



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in
Chimica

**Studi molecolari in cellule
viventi:
in-cell NMR applicato a
mutanti SLA di SOD1**

**Molecular studies in living
cells:
in-cell NMR applies to SLA
mutants of SOD1**

Relatore
Roberta Pierattelli

Correlatore
Lucia Banci

Candidato
Matteo Bartolini

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	
2. Superossido Dismutasi (SOD)	
2.1. Superossido Dismutasi rame/zinco (Cu/Zn-SOD)	
2.1.1. <i>Folding</i> e ruolo della CCS	
2.1.2. Struttura	
2.1.3. Meccanismo di reazione	
2.2. Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)	
2.2.1. Mutazioni	
TECNICHE DI COLTURA CELLULARE	15
1. Condizioni di lavoro	
2. Clonazione e trasfezione	
3. Conta cellulare su camera di Burker	
4. Lisi cellulare	
5. Elettroforesi	
5.1. Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)	
5.1.1. Apparato	
5.1.2. Separazione e rilevazione	
5.2. Elettroforesi di DNA su gel di agarosio	
5.2.1. Separazione e rilevazione	
6. Western-Blot	
SCOPO DEL LAVORO	27
MATERIALI E METODI	28
1. Materiali	
1.1. Linea cellulare	

1.2. Plasmidi	
1.3. Enzimi di restrizione	
1.4. Primer	
2. Metodi	
2.1. Culture di cellule di mammifero	
2.1.1. Passaggio cellule	
2.2. Clonaggio DNA mutante	
2.2.1. Estrazione del gene Mut-SOD1 [V7E]	
2.2.2. Creazione del plasmide ricombinante	
2.2.3. <i>Colonies screening</i>	
2.3. Trasfezione in cellule HEK293T	
2.3.1. Mut-SOD1 [V7E] + Zn ²⁺ + Cu ²⁺ + CCS	
2.3.2. Mut-SOD1 [V7E] + Zn ²⁺	
2.4. Spettroscopia <i>in-cell NMR</i>	
2.5. Verifiche di espressione	
2.5.1. Viability	
2.5.2. Western-Blot	
RISULTATI e DISCUSSIONE	40
1. Spettri NMR	
1.1. V7E-SOD1 + Zn ²⁺	
1.2. V7E-SOD1 + Zn ²⁺ + Cu ²⁺ + CCS	
2. <i>Viability</i>	
3. Western-Blot	
CONCLUSIONI	48
BIBLIOGRAFIA	49
APPENDICE 1	51

INTRODUZIONE

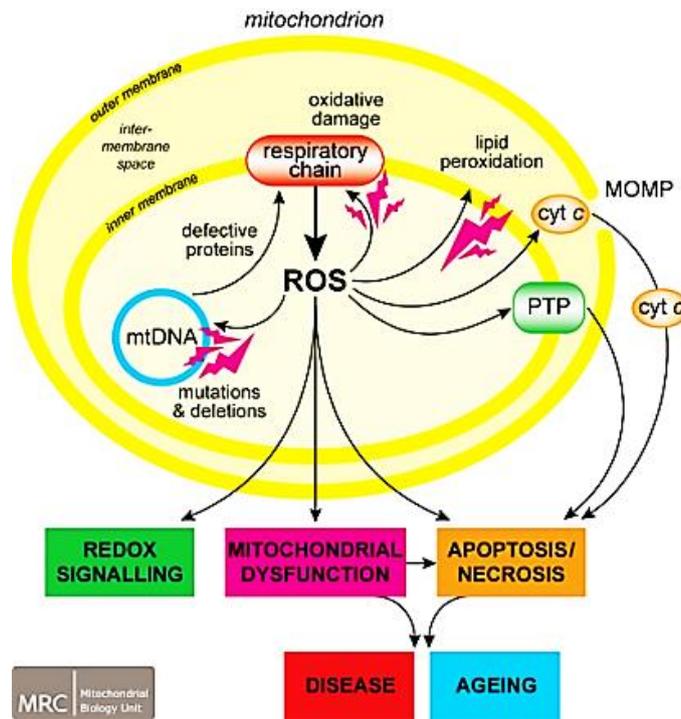
La tecnica *in-cell NMR* offre la portentosa possibilità di studiare la struttura e, soprattutto, le interazioni delle proteine all'interno di cellule viventi. Questo approccio, che permette lo studio delle molecole necessarie alla vita in condizioni del tutto simili a quelle fisiologiche, ha aperto la strada all'analisi ed alla comprensione dei processi e dei meccanismi alla base della vita cellulare.

1. Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Le specie reattive dell'ossigeno (O_2^- , H_2O_2 , $\bullet OH$) sono i radicali liberi di maggior diffusione. Sono molecole che possiedono un elettrone spaiato sull'orbitale più esterno e questa configurazione elettronica le rende altamente instabili e particolarmente reattive. I radicali liberi reagiscono facilmente con una qualsiasi molecola si trovi in loro prossimità (carboidrati, lipidi, proteine, acidi nucleici) danneggiandola e, spesso, compromettendone la funzione; inoltre, reagendo con altre molecole, hanno la capacità di autopropagarsi trasformando a loro volta i bersagli in radicali liberi e scatenando così reazioni a catena che possono provocare estesi danni nella cellula. In condizioni normali ciascuna cellula produce radicali liberi tramite vari processi, come reazioni enzimatiche, fosforilazione ossidativa, risposta immunitaria. Queste piccole quantità sono tollerate e vengono inattivate da sistemi enzimatici, detti *scavenger* per la loro capacità di neutralizzare i radicali liberi. Quando la produzione di radicali liberi è eccessiva si genera ciò che viene chiamato *stress ossidativo*: i sistemi enzimatici e gli antiossidanti intracellulari non riescono più a far fronte alla sovrapproduzione e i radicali liberi danneggiano la cellula sia in modo reversibile, in tal caso la cellula torna alle condizioni normali, sia irreversibile, con conseguente morte cellulare per apoptosi o per necrosi. Le più comuni e pericolose reazioni che i ROS innescano sono l'ossidazione di acidi grassi polinsaturi, amminoacidi e cofattori (inibendo gli enzimi associati) e le reazioni radicaliche sul DNA.

Lo ione superossido O_2^- , sul quale agisce l'enzima superossido dismutasi (SOD), è il prodotto della riduzione mono-elettronica della molecola di ossigeno (O_2). Negli eucarioti, la fonte principale è

rapresentata dalla membrana mitocondriale interna, dove viene prodotto dalla riduzione incompleta di O₂ durante la fosforilazione ossidativa.

