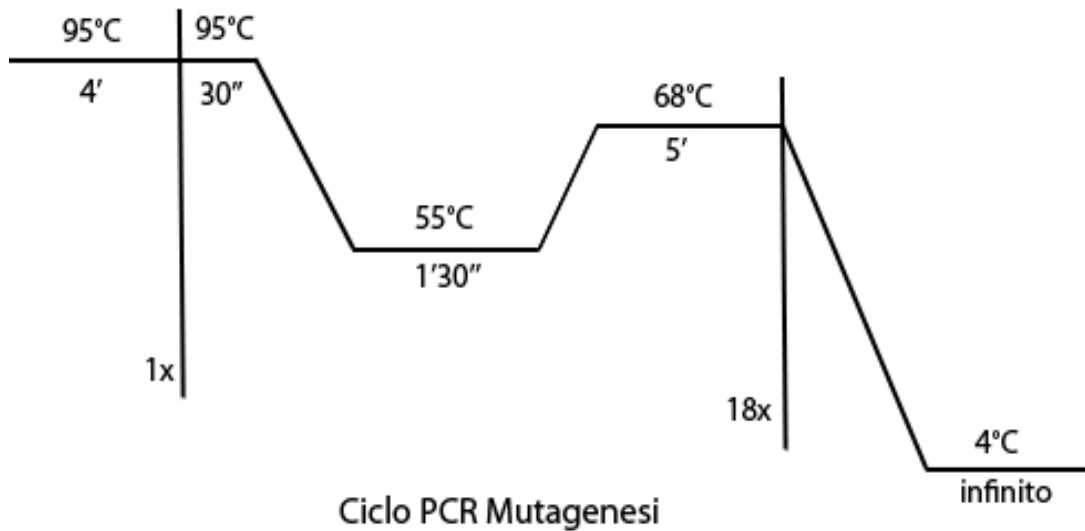


Figura 10) Profilo della temperatura della PCR

3.3.3) Trasformazione¹³

Si inserisce il plasmide nelle cellule di E.Coli.

Si fa raffreddare per 20-30 minuti in ghiaccio e dopo si opera uno shock termico a 42°C per 45" che rilassa le membrane cellulari affinché il plasmide entri.

In questo caso abbiamo utilizzato il ceppo di E.Coli DH5 α .

Si ripone in ghiaccio per 2'.

¹³ Replicazione di DNA estraneo in una cellula batterica

Si aggiunge il mezzo minimo SOC 450 μ L,

Conc.	Reagenti	100ml	500ml	250ml
0.5% w/v	Estratto di lievito	5 g	2.5 g	1.25 g
2% w/v	Tryptone	20 g	10 g	5 g
2.5mM	KCl	0.186 g	0.093 g	0.046 g
8.56mM	NaCl	0.5 g	0.25 g	0.13 g
20mM	MgSO ₄	0.95 g	0.48 g	0.24 g
20mM	Glucosio	3.60 g	1.80 g	0.9 g

e si pone in stufa per 1h a 37°C sotto agitazione.

Successivamente si pongono le cellule in una coltura contenente ampicillina. Si opera con bunsen acceso all'interno della cappa per sterilizzare. L'ampicillina è presente perché abbiamo utilizzato il plasmide pet20b che è resistente a questo antibiotico. In questo modo le nostre cellule sono le uniche che crescono.

Si ripongono le piastre di Petri in stufa a 37°C per 10-12 ore sempre sotto agitazione.

3.3.4) Purificazione dei plasmidi

I plasmidi ora necessitano di una purificazione, si è utilizzato un "Kit Nucleospin plasmid"¹⁴ (Macherey-Nagel).

Partendo da 10 ml di soluzione si centrifuga a 6000 rpm per 10' a temperatura ambiente.

¹⁴ le composizioni dei tamponi utilizzati sono presenti nel catalogo Macherey-Nagel

Si scarta la parte solubile e si tiene il *pellet* che viene risospeso con 500µL di tampone di risospensione e si pone la soluzione in un eppendorf da 2 ml. Si aggiunge il tampone di lisi e si mescola gentilmente 6-8 volte, si lascia riposare per 5' a temperatura ambiente. Si aggiunge il tampone di neutralizzazione e si mescola gentilmente. Si centrifuga a 11000 x g per 10' a temperatura ambiente. Si carica l'eppendorf contenente il filtro con max 750 µL di soluzione e si centrifuga a 11000 x g per 10' scartando ogni volta il filtrato e ripetendo fino a che non si è caricata tutta la soluzione. Adesso si opera un lavaggio della membrana con il tampone specifico 500 µL riscaldato precedentemente a 50°C, si centrifuga per 1' a 11000 x g. Si lava successivamente con 600 µL di un ulteriore tampone di lavaggio. Dopodiché sostituisco il *collection tube* con un eppendorf finale di raccolta. Centrifugo a vuoto senza tampone per seccare la membrana: 2' a 11000 x g. Eluisco i plasmidi purificati con H₂O distillata, 25 µL per 2 volte centrifugando a 11000 x g per 1'.

Successivamente alla purificazione si controlla la concentrazione al Nanovue¹⁵

ΔA -> 44,5 ng/µL

ΔB -> 59,5 ng/µL

Si opera una trasformazione in cellule di E.Coli, ceppo BL21-plys. A 50 µL di BL21-plys si aggiungono 2 µL di plasmide ΔA e ΔB in ghiaccio per 20'. Si opera uno shock termico alla temperatura di 42°C per 45". Si aggiungono 450 µL di SOC e si pone in stufa a 37°C per 1h.

¹⁵ spettrofotometro di facile utilizzo per la misurazione della concentrazione dell'acido nucleico e di campioni di proteine.