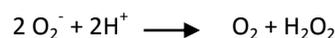


1_ Sintesi ed azione dei ROS a livello cellulare

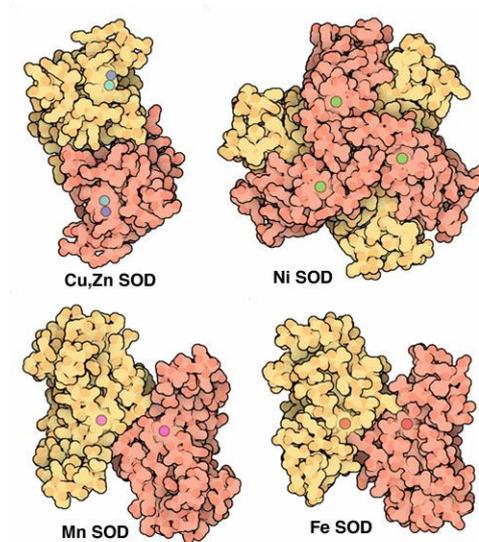
[<http://www.mrc-mbu.cam.ac.uk/research/mitochondrial-dysfunction/measuring-mitochondrial-reactive-oxygen-species>]

2. Superossido Dismutasi (SOD)

Le superossido dismutasi (SOD) costituiscono una classe di metalloproteine ubiquitarie ad azione antiossidante, utilizzate dagli organismi aerobi come sistema di difesa contro la tossicità derivante dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). La sua azione enzimatica catalizza la dismutazione dello ione superossido in ossigeno molecolare (O₂) e perossido di idrogeno (H₂O₂):



Sono state fin ora caratterizzate quattro classi di enzimi SOD, in base al metallo utilizzato come cofattore: la Cu/Zn-SOD, presente principalmente nella frazione citosolica delle cellule eucariote; la Fe-SOD, che si trova nei procarioti e in poche specie di eucarioti; la Mn-SOD, associata ai mitocondri e ad alcuni procarioti; e la Ni-SOD, isolata in alcune specie di *Streptomyces* e cianobatteri.

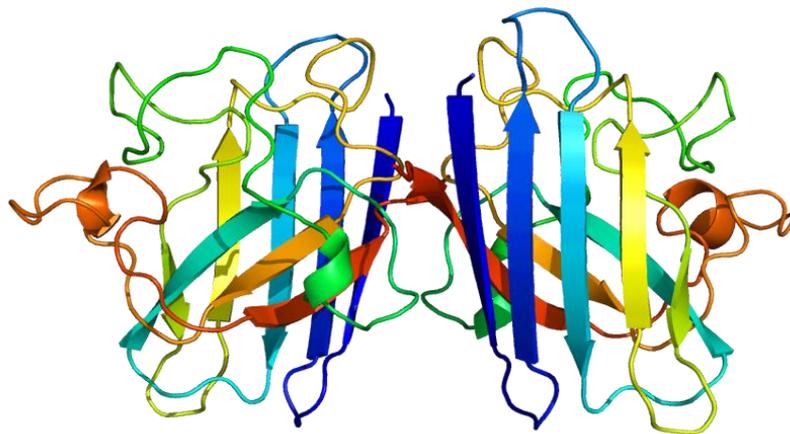


2_Tipologie di Superossido Dismutasi

[<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=94>]

2.1. Superossido Dismutasi rame/zinco (Cu/Zn-SOD)

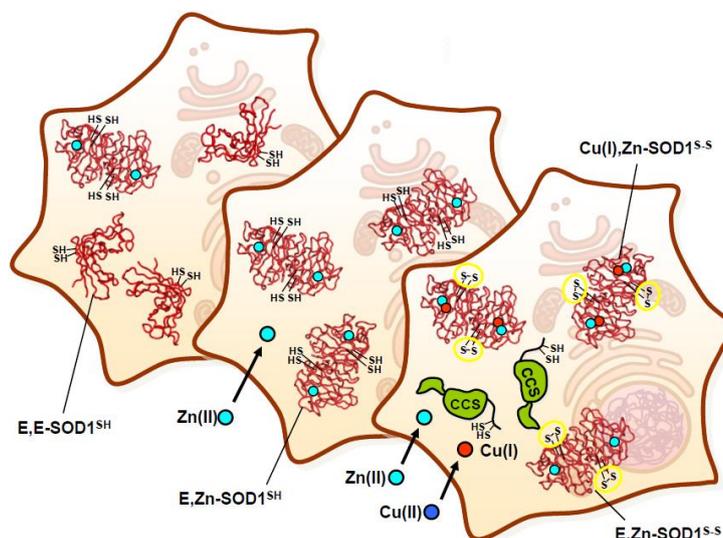
La *Copper/Zinc Superoxide dismutase* (o SOD1) è un enzima che si trova in ogni specie di eucarioti, localizzato nel citosol, nello spazio intermembrana mitocondriale e nei lisosomi. È diffusa in tutto l'organismo ma assume le maggiori concentrazioni all'interno delle cellule neurali. Si presenta sotto forma di omo-dimero di circa 2x16kDa in cui ogni sub-unità ospita un centro metallico binucleare (coppia Cu/Zn) responsabile della dismutazione catalitica di O_2^- in O_2 e H_2O_2 .



3_Struttura quaternaria della SOD1

[<http://en.wikipedia.org/wiki/SOD1>]

2.1.1. Folding e ruolo della CCS



4_Steps di maturazione della SOD1

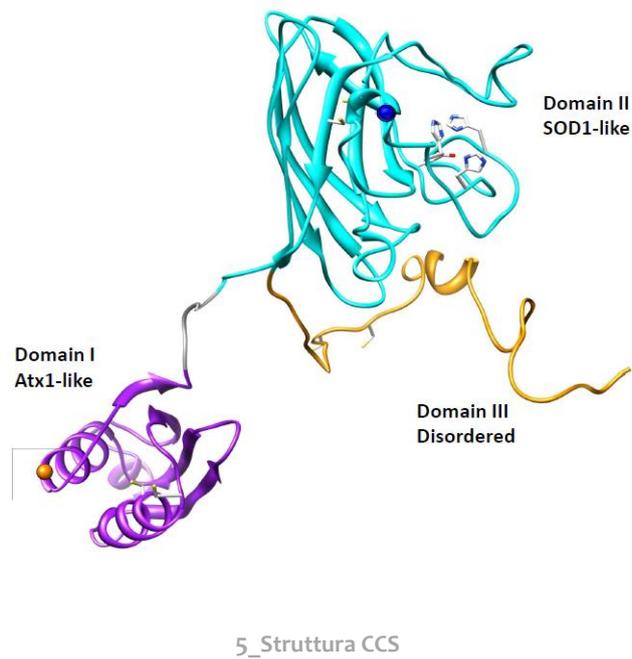
[Banci L, Barbieri L, Bertini I, Luchinat E, Secci E, Zhao Y, Aricescu AR, Nat Chem Biol 9, 297-299 (2013)]

Il gene della proteina SOD1 umana, localizzato sul cromosoma 21, è formato da 5 esoni; da questi, dopo lo *splicing*, è prodotto l'mRNA che esprime, durante la traslazione, una singola specie di Zn/Cu-SOD. L'mRNA maturo, che codifica una proteina di 154 amminoacidi, subisce, quindi, una modifica post-traslazionale, che rimuove la metionina iniziale ed effettua un'acetilazione N-terminale. La proteina matura consiste in 153 residui.