Depositiamo le cellule in piastre di Petri con antibiotico cloroamfenicolo e ampicillina e si ripongono queste in stufa per 14-16 ore a 37°C. Si raccolgono le colonie cresciute e si aggiungono 10 ml di mezzo minimo SOC all'interno di un *falcon* e si pone questo a 37°C per circa 12 ore.

3.3.5) Induzione

Si aggiungono i 10 ml di mezzo minimo SOC precedentemente preparato in 1 l di mezzo minimo M9 contenente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ arricchito con ^{15}N e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Le cellule vengono coltivate a 37 °C con agitazione costante finché la densità ottica a 600 nm non raggiunge un valore di 0,6-0,8 OD¹⁶. La produzione di proteina è indotta per aggiunta di IPTG¹⁷. Le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione dopo 4 ore di induzione. A questo punto le proteine, tra cui la nostra, sono state espresse e sono presenti all'interno delle cellule. Utilizzando un sonicatore¹⁸ si rompono le membrane cellulari e si centrifuga a lungo per separare la parte solubile da quella insolubile. Si effettua quindi una purificazione sulla parte solubile contenente la nostra proteina.

¹⁶ Optical density, è l'assorbanza, indice dello sviluppo dell'espressione

¹⁷ Isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside, zucchero utilizzato per indurre l'espressione di geni nei batteri

¹⁸ apparecchio che genera vibrazioni meccaniche in grado di rompere le membrane cellulari

3.3.6) Purificazione

Purificazione con cromatografia a scambio ionico (IEC)

Colonna utilizzata Hi Trap Q FF da 5mL

*Strong anion exchanger*¹⁹

Necessitiamo di questo tipo di purificazione data l'assenza della coda di istidine.

La colonna è stata equilibrata con tampone 10 mM HEPES a pH7.5, 300 mM di NaCl, , 10 µM ZnCl₂. Il lisato contenente la proteina è stato caricato in colonna per 30 minuti in *reloading*. La colonna è stata lavata con 100 ml di NaCl 300 mM e successivamente la proteina è stata eluita con 20ml di NaCl 500 mM.



Figura 11) HiTrap Q FF 5ml (G&E)

Purificazione con cromatografia a esclusione dimensionale (SEC)

Colonna: HiLoad 16/60; Superdex 75 pg

Pressione massima:

42 psi ; 10-50 cm/h; Flusso: 1.0 ml;

Volume: 120 ml

La colonna è stata equilibrata con

tampone 19mM HEPES a pH 7.5, 50 mM

KCl, 10 µM ZnCl₂.



Figura12) Colonna HiLoad 16/60 Superdex 75pg (G&E)

¹⁹ la matrice è "+" e la proteina è "-" se il pH è sopra il punto isoelettrico

20 ml di soluzione provenienti dalla IEC sono stati concentrati fino a 5 ml e sono stati caricati sulla colonna ad esclusione dimensionale. L'eluizione è stata condotta con un flusso di 1.5ml/min.

E' stata effettuata una seconda SEC alle stesse condizioni per ottenere la proteina più pura possibile.

3.3.7) Spettroscopia NMR

Gli esperimenti 1D e 2D ^1H - ^{15}N HMQC^[19,20] NMR sono stati tutti condotti a temperatura 298 K. Sono stati utilizzati spettrometri ad alto campo equipaggiati con criosonde: 800 MHz, 950 MHz, 700 MHz. I dati sono stati elaborati con TopSpin 2.0 e sono stati analizzati con il programma CARA^[21] e Sparky^[22]

- Spettri E7 IMAC Ni^{2+} : strumento 800 MHz, tampone 10 mM HEPES a pH 6.7, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.4, 150 mM KCl, 10 mM ZnCl_2 , 10 mM DTT, concentrazione 310 μM

- Spettro E7 IMAC Zn^{2+} : strumento 700 MHz, tampone 10 mM HEPES a pH 8.5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, concentrazione 400 μM

- Spettro E7 Δ His-tag: strumento 950 MHz, tampone 10 mM HEPES a pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, concentrazione proteina 475 μM

3.4) Disegno primer di regioni CR3 della proteina E7

L'obiettivo è esprimere solo la regione CR3 della proteina E7.

Costrutto 1

Questa è la sequenza originale nel plasmide pET20b:

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGLGIVCPICSQKPLEHHHHHH

Si vuole esprimere dal residuo A45 fino al residuo P98, il DNA finale sarà:

5'
GCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCT
ACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTG
TTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAGTAG 3'

Per il protocollo sono stati disegnati questi primer:

- FW2 primer (temperatura di fusione 63.6°C non considerando la sequenza CACCATG)

5' **CACC** GCA GAA CCG GAC AGA GCC C 3'

- RV primer (64.6°C non considerando i due codoni)

5' **CTA CTA** TGG TTT CTG AGA ACA GAT GGG GC 3',

Temperatura di fusione 64.6°C

Il costrutto finale costituito da 58 amminoacidi e avente punto isoelettrico = 6.0 sarà:

GSFTAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGLGIVCPICSQKP

COSTRUTTO 2

Sequenza originale all'interno del plasmide pET20b:

**MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNI
VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPLEHHHHHH**

Si vuole esprimere la proetina dal residuo R49 sino al residuo P98.

Il DNA corrispondente è:

5'
AGAGCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTG
TGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACA
CTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAGTAG 3'

Per usare il protocollo si disegnano i primer:

- FW3 primer (64.6°C senza considerare CACCATG)

5' **CACCT**GAGAGCCATTACAATATTGTAACCTTTTG 3',

Temperatura di fusione 64.6°C

- RV primer (64.6°C senza considerare i 2 codoni di stop)

5' **CTA CTA** TGG TTT CTG AGA ACA GAT GGG GC 3', Tm 64.6°C

Il costrutto finale avrà 54aa e punto isoelettrico = 7.8 con sequenza:

GSFTRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP

5) Risultati

Preparazione della colonna

La colonna è stata preparata mediante *reloading* di una soluzione di ZnCl₂.

E' stata poi lavata con tampone privo di imidazolo per 2 volte verificando sempre la presenza di proteina con reattivo di Bradford. Il terzo lavaggio è stato effettuato con tampone avente concentrazione di imidazolo 1mM. L'eluizione e quindi la raccolta della nostra proteina pura è stata effettuata con tampone avente concentrazione di imidazolo 250 mM. Le condizioni a cui effettuare la purificazione sono state ottenute mediante test con colonna PD10.

PD10 Test

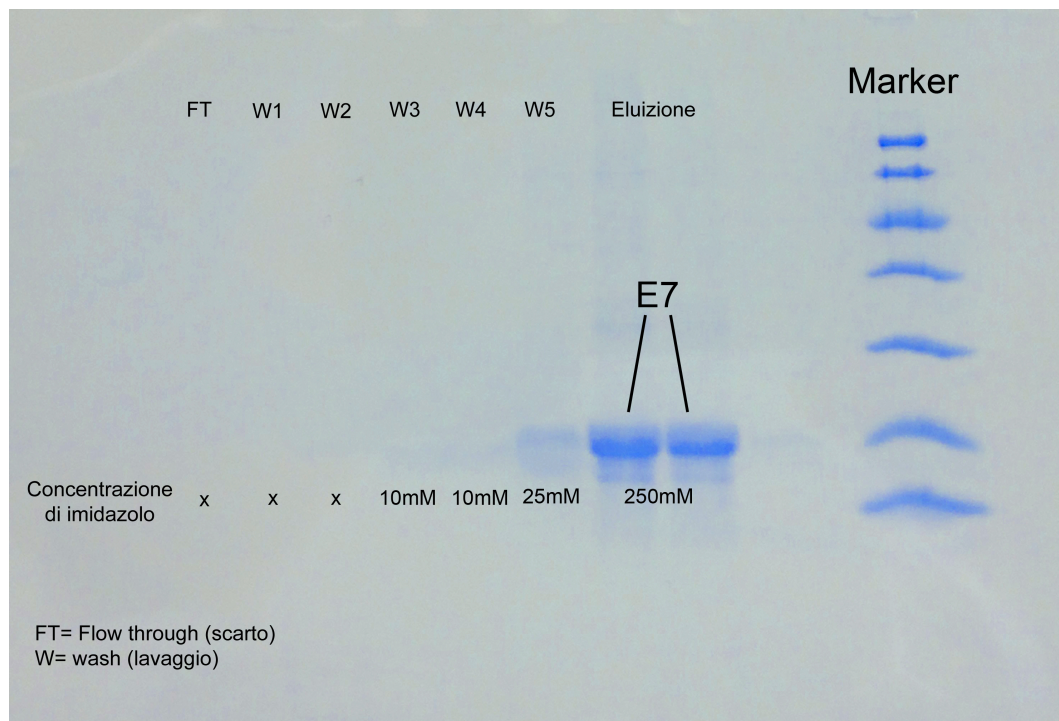


Figura 13) SDS-PAGE della proteina dopo PD10 di test

Dal gel di elettroforesi (SDS-PAGE²⁰) (Figura 13) si può determinare la corretta concentrazione di imidazolo per legare la nostra proteina in colonna e per eseguire i lavaggi. Si nota immediatamente che la proteina eluisce già ad una concentrazione di imidazolo molto bassa, a differenza di quando si utilizzava una IMAC con Ni(II). Questo indica la minore affinità a legare la coda di istidine dello Zn(II) e la necessità di utilizzare una concentrazione di imidazolo non elevata nel tampone di legame della colonna IMAC.

Si è deciso di utilizzare una concentrazione di imidazolo 1mM in colonna. Per l'eluizione si userà imidazolo 250mM, concentrazione a cui siamo sicuri che tutta la proteina eluisca nello stesso momento.

Purificazione con colonna IMAC di Zn²⁺

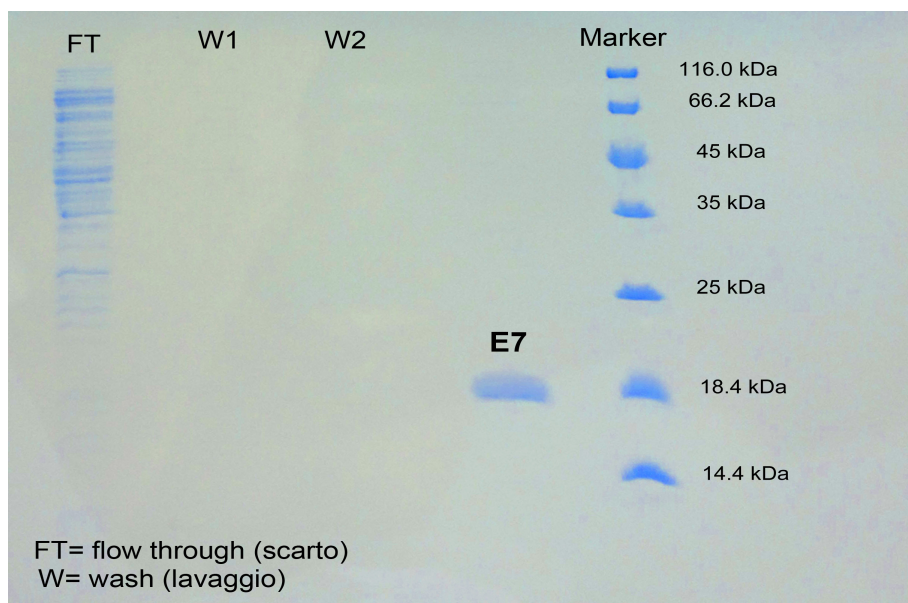


Figura 14) SDS-PAGE della proteina E7 separata dopo IMAC con Zn(II)