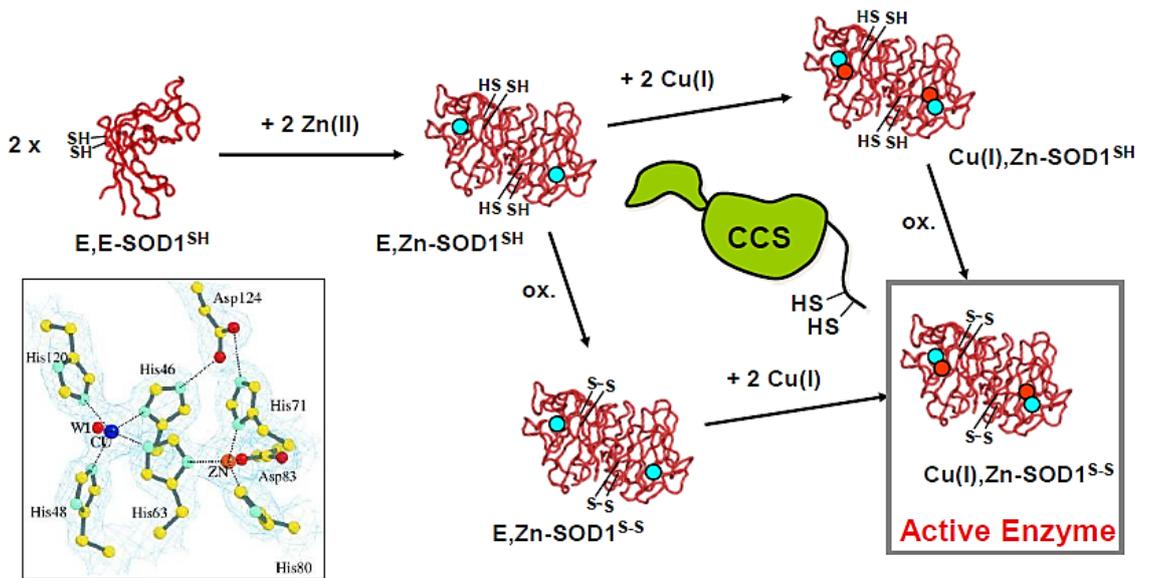
La struttura terziaria della SOD1 è imperniata sui 2 ioni metallici, la sua maturazione è quindi regolata dal loro *uptake*. Mentre lo Zn viene legato spontaneamente all'interno della proteina, l'acquisizione di Cu è strettamente controllata.

Recentemente è stata identificata una proteina, denominata CCS, coinvolta nel *folding* della SOD1, in particolare nell'*uptake* dello ione Cu e nella formazione del ponte disolfuro tra le Cys57 e Cys146. Questa molecola è formata da 3 domini (27kDa totali), ognuno dei quali svolge un ruolo specifico nel trasporto del rame: una regione centrale con topologia simile al β -barile della SOD, che promuove il riconoscimento del bersaglio; un dominio C-terminale contenente

una sequenza CXC (Cys- a.a.- Cys), che rappresenta un potenziale sito di legame del metallo e svolge, quindi, la funzione di trasporto del rame; una terza parte N-terminale, implicata nella ricerca di Cu^+ (forma ridotta). La similarità strutturale tra il dominio centrale della CCS ed una sub-unità della Zn/Cu-SOD porta ad ipotizzare la formazione di un complesso eterodimerico tra una molecola di CCS ed una sub-unità *Cu-free SOD*; il rame è quindi trasferito al monomero di SOD attraverso il dominio C-terminale della CCS. Questo meccanismo porta a destabilizzare l'eterodimero, che si disassembla, ed a favorire, contemporaneamente, la maturazione della SOD1 dimera. Studi recenti dimostrano che la presenza congiunta dello ione Cu^+ e del metallo-chaperone CCS contribuiscono alla riduzione delle Cys57 e Cys146 e alla formazione di un ponte disolfuro all'interno di entrambe le sub-unità dell'enzima, completandone la struttura quaternaria¹.



¹ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)



6_Meccanismo di azione CCS-SOD1

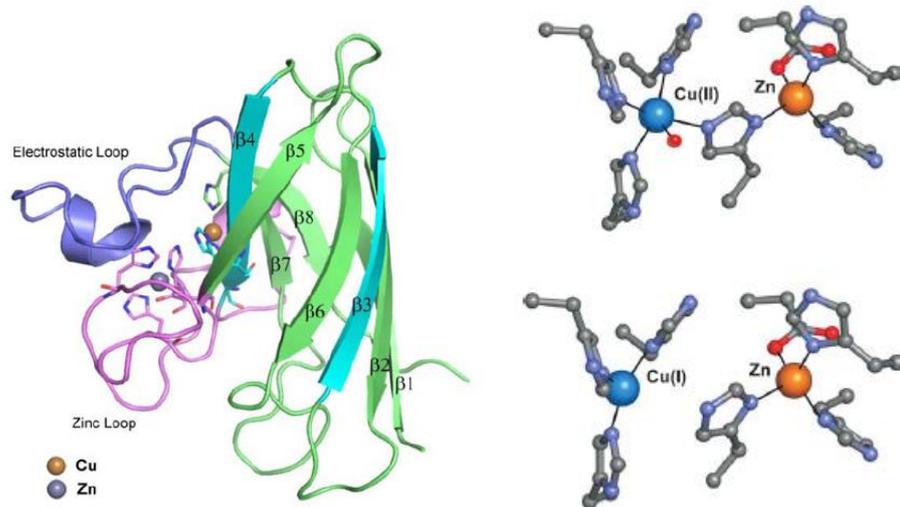
[Strange R.W. et al. J.Mol.Biol. 2003]

2.1.2. Struttura

Ogni sub-unità della SOD1 è organizzata in struttura a β -barile appiattita, composta da otto foglietti- β antiparalleli uniti da 7 *loops* con topologia a chiave greca. La regione del sito attivo, che ospita la coppia di ioni Cu/Zn, è localizzata sulla faccia più esterna del β -barile, alla fine di un canale lungo $\sim 7\text{\AA}$ definito dal 2 *loops* della proteina. L'architettura del centro binucleare è garantita da residui specifici posti sul fondo del canale, che legano gli ioni metallici mantenendoli nella corretta posizione. Questo vale soprattutto per i leganti dello Zn^{2+} , che ha un ruolo strutturale all'interno della proteina, mentre la geometria dei leganti della ione rame varia in dipendenza dello stato di ossidazione.

La struttura terziaria della forma ridotta ed ossidata dell'enzima sono estremamente simili; le maggiori differenze si concentrano in una regione posta nelle vicinanze dello ione Cu, che passa dalla coordinazione 3 nella $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Zn-SOD}$, alla coordinazione 5 in $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Zn-SOD}$. Nella $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Zn-SOD}$, Cu(I) è legato ai 3 anelli imidazolici delle His120, 48, 46 (numerazione della SOD1 umana), assumendo una struttura trigonale planare, mentre Zn(II) è collegato a 3 anelli imidazolici (His80, 71, 63) ed al residuo Asp83. Nella $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Zn-SOD}$ la struttura di tutta la proteina varia

leggermente: il Cu(II) si sposta di circa 1Å verso il sito dello Zn, il residuo His63 si deprotona e lega lo ione rame formando ponte tra i due atomi metallici, un legame con una molecola di H₂O si aggiunge alla prima sfera di coordinazione di Cu(II).