²⁰ SDS-PAGE: Elettroforesi su gel di poliacrilammide. Il sodio dodecilsolfato è il denaturante che rompe i legami deboli e i ponti disolfuro linearizzando la proteina. La componente anionica dell'SDS lega la catena peptidica. Questo conferisce una carica negativa alla proteina proporzionale alla sua massa. Questa carica negativa è significativamente maggiore alla carica elettrica originale. La repulsione elettrostatica che si viene a creare dal legame dell'SDS causa la denaturazione della proteina ad una struttura filiforme, eliminando le differenze di migrazione dovute alla differenza di struttura.

La separazione con colonna di Zn^{2+} è stata verificata attraverso SDS-PAGE e successiva colorazione con *Coomassie brilliant blue*.

Dal gel (Figura 14) emerge chiaramente la separazione tra le altre proteine presenti nelle cellule (FT) e la nostra E7 eluita tutta a concentrazione di imidazolo 250 mM. La proteina viene raccolta e concentrata fino a 500 μ L utilizzando un *falcon* concentratore in centrifuga.

Spettri NMR

Gli spettri NMR registrati sul campione preparato con la proteina E7 purificata con IMAC contenente $Zn(II)$ sono confrontati con precedenti esperimenti realizzati a differenti valori di pH (Figura 15)

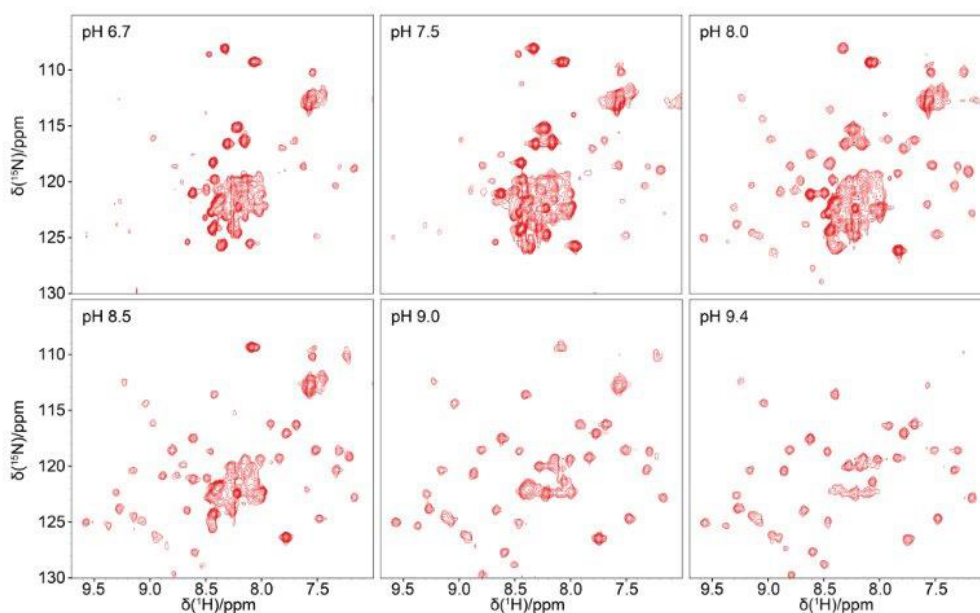
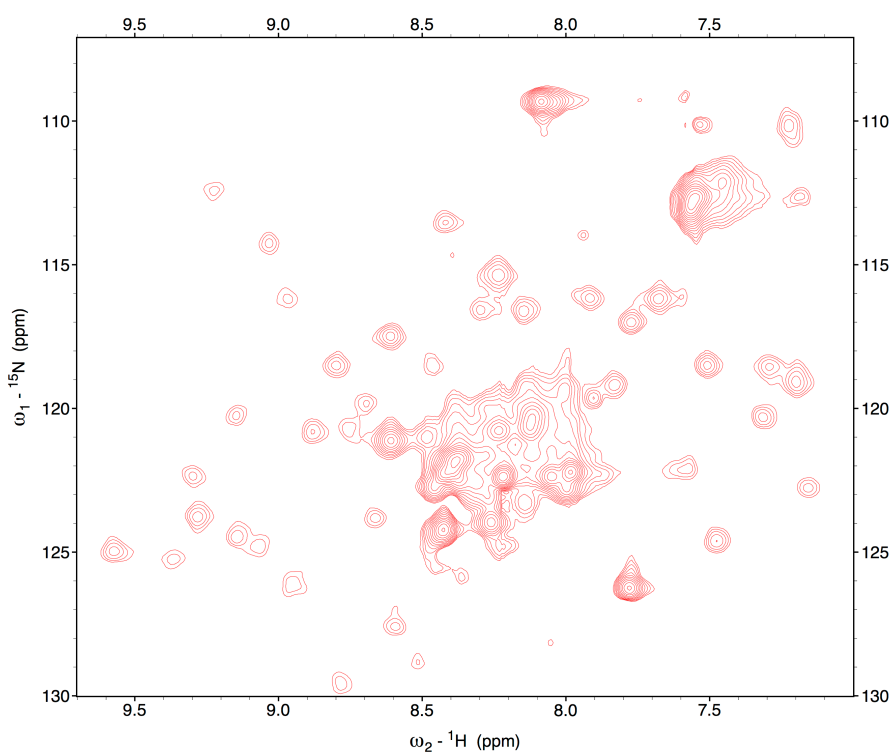


Figura 15) Spettri NMR eseguiti con campioni a differente pH della proteina E7 purificata con IMAC $Ni(II)$

Gli esperimenti precedenti sono relativi alla proteina espressa con l'aggiunta della coda di istidine e purificata con colonna IMAC contenente Ni(II). Si può constatare come il pH influenzi in modo significativo lo spettro NMR della E7.^[23]

Lo spettro NMR successivo alla purificazione con colonna IMAC contenente Zn(II) (Figura 16) non mostra significative differenze con lo spettro preso come campione di confronto a pH compreso tra 8-8.5 (Figura 15).



[Figura 16) Spettro NMR della E7 purificata con IMAC Zn(II)]

Mutagenesi

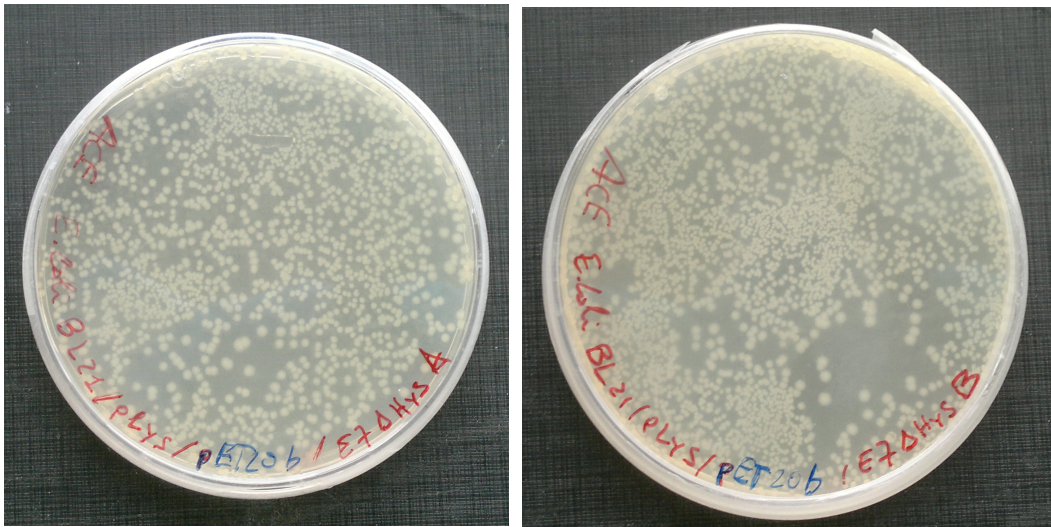


Figura 17) Crescita delle cellule finali del processo di mutagenesi, costruito A e B.

L'espressione del mutante della proteina E7 senza la His-tag in cellule di E.Coli DH5 α è andata a buon fine; successivamente il trasferimento dei plasmidi in E.Coli BL21-pLys ha comportato una crescita di un maggior numero di cellule (Figura 17). Le cellule poi raccolte in mezzo minimo SOC sono state poste in mezzo M9 per effettuare l'induzione dell'espressione tramite IPTG. Al raggiungimento della densità ottica 0,6-0,8 le cellule sono state raccolte, centrifugate e sonicate per rompere le membrane e avere a disposizione la nostra proteina E7, pronta per la purificazione.

Cromatografia a scambio ionico

Si è raccolta la frazione di interesse in seguito ad eluizione con imidazolo, che però, attraverso l'utilizzo di reattivo di Bradford come indicatore, non è risultata sufficientemente separata dalle altre frazioni. I controlli di presenza di materiale proteico effettuati attraverso reattivo di Bradford sono sempre risultati positivi,

è quindi impossibile affermare che la nostra proteina sia effettivamente separata dalle altre. Si è quindi effettuata anche una purificazione su colonna a esclusione dimensionale.

Esclusione dimensionale

Si è lavorato variando gradienti di sale eluente. Dalla letteratura comunque si è considerata la concentrazione a cui la proteina dovrebbe eluire.

Nella purificazione a esclusione dimensionale si è avuta una separazione significativa. (Figura 18)