7_Monomero SOD1 e particolare del sito di aggancio dei metalli

[Sheng Y., Chattopadhyay M., Whitelegge J., Valentine J.S., *Med. Chem.* 12, 2560-2572 (2012)]

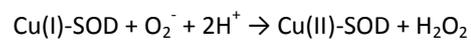
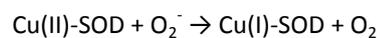
Una caratteristica particolarmente importante per l'attività enzimatica della proteina riguarda la struttura del canale che permette l'accesso allo ione di Cu. Mentre l'ampiezza in superficie è di circa 24Å, questa si va progressivamente restringendo fino ad un valore di soli 4Å in prossimità dello ione Cu. Questa contrazione ha l'effetto di limitare la formazione di legami con Cu(II) (forma ossidata dell'enzima) a soli anioni di piccole dimensioni, con forma approssimabile a quella di O₂⁻ (CN⁻, N₃⁻, ecc.), rendendo l'enzima estremamente specifico. Il sito attivo contiene, inoltre, un residuo di arginina ~6Å sopra allo ione rame che gioca un ruolo importante nella generazione di un campo elettrostatico (grazie al gruppo guanidinio) che attira le molecole di superossido, cariche negativamente, all'imboccatura del canale di entrata e le guida verso il sito catalitico.

La struttura quaternaria della Cu/Zn-SOD in cellule eucariote è costituita da un omodimero con superficie di contatto tra le 2 sub-unità di circa 550Å², sulla quale si instaurano interazioni

idrofobiche che stabilizza la struttura. L'interfaccia è formata, per ciascun monomero, da 19 residui distribuiti su 3 β -strands, il S-S subloop, i loops a chiave greca e la regione C-terminale.

2.1.3. Meccanismo di reazione

La reazione catalizzata dalla superossido dismutasi 1 è una dismutazione che segue una cinetica di secondo ordine.



Durante la reazione catalitica della Cu/Zn-SOD lo ione Cu^{2+} è ciclicamente ridotto ed ossidato durante successive interazioni con il substrato superossido nel sito attivo, così da agire sia da ossidante (accettore di elettroni) sia come riducente. Inizialmente O_2^- viene attratto nel canale del sito attivo ed entra nella prima sfera di coordinazione di Cu(II), formando il complesso $\text{Cu}^{2+}(\text{O}_2^-)$. Avviene, quindi, il trasferimento elettronico e si formano i prodotti Cu(I)-SOD e O_2 ; quest'ultimo viene liberato ed espulso dal canale, il ponte imidazolico viene rotto e l'His63 protonata.

Un ulteriore ione superossido entra nel sito attivo della Cu(I)-SOD, ma senza legarsi direttamente allo ione rame che, essendo trigonale planare ($\text{Cu}^{\text{I}}(\text{His})_3$), non ha affinità a formare un nuovo legame, bensì interagendo con l'NH imidazolico della His a ponte. Cu(I) riduce, quindi, O_2^- , mentre la His63 agisce da donatore di protoni: si forma lo ione idroperossido (HOO^-) che, solo adesso, complessa il rame in $\text{Cu}^{2+}(\text{HO}_2^-)$. Segue una seconda protonazione e la perdita di H_2O_2 come prodotto finale. La presenza dell'anello imidazolico legato a Zn^{2+} gioca un ruolo importante nel processo di catalisi introducendo nel meccanismo una dipendenza dal pH e prevenendo, così, la formazione di un legame troppo forte tra lo ione idroperossido ed il rame, facilitando la rapida espulsione del prodotto H_2O_2 .

2.2. Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)

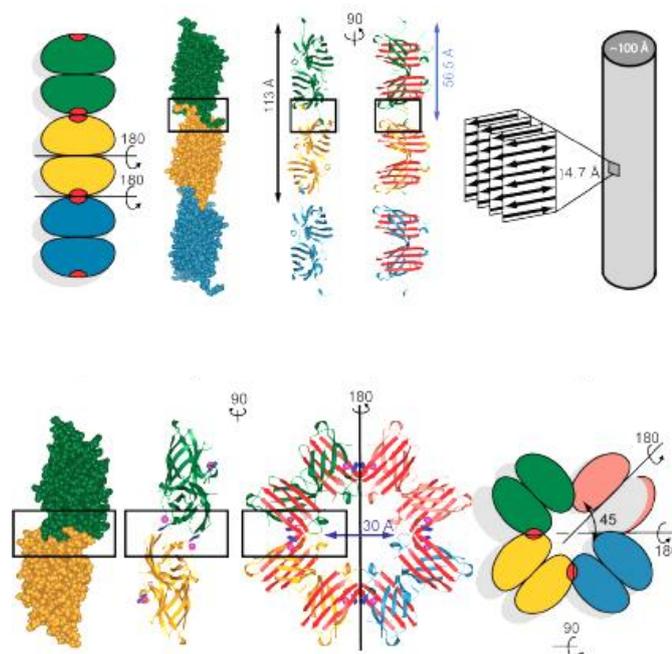
La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa rara (1-2 casi ogni 100 mila individui l'anno) che colpisce selettivamente i neuroni motori localizzati nella spina dorsale, nella corteccia e nel tronco cerebrale. Si manifesta tipicamente negli adulti, inizialmente con stanchezza degli arti fino alla totale paralisi ed alla morte (usualmente per insufficienza respiratoria). Descritta per la prima volta nel tardo 1800 dal neurologo francese Jean-Martin Charcot, è divenuta conosciuta a livello globale in seguito al caso di Lou Gehring, giocatore di baseball professionista degli Yankees, al quale fu diagnosticata nel 1937 (dal quale prende anche il nome di "morbo di Lue Gehring"). La maggior parte dei casi di SLA (90-95%) non ha una causa ben definita e sono denominati "*sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis*" (sALS); i rimanenti 5-10% dei casi sono, invece, correlati ad una lesione genetica ereditaria e si identificano col nome di "*familial ALS*" (fALS). Un fondamentale passo avanti verso la comprensione di questa malattia fu compiuto nel 1993, con la scoperta che i casi di fALS possiedono una comune mutazione dominante del gene che codifica l'enzima Cu/Zn-SOD. Poiché la struttura e l'azione della SOD1 sono ben note, gli studi molecolari sono adesso concentrati nell'identificare come le mutazioni della SOD1 producono effetti tossici sui motoneuroni; l'obiettivo è di arrivare ad una possibile cura per la tipologia fALS e di estenderla, quindi, anche ai casi di sALS, clinicamente molto simili.

2.2.1. Mutazioni

Ad oggi sono state isolate oltre 100 mutazioni correlate alla SLA, distribuite su 68 residui del polipeptide SOD1. Queste sono prevalentemente sostituzioni, inserzioni o delezioni di singoli amminoacidi o troncamenti della sequenza C-terminale. Sono distribuite su tutta la lunghezza della proteina ed influenzano *onset*, modalità di comparsa, durata e gravità dei sintomi che affliggono gli individui colpiti.