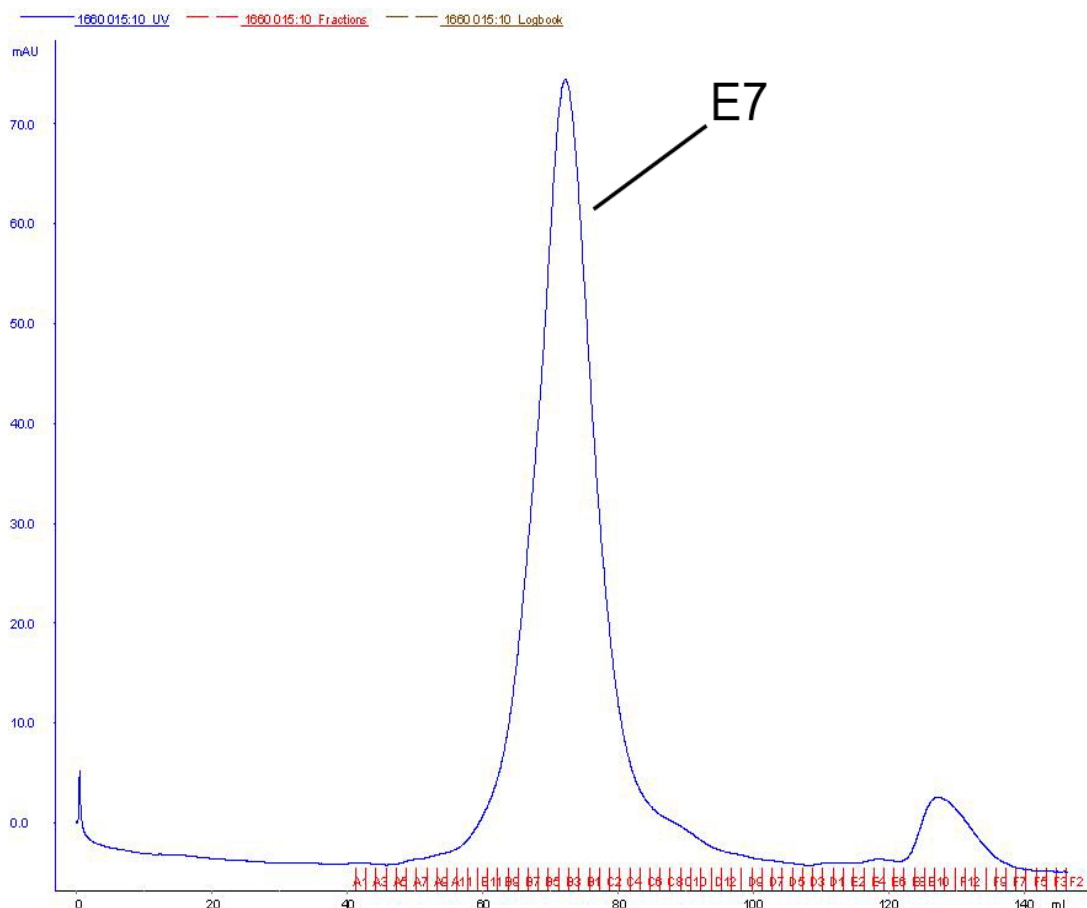


Figura 18) Grafico che illustra il picco di eluizione separato da altri picchi non sovrapposti.

La proteina E7 ha cominciato a eluire a circa 65 ml.

Il grafico mostra la decisa distanza tra i picchi di eluizione della nostra proteina e di altre proteine ancora presenti in soluzione. E' stato quindi possibile, previa concentrazione del campione, effettuare uno spettro NMR.

Spettro NMR E7 senza His-tag

Anche lo spettro NMR della proteina E7 priva di His-tag (Figura 19) confrontato con lo spettro campione a pH compreso tra 7.5- 8 (Figura 15) non evidenzia significative differenze tali da far ipotizzare un' interazione tra la coda e il sito di legame dello Zn.

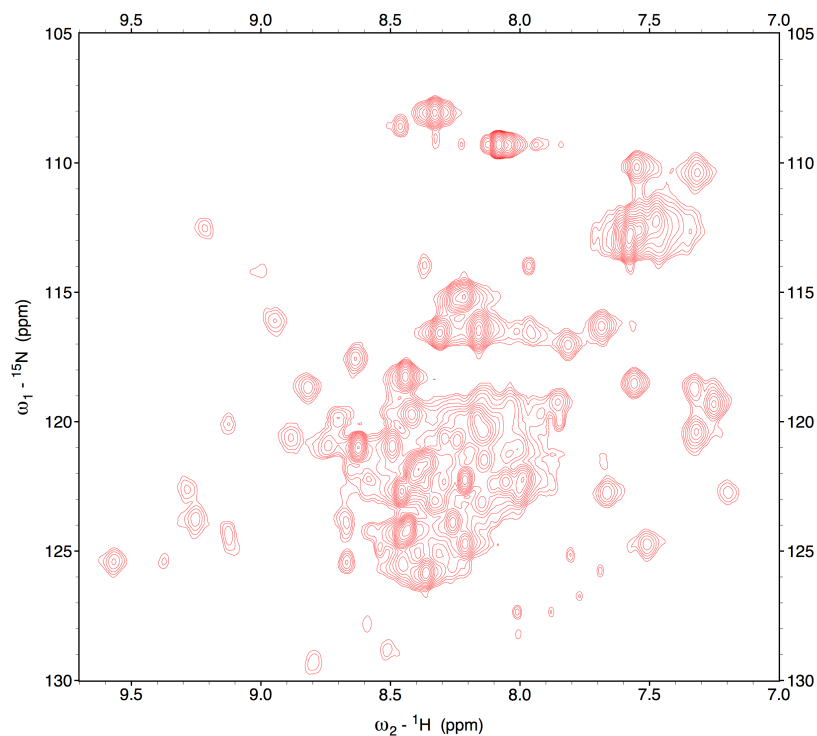


Figura 19) Spettro NMR della proteina E7 senza His-tag purificata con IC e SEC

Le lievi differenze, in entrambi i casi, sono dovute all'utilizzo di strumenti differenti, a campioni a diversa concentrazione e a pH intermedi, tra gli spettri di riferimento, della soluzione contenente la proteina.

5) Conclusioni

Questo lavoro ha permesso di verificare due importanti aspetti inerenti la purificazione della E7 da HPV 16 espressa in E.Coli, che viene svolta solitamente ingegnerizzando una coda di istidine al termine della sequenza amminoacidica naturalmente codificata. La coda di istidine ha infatti il ruolo di facilitare la purificazione ma in alcuni casi può interagire con la catena polipeptidica della proteina. Inoltre, la procedura di purificazione prevede il passaggio della E7 in una colonna cromatografica contenente Ni^{2+} , a cui la coda si lega, e che può interferire con eventuali siti di legame per ioni metallici presenti nella proteina.