Le mutazioni patologiche della SOD1 sono classificate in base alla loro posizione all'interno della struttura della proteina: i mutanti "*β-barrel*", che presentano solo lievi perturbazioni di stabilità strutturale rispetto alla SOD-*wt* (wild-tipe) ed i mutanti "*metal-binding*", che, invece, mostrano problemi nell'*uptake* degli ioni metallici ed un conseguente disordine nella

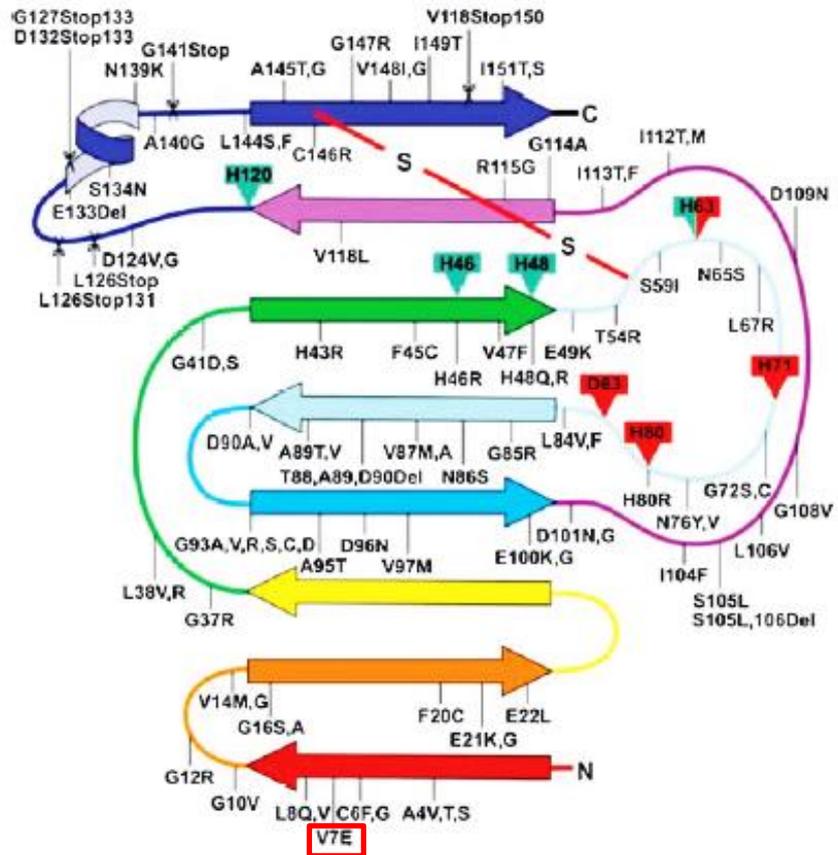
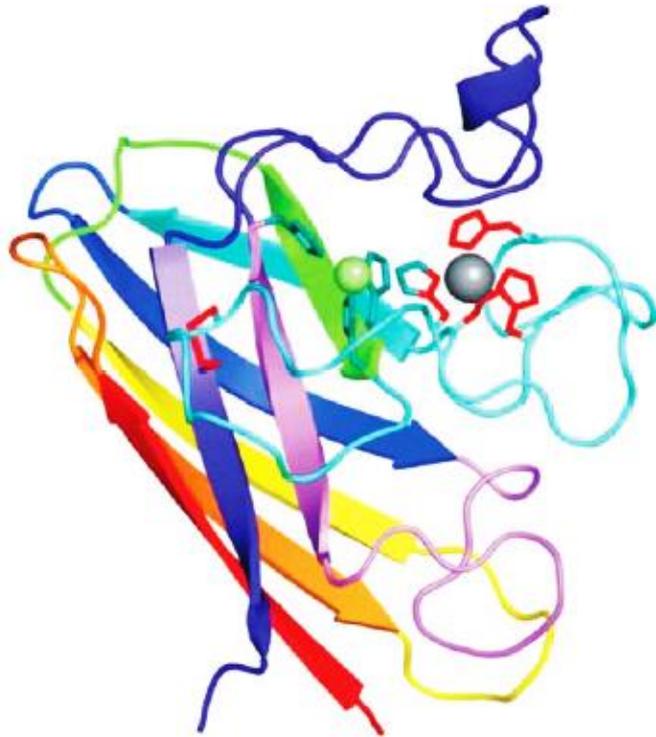
conformazione del sito attivo. Queste alterazioni portano ad un incremento dei livelli di SOD1 immatura, completamente o parzialmente unfoldata; fatto attribuibile, probabilmente, a difetti incontrati durante le modifiche post-traslazionali, collegati all'attività del metallo-chaperone CCS. Una prima ipotesi, valida per i mutanti "metal-binding", indica come causa la difficoltà che la CCS incontra nell'interagire con i *SOD1-linked fALS*; in particolare l'impossibilità del trasferimento dello ione Cu nel sito attivo dell'enzima e, quindi, la mancata formazione del ponte disolfuro. Alternativamente, i mutanti "β-barrel" non permettono la conformazione del sito di aggancio, precludendo la formazione dell'eterodimero CCS-SOD1. Studi *in vivo* su cavie da laboratorio hanno dimostrato che la patogenicità delle *SOD1-linked fALS* non è da attribuire alla loro minore attività enzimatica (e ad un conseguente aumento delle specie ROS nel citoplasma), bensì ad un'azione propriamente tossica sul metabolismo cellulare. Analisi su vittime della SLA hanno portato alla luce l'accumulo nelle cellule nervose di forme insolubili di proteina mutata, generalmente all'interno di aggregati ad alto peso molecolare. Nonostante sia dimostrato che le *SOD1-linked fALS* siano molto più propense all'aggregazione rispetto alla SOD1-wt, ancora non ne è chiaro il meccanismo di formazione *in vivo* di queste specie, definite *inclusion-bodies*.



8_Aggregati molecolari di SOD1 arrangiati in filamenti elicoidali e β-fibrille

[Seetharaman S.V., Prudencio M., Karch C., Holloway S.P., Borchelt D.R., Hart P.J., *Exp. Biol. Med.* 234(10), 1040-1154 (2009)]

In vitro, le forme di mutanti di SOD1 prive di metalli si assemblano spontaneamente in filamenti lineari ed elicoidali. La proteina mutata, non assumendo la stabile struttura quaternaria propria dell'enzima *wild-type*, espone i gruppi rendendoli accessibili interazioni intermolecolari aspecifiche. La formazione di *inclusion-bodies* è stata correlata, tramite studi in colture cellulari, ad un meccanismo primario di tossicità che, però, non giustifica ancora completamente la patogenicità delle mutazioni dell'enzima SOD1.



9_Mappa delle mutazioni riscontrate nelle molecole di SOD1 patogene [Valentine J.S., Doucette P.A., Potter S.Z., *Annu. Rev. Biochem.* 74, 563-593 (2005)]

TECNICHE DI COLTURA CELLULARE

Per colture cellulari si intende cellule che si moltiplicano *in vitro* per una o più generazioni avendo perduto l'architettura del tessuto e, solitamente, avendo subito un certo grado di differenziazione.

Partendo da un organo o dai suoi frammenti è possibile ottenere una sospensione cellulare utilizzando in maniera combinata mezzi meccanici e mezzi chimici. La sospensione cellulare così ottenuta viene quindi posta in un contenitore di vetro o di plastica, a fondo piatto (capsula di Petri, fiasca ecc.) con un terreno liquido, che contiene gli ioni necessari (ad una concentrazione iso-osmotica), amminoacidi e vitamine, ed un siero animale in proporzione variabile (fino al 50%). Come tampone viene di solito utilizzato il bicarbonato, in equilibrio con CO₂ (dal 5 al 10%). In queste condizioni, le singole popolazioni cellulari costituenti la sospensione hanno la possibilità di sintetizzare specifiche glicoproteine di membrana che permettono alla cellula di aderire al substrato, di cambiare forma e distendersi grazie ad una nuova organizzazione del citoscheletro. Dopo un periodo di tempo variabile, quindi, inizia la divisione mitotica e si sviluppa una *coltura primaria*. L'adesione ad un supporto rigido è indispensabile per la crescita delle cellule normali (dipendenza dall'ancoraggio). Quando la superficie di crescita non risulta più sufficiente alla sistemazione di nuove cellule figlie la coltura si definisce *confluente*. A causa dell'inibizione da contatto, in una coltura confluyente, le moltiplicazioni cessano e si ha quindi un rallentamento del metabolismo, con conseguente accumulo di prodotti tossici. Per permettere alle cellule di continuare a crescere è necessario procedere a periodici trapianti in terreni freschi. A tale scopo si utilizza un procedimento indicato come *tripsinizzazione*, che consente di staccare le cellule dal substrato al quale sono adese, risospenderle in soluzione e, quindi, trapiantarle in mezzo fresco, ricco di tutti i componenti necessari alle cellule per le loro attività metaboliche (vitamine, sali inorganici, proteine e costituenti sierici). Il distacco delle cellule dal substrato d'adesione è reso possibile dall'impiego di un particolare enzima proteolitico, la tripsina, che digerisce il materiale glicoproteico presente sulla membrana cellulare, responsabile dell'adesione, senza distruggere o uccidere le cellule. Aliquote di sospensione cellulare così ottenute vengono utilizzate per iniziare una coltura secondaria (*passaggio*).

Le cellule in coltura tendono a mantenere alcune caratteristiche strutturali del tessuto di origine, ad esempio presentandosi sottili ed allungate (similfibroblastiche) o poligonali e tendenti a formare fogli (similepitelioidi). Le cellule di una coltura primaria generalmente possono essere passate in serie diverse volte. Questo processo può portare alla selezione di alcuni tipi di cellule che diventano predominanti. Si dice, in questo caso, che la coltura primaria ha dato origine ad un *ceppo cellulare*. Dopo un certo numero di passaggi queste cellule possono andare incontro ad un processo detto di senescenza cellulare e non possono essere più "passate". Durante la moltiplicazione di un ceppo cellulare alcune cellule vanno incontro a delle alterazioni: cambiano morfologia, crescono più velocemente e possono dare inizio ad una coltura partendo da un numero minore di cellule. Il clone derivato da queste cellule costituisce una *linea cellulare*, che ha una possibilità di vita illimitata (immortalizzazione).

1. Condizioni di lavoro

Il mantenimento delle cellule in coltura richiede alcune condizioni di laboratorio che mimano nel miglior modo possibile l'ambiente *in vivo*, cioè uno stato fisiologico simile a quello all'interno dell'organismo vivente. All'interno dell'organismo, le funzioni vitali (nutrizione, controllo di pH, protezione, mantenimento della temperatura, ecc.) sono regolate nei tessuti da differenti sistemi di controllo. Una volta che le cellule sono nel terreno di coltura, queste funzioni esterne all'ambiente di coltura, devono essere sostituite dallo strumento (incubatore a CO₂).

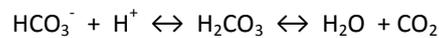
Le condizioni fisico-chimiche ottimali sono:

- T = 37 °C
- Pressione parziale= 95% O₂ e 5% CO₂
- pH = 7.0 – 7.5

La temperatura (T) è uno dei parametri più importanti per il mantenimento delle cellule di organismi viventi. Le cellule possono sopportare l'ipotermia (sono conservate congelate) ma la loro attività metabolica è notevolmente disturbata. Al contrario, le cellule di mammiferi, non possono sopportare l'ipertermia, anche piccoli aumenti di temperatura per brevi periodi possono far morire le cellule.

In un incubatore a CO₂, il parametro di temperatura è direttamente collegato con l'umidità relativa (RH%). L'energia fornita dall'incubatore serve sia a mantenere la temperatura sia ad evaporare l'acqua dall'apposito vassoio, per portare il livello di RH alla giusta percentuale. L'umidità relativa (RH) è un parametro che deve essere mantenuto sotto controllo per limitare l'evaporazione dell'acqua contenuta nei terreni di coltura.

Il pH è il parametro più sensibilmente regolato dall'organismo, con un valore che si aggira intorno a 7.0 – 7.4. Il metabolismo attivo delle cellule in coltura produce grandi quantità di ioni H⁺ che provocano in poche ore una eccessiva acidificazione del terreno di coltura. Il sistema tampone più usato nella coltura delle cellule è quello a base di carbonato/bicarbonato:



La pressione parziale (pCO₂) di CO₂ (5%) usata nelle colture corrisponde alla pCO₂ cellulare misurata all'interno dei tessuti (35-45 mmHg, equivalgono al 4.6-5.9% di CO₂).

Le cellule in coltura sono mantenute in mezzi di coltura appropriati: per studi a breve termine si possono utilizzare delle soluzioni saline mentre per studi più prolungati sono necessari nutrienti organici.

Composizione dei terreni di coltura:

- Componente salina (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻, PO₄³⁻, ecc.)
- Componente micromolecolare (vitamine + a.a.)
- Componente macromolecolare (proteine del siero)

Le soluzioni di lavaggio comprendono la sola componente salina, il terreno di mantenimento comprende la componente salina e la componente micromolecolare, il terreno di crescita la componente salina, la componente micromolecolare e la componente macromolecolare.

La prevenzione delle contaminazioni è uno dei punti più critici nella coltura delle cellule. I vari tipi di contaminazione sono distinti in quattro classi:

- *Contaminazione di microrganismi dispersi nell'aria.* E' molto semplice limitare questo tipo di contaminazione basta osservare semplici misure d'igiene prima della manipolazione delle cellule: lavare le mani, usare camice da laboratorio e cappe a flusso laminare.

- *Contaminazione da biofilm*, dovuta ad una insufficiente pulizia dell'incubatore.
- *Contaminazione proveniente dal campione* (la più frequente). E' generalmente il risultato di una cattiva manipolazione del campione e più raramente dalla contaminazione del terreno di coltura. Questo tipo di contaminazione si può evitare utilizzando terreni e piastre di Petri sterili e con l'aggiunta di antibiotici nel mezzo di coltura (penicillina e streptomina).
- *Contaminazione crociata*, che corrisponde alla contaminazione di un campione "pulito" da un campione contaminato tramite l'effetto dell'aerosol creato dal movimento dell'aria. Potrebbe essere provocata anche dalla diffusione di germi provenienti dal biofilm.

La sterilizzazione è una procedura che consiste nell'uccidere tutti i microorganismi presenti nel materiale da utilizzare. Solitamente viene ottenuta tramite metodi fisici, principalmente per effetto del calore. L'autoclave rappresenta il sistema di sterilizzazione più pratico e sicuro, grazie al fatto che il vapore acqueo sotto pressione raggiunge temperature di 120-130°C (normalmente la procedura comune usa 121°C per 20min a 1,08atm). Ulteriore necessità quando si utilizzano cellule eucariote è quella di lavorare sotto cappa a flusso laminare, che garantisce l'assenza di contaminanti nell'atmosfera sopra al piano di lavoro.