Per quanto riguarda l'eliminazione della coda di istidine dal costrutto che avevamo a disposizione, questa è andata a buon fine e siamo riusciti ad esprimere la proteina con una sequenza identica a quella nativa. Il confronto fra gli spettri NMR della proteina con e senza coda indica che non ci sono significative differenze strutturali tra i due costrutti e la coda di istidine non interferisce significativamente con l'avvolgimento proteico o con il sito strutturale dello ione Zn presente nella E7.

Riguardo alla possibilità di uno scambio di ione metallico nel sito specifico dello ione Zn^{2+} durante la purificazione con colonna IMAC contenente Ni^{2+} , abbiamo stabilito che questo non avviene. Gli spettri NMR della proteina purificata

sostituendo lo ione Zn^{2+} allo ione Ni^{2+} è confrontabile con quello originale. Avendo il Ni^{2+} un'affinità molto maggiore dello ione Zn^{2+} con l'amminoacido istidina, operando con il Ni ci si può spingere a concentrazioni di imidazolo, o dello specifico agente eluente della colonna, maggiori. Questo permette di avere un intervallo di variazione del gradiente di concentrazione dell'imidazolo più esteso così da avere una maggiore separazione della proteina di interesse dalle altre proteine presenti in soluzione.

I dati raccolti portano alla conclusione che è più conveniente esprimere la proteina direttamente con una coda di istidine per purificare utilizzando la colonna IMAC che operare attraverso scambio ionico ed esclusione dimensionale nel caso di una E7 priva di coda. Inoltre conviene utilizzare la procedura usuale di funzionalizzazione della IMAC con Ni^{2+} . Questi due aspetti possono essere quindi inclusi nel protocollo generale di purificazione della proteina.

6) Prospettive

Visto che la E7 presenta regioni strutturalmente conservate che sembrano avere ruoli diversi nell'interazione della proteina con i molteplici partner fino ad ora identificati, sarà utile riuscire ad esprimerle separatamente e caratterizzarle indipendentemente per riuscire a comprenderne il ruolo funzionale. In questo lavoro abbiamo già iniziato a disegnare i costrutti per l'espressione del dominio CR3. Si tratta adesso di disegnare i costrutti per le altre regioni e metterne a punto l'espressione e la purificazione partendo dal protocollo messo a punto in questo lavoro.

7) Bibliografia

- [1] Felli, I. C.; Pierattelli, R.; Tompa, P. Intrinsically disordered proteins; Bertini, I., McGreevy, K. S., Parigi, G., eds. Wiley-Blackwell: 2012; pp 137-152.
- [2] Davey, N. E., Trave, G., and Gibson, T. J. How viruses hijack cell regulation. *Trends Biochem.Sci.* 2011, 36(3), 159-169.
- [3] Munger, K. *Front Biosci.* 2002, 7, 641-649.
- [4] Munger, K.; Baldwin, A.; Edwards, K. M.; Hayakawa, H.; Nguyen, C. L.; Owens, M.; Grace, M.; Huh, K. *J.Virol.* 2004, 78, 11451-11460.
- [5] Uversky, V.; Roman, A.; Oldfield, C.J; Dunker, K. *Journal of Proteome Research*, Vol. 5, No. 8, 2006
- [6] Donà, M. G. E7 Oncoprotein of Human Papillomavirus: Functions and Strategies of Inactivation for the Treatment of HPV-Associated Cancer; In *Oncogene Proteins: New Research*; Malloy, A. H., Carson, E. C., eds. 2008; pp 19-63.
- [7] Phelps, W. C.; Yee, C. L.; Munger, K.; Howley, P. M. *Cell* 1988, 53, 539- 547.
- [8] Gage, J. R.; Meyers, C.; Wettstein, F. O. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virol.* 1990, 64, 723-730.
- [9] Dyson, N.; Howley, P. M.; Münger, K.; Harlow, E. *Science* 1989, 243, 934- 937.
- [10] Dyson, N.; Guida, P.; Münger, K.; Harlow, E. *J Virol* 1992, 66, 6893-6902.
- [11] Dyson, N.; Guida, P.; McCall, C.; Harlow, E. *Journal of virology* 1992, 66, 4606-4611.
- [12] Chen, S.; Paucha, E. *Journal of virology* 1990, 64, 3350-3357.
- [13] Patrick, D. R.; Oliff, A.; Heimbrook, D.C. *The Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 6842-6850.
- [14] Liu, X.; Clements, A.; Zhao, K.; Marmorstein, R. *J.Biol.Chem.* 2006, 281, 578-586.
- [15] Zur Hausen, H. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1999, 111, 581-587.
- [16] Parkin, D. M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisano, E. *CA Cancer J Clin* 2005, 55, 74-108.