2. Clonazione e Trasfezione

La clonazione del DNA permette l'isolamento e l'amplificazione di una particolare sequenza di DNA (spesso un gene particolare). Questa tecnica è effettuata inserendo un frammento di DNA in un elemento genetico che si autoreplica, generalmente un virus o un plasmide. Iniziando con una sola molecola di DNA ricombinante che infetta una singola cellula, i meccanismi normali di replicazione possono produrre più di 10^{12} molecole identiche di DNA virale in meno di un giorno, amplificando così la quantità del frammento inserito di DNA umano dello stesso fattore. Un virus o un plasmide usato in questo modo è noto come *vettore di clonaggio* e si dice che il DNA propagato per inserzione è stato *clonato*. Oggi la maggior parte delle clonazioni è eseguita con vettori plasmidici. I *vettori plasmidici* sono piccole molecole circolari di DNA a doppio filamento derivate da plasmidi più grandi che si trovano in natura in cellule batteriche. Essi in genere costituiscono soltanto una piccola frazione del DNA della cellula batterica ospite. Per l'uso come vettori di clonaggio, i cerchi purificati di DNA plasmidico sono prima tagliati con una nucleasi di restrizione per creare molecole lineari di DNA. Il gene di interesse

viene tagliato con la stessa nucleasi di restrizione ed i frammenti che ne risultano (compresi quelli contenenti il gene da clonare) sono aggiunti ai plasmidi tagliati e appaiati, tramite le loro estremità coesive, a formare cerchi ricombinanti di DNA. Queste molecole ricombinanti, contenenti inserti di DNA estraneo, sono poi saldate covalentemente dall'enzima *DNA ligasi*. I cerchi di DNA ricombinante (plasmidi) sono introdotti in cellule batteriche (*trasformazione*) e fatte replicare, producendo un numero enorme di copie di contenenti il DNA estraneo (PCR²). Molti plasmidi batterici portano geni per la resistenza ad un antibiotico, una proprietà sfruttata per selezionare quelle cellule che sono state trasformate con successo; se i batteri sono fatti crescere in presenza dell'antibiotico, sopravvivranno soltanto le cellule contenenti plasmidi.

Per trasfezione si intende il processo di introduzione di materiale biologico esogeno (DNA, siRNA³, proteine) in cellule eucariote e, nella gran parte dei casi, di mammifero. A seconda del destino in cui incorre il vettore inserito si può distinguere tra trasfezione transiente e trasfezione stabile. La trasfezione è transiente quando il vettore resta nella cellula come frammento extracromosomico, cioè non si integra nel genoma cellulare; in questo caso le proprietà indotte dalla trasfezione permangono per breve tempo, di solito scompaiono prima delle 72 ore. La trasfezione è stabile, invece, quando il DNA esogeno si integra stabilmente nel genoma, perdurando per l'intera vita della cellula e venendo trasmesso anche alle cellule figlie. Nell'introduzione di DNA, il problema che si pone riguarda il fatto che sia l'acido nucleico che la membrana cellulare sono carichi negativamente: il DNA, per forze di repulsione elettrostatiche, quindi, non interagirà mai spontaneamente con la membrana. I metodi di trasfezione servono infatti per mascherare i gruppi anionici del DNA e si distinguono in:

- *Metodi chimici*: calcio fosfato, lipidi cationici, PEI, dietil-ammino-etil-destrano, ecc.;
- *Metodi fisici*: elettroporazione, microproiettili, microiniezione;
- *Metodi biologici*: virus, liposomi, dendrimeri.

² *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.

³ *Small interfering RNA (o short interfering RNA)* è una molecola di RNA lunga tra i 20 ed i 25 nucleotidi coinvolta anzitutto nel *pathway* della *RNA interference*, che conduce alla inibizione dell'espressione di singoli geni.

3. Conta cellulare su camera di Burker

La *camera di Burker* consta di una robusta lastra di vetro rettangolare, che presenta al centro un rilievo, delimitato da ambo i lati da due solchi o scanalature parallele ed un corto solco trasversale che divide questo rilievo centrale in due metà, ciascuna delle quali porta inciso un reticolo di conta. I due reticoli vengono coperti da un unico vetrino copri-oggetto, tenuto aderente da due morsetti laterali metallici. Questa adesione dà la giusta altezza tra la camera ed il copri-oggetto di 0,1mm. Ciascuna rete di conteggio è suddivisa in 9 quadrati grandi delimitati da tre righe parallele per ciascun lato: ogni quadrato grande ha un'area di 1mm^2 ed un volume corrispondente a $0,1\text{mm}^3$; il quadrato medio ha un'area di $0,04\text{mm}^2$ ed un volume corrispondente a $4 \times 10^{-3}\text{mm}^3$; il quadrato più piccolo ha un'area di $2,5 \times 10^{-3}\text{mm}^2$ ed un volume corrispondente a $2,5 \times 10^{-4}\text{mm}^3$. La camera di Burker va riempita, subito dopo aver effettuato una diluizione 1:10 della sospensione cellulare appena tripsinizzata, con il colorante *Tripan Blu*. Il colorante permette di distinguere tra cellule vive e morte. Più precisamente, le cellule vive non si colorano in quanto la struttura della membrana è intatta, mentre le cellule morte risulteranno completamente colorate di blu, in seguito alla penetrazione del colorante nel loro interno.

4. Lisi cellulare

Le cellule vengono lavate per 3 volte con PBS (soluzione salina, pH 7.4) e lisate con 350 μL di uno specifico buffer di lisi freddo per 3/4min (HEPES 50mM pH=7.5, NaCl 150mM, MgCl_2 1,5mM, EDTA 10mM, Glicerolo 10%, Triton-X-100 1%, Aprotinina 0,6%, PMS-F⁴ 1mM, Na_3VO_4 0,2 mM). Funzione di tale buffer è quella di rompere la membrana cellulare consentendo la fuoriuscita del succo proteico. Più precisamente: l'aprotinina ed il PMS-F bloccano l'azione delle proteasi, mentre l'ortovanadato quella delle fosfatasi. Inoltre, il glicerolo impedisce la dissociazione delle sub-unità proteiche, che si potrebbe verificare in seguito alla diluizione del citosol ed il Triton l'assorbimento delle proteine sulla superficie del contenitore; NaCl e MgCl_2 rendono la soluzione ipertonica, favorendo, così, lo shock osmotico; l'EDTA è un chelante di vari metalli (Cu^{2+} e Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , ecc.) , impiegati come cofattori dalle proteasi. Il lisato ottenuto dopo queste operazioni viene centrifugato per 5min a 13000-14000 rpm a

⁴ Phenylmethanesulfonyl fluoride

4°C, in modo da separare la frazione contenente le membrane cellulari, che precipita andando a formare il pellet, dalle proteine che rimangono nel surnatante. Questo viene poi conservato a -80°C.