- [18] Ohlenschlager, O.; Seiboth, T.; Zengerling, H.; Briese, L.; Marchanka, A.; Ramachandran, R.; Baum, M.; Korbas, M.; Meyer-Klaucke, W.; Dürst, M.; Görlach, M. *Oncogene* 2006, 25, 5953-5959.
- [19] Schanda, P.; Kupce, E.; Brutscher, B. *J. Biomol. NMR* 2005, 33, 199-211.
- [20] Schleucher, J.; Schwendinger, M.; Sattler, M.; Schmidt, P.; Schedletzky, O.; Glaser, S. J.; Sørensen, O. W.; Griesinger, C. *J. Biomol. NMR* 1994, 4, 301-306.
- [21] Keller, R. L. J. *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*. (1.3). 2004. Cantina Verlag.
- [22] Goddard, T. D. and Kneller, D. G. *SPARKY 3*, University of California, San Francisco. 2000.
- [23] Calçada, E.; Hošek, T.; Felli, I., C.; Pierattelli, R. The heterogeneous structural behaviour of E7 from HPV16 revealed by NMR spectroscopy, proposta di pubblicazione su *ChemBioChem*
- [24] Huh, K.; Zhou, X.; Hayakawa, H.; Cho, J. Y.; Libermann, T. A.; Jin, J.; Harper, J. W.; Münger, K. *J. Virol.* 2007, 81, 9737-9747.
- [25] Zerfass, K.; Schulze, A.; Spitkovsky, D.; Friedman, V.; Henglein, B.; Jansen-Dürr, P. *J. Virol.* 1995, 69, 6389-6399.
- [26] Nguyen, C. L.; Münger, K. *Virology* 2008, 380, 21-25.
- [27] He, W.; Staples, D.; Smith, C.; Fisher, Ch. *J. Virol.* 2003, 77, 10566-10574.
- [28] Funk, J. O.; Waga, S.; Harry, J. B.; Espling, E.; Stillman, B.; Galloway, D. A. *Genes Dev.* 2013, 11, 2090-2100.
- [29] Jones, D. L.; Alani, R. M.; Münger, K. *Genes Dev.* 1997, 11, 2101-2111.
- [30] Zerfass-Thome, K.; Zwerschke, W.; Mannhardt, B.; Tindle, R.; Botz, J. W.; Jansen-Dürr, P. *Oncogene* 2013, 13, 2323-2350.
- [31] Huh, K. W.; DeMasi, J.; Ogawa, H.; Nakatani, Y.; Howley, P. M.; Münger, K. *PNAS* 2005, 102, 11492-11497.
- [32] Barnard, P.; McMillan, N. A. *J. Virology* 1999, 259, 305-313.
- [33] Barnard, P.; Payne, E.; McMillan, N. A. *J. Virology* 2000, 277, 411-419.
- [34] Mannhardt, B.; Weinzierl, S. A.; Wagner, M.; Fiedler, M.; Cohen, P.; Jansen-Dürr, P.; Zwerschke, W. *Mol Cell Biol* 2000, 20, 6483-6495.
- [35] Massimi, P.; Pim, D.; Storey, A.; Banks, L. *Oncogene* 1996, 12, 2325-2330.

- [36] Massimi, P.; Pim, D.; Banks, L. *J Gen Virol* 1997, 78, 2607-2613.
- [37] Antinore, M. J.; Birrer, M. J.; Patel, D.; Nader, L.; McCance, D. J. *EMBO J* 1996, 15, 1950-1960.
- [38] Hwang, S. G.; Lee, D.; Kim, J.; Seo, T.; Choe, J. *J Biol.Chem.* 2002, 277, 2923-2930.
- [39] McLaughlin-Drubin, M. E.; Huh, K. W.; Münger, K. *J Virol* 2008, 82, 8695-8705.
- [40] Lüscher-Firzloff, J. M.; Westendorf, J. M.; Zwicker, J.; Burkhardt, H.; Henriksson, M.; Müller, M.; Pirollet, F.; Lüscher, B. *Oncogene* 1999, 18, 5620-5630.
- [41] Zwerschke, W.; Mazurek, S.; Massimi, P.; Banks, L.; Eigenbrodt, E.; Jansen-Dürr, P. *PNAS* 1999, 96, 1291-1296.
- [42] Bernat, A.; Avvakumov, N.; Mymryk, J. S.; Banks, L. *Oncogene* 2003, 22, 7871-7881.
- [43] Huang, S. M.; McCance, D. J. *J Virol* 2002, 76, 8710-8721.
- [44] Brehm, A.; Nielsen, S. J.; Miska, E. A.; McCance, D. J.; Reid, J. L.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. *EMBO J* 1999, 18, 2449-2458.
- [45] Spitkovsky, D.; Hehner, S. P.; Hofmann, T. G.; Möller, A.; Schmitz, M. L. *J Biol.Chem.* 2002, 277, 25576-25582.
- [46] Baldwin, A.; Huh, K. W.; Münger, K. *J Virol* 2006, 80, 6669-6677.
- [47] Zwerschke, W.; Mannhardt, B.; Massimi, P.; Nauenburg, S.; Pim, D.; Nickel, W.; Banks, L.; Reuser, A. J.; Jansen-Dürr, P. *J Biol.Chem.* 2000, 275, 9534- 9541.
- [48] Nguyen, C. L.; Eichwald, C.; Nibert, M. L.; Münger, K. *J Virol* 2007, 81, 13533-13543.
- [49] Nguyen, C. L.; Münger, K. *J Virol* 2009, 83, 1700-1707.
- [50] Barbosa, M. S.; Edmonds, C.; Fisher, C.; Schiller, J. T.; Lowy, D. R.; Vousden, K. H. *EMBO J.* 1990, 9, 153-160.
- [51] Berezutskaya, E.; Bagchi, S. *J Biol.Chem.* 1997, 272, 20135-30140.
- [52] Park, J.-S.; Kim, E.-J.; Kwon, H.-J.; Hwang, E.-S.; Namkoong, S.-E.; Um, S.- J. *J Biol.Chem.* 2000, 275, 6764-6769.

Ringraziamenti

Ringrazio in primo luogo la professoressa Pierattelli per la disponibilità e la gentilezza mostrata nel periodo di tirocinio e di lavoro sulla tesi. Ringrazio inoltre la professoressa Felli. Ringrazio enormemente Eduardo per il lavoro di laboratorio insieme, per i problemi e i successi affrontati sempre con il sorriso. Ringrazio anche Tomas e tutti i ragazzi/e del CERM, sempre gentili e disponibili.