5. Elettroforesi

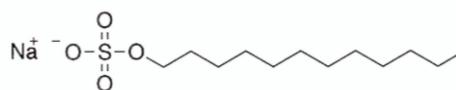
L'elettroforesi è il processo per cui molecole cariche si separano in un campo elettrico a causa delle loro diverse mobilità. I fattori che influenzano la mobilità di una molecola in un campo elettrico comprendono la carica della molecola (q) ed il gradiente di voltaggio del campo elettrico (E), che insieme forniscono la forza che muove gli ioni, e la resistenza di attrito del mezzo di supporto (f), che ne contrasta il movimento. La mobilità è definita come la velocità di migrazione con un gradiente di voltaggio di 1V/cm e viene misurata in cm^2*s*V . Per ragioni pratiche in genere si determina la mobilità relativa delle proteine (R_f) come il rapporto fra la distanza percorsa da ciascuna proteina rispetto a quella percorsa da una piccola sostanza colorante anionica (*marker*). L'elevato rapporto carica/massa del colorante lo fa' migrare vicino al fronte elettroforetico e davanti alle proteine.

Le proteine hanno una carica netta a qualunque pH diverso dal loro punto isoelettrico (pI) e quindi, quando sono poste in un campo elettrico, migreranno verso l'elettrodo di carica opposta. Per la maggior parte delle proteine il pI è nell'ambito 3-10, e la maggioranza ha un $pI < 8$. Quindi, a pH 8 o maggiore, la maggioranza delle proteine ha una carica netta negativa e migrerà in un campo elettrico verso l'anodo (elettrodo positivo). Le separazioni elettroforetiche vengono eseguite usando un mezzo di supporto che, idealmente, dovrebbe essere forte, idrofilico (per impedire interazioni idrofobiche fra le proteine del campione e il mezzo di supporto), privo di carica e stabile in un ampio ambito di temperatura, pH e osmolarità e dovrebbe avere una porosità controllata e regolabile in modo preciso. Le dimensioni dei pori del mezzo di supporto sono importanti perché contribuiscono alla maggior parte del coefficiente di attrito f . L'effetto setaccio del mezzo di supporto, oltre al rapporto carica/massa delle molecole, fraziona le molecole del campione. I mezzi di supporto (matrici) variano a seconda del campione che deve essere separato: per l'elettroforesi di proteine viene normalmente utilizzata acrilamide polimerizzata, lavorando con acidi nucleici sono preferiti i gel di agarosio.

5.1. Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)

I gel di poliacrilamide si formano per la copolimerizzazione di acrilamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), un monomero solubile in acqua, e di un agente che forma legami trasversali a formare un reticolo tridimensionale, l'*N,N'*-metilene bis-acrilamide [BIS] ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). La BIS contiene due doppi legami che nelle reazioni di polimerizzazione formano legami trasversali con catene adiacenti di poliacrilamide. Le dimensioni medie dei pori in un gel possono essere controllate variando la quantità di monomero usato (generalmente preferito) o aumentando il grado di legami trasversali per ottenere pori più stretti. In ogni dato gel verranno separate soltanto le proteine che sono in un particolare ambito di dimensioni (ambito di peso molecolare o, più accuratamente, ambito di raggio di Stokes). Un gel a gradiente è una forma speciale di gel in cui il grado di porosità varia dal basso in alto, creando un gradiente nella percentuale di acrilamide e consente di separare proteine che hanno una vasta gamma di MM.

Per semplificare l'analisi di miscele di proteine è possibile fare in modo che la separazione si basi soltanto sulle dimensioni delle catene polipeptidiche (eliminando il contributo dato dalla carica delle proteine al pH di lavoro). Ciò si ottiene denaturando le proteine con il detergente sodio-dodecil-solfato (SDS), che si lega con forza alle proteine denaturandole in "bacchette" estese rivestite di SDS. In media, ogni due aminoacidi sarà presente una molecola di dodecil-solfato. Poiché ciascuna molecola di SDS ha due cariche negative ai valori di pH usati per l'elettroforesi, la carica netta delle catene polipeptidiche rivestite sarà molto più negativa di quella delle catene non rivestite. Inoltre, il rapporto carica/massa sarà essenzialmente identico per proteine diverse poiché il rivestimento di SDS domina la carica. La separazione delle catene polipeptidiche denaturate e rivestite di detergente sarà perciò dovuta quasi esclusivamente alle dimensioni delle catene polipeptidiche (raggio di Stokes).



10_Sodio-dodecil-solfato

5.1.1. Apparato

Le lastre di gel vengono formate fuori dall'apparato fra due lastre di vetro separate fra loro da spaziatori di Teflon spessi ~1,5mm: si versa il gel liquido di poliacrilamide fra le lastre e lo si fa polimerizzare. Viene versato prima il *resolving gel* e poi lo *stacking gel* (in cui è inserito un pettine per formare i pozzetti per la deposizione dei campioni). Lo *stacking gel* (polimerizzato con una piccola percentuale di acrilamide e di bis-acrilamide e tamponato con tampone Tris-HCl a pH 6,8), meno poroso, fa' concentrare le proteine in una zona sottile sopra il gel di risoluzione, permettendo una separazione per dimensioni efficace e riproducibile delle proteine rivestite da SDS nel gel di risoluzione. Quest'ultimo contiene una percentuale più alta di acrilamide e contiene Tris-HCl a pH più alto (8,8). I recipienti per il tampone superiori e inferiori usati nel processo di elettroforesi contengono Tris a pH 8,3 con glicina come controione. La miscela di proteine in Tris a pH 6,8, insieme con il colorante tracciante blu di bromofenolo (che permettere il monitoraggio del fronte elettroforetico) viene caricata nei piccoli pozzetti dello *stacking gel*.

5.1.2. Separazione e rilevazione

Quando la glicina del recipiente superiore entra nel pH basso (6,8) dello *stacking gel* sarà principalmente nella forma zwitterionica neutra, ciò le impedisce di essere un trasportatore efficace di corrente. Gli ioni Cl^- del tampone, invece, a pH 6,8, migrano rapidamente verso l'anodo. Durante l'elettroforesi, nello *stacking gel* la concentrazione degli ioni Cl^- scende drasticamente all'estremità catodica del gel (in alto), formando un gradiente crescente di concentrazione verso l'anodo (in basso). Le molecole proteiche rivestite di SDS ed il colorante, che hanno rapporti carica/massa maggiori di quello della glicina ma minori di quello del Cl^- , devono adesso migrare per portare la corrente di elettroforesi dietro il Cl^- e davanti alla glicina. Come l'elettroforesi procede, le molecole proteiche che raggiungono il gel di risoluzione vengono ritardate notevolmente, permettendo alle quelle più pesanti che le seguono di raggiungerle e compattarsi. Quando le bande compresse entrano nel pH più alto del gel di

risoluzione, la glicina diventa anionica e porta un rapporto carica/massa più alto di quello delle proteine. Ora gli ioni glicinato appena formati si muovono più velocemente delle proteine, con una mobilità che si avvicina a quella degli ioni Cl^- . Si forma un nuovo gradiente di concentrazione che richiede che le proteine ed il colorante tracciante portino la corrente nella scia degli ioni Cl^- e glicinato. Le proteine si muovono secondo le loro mobilità relative e sono separate dall'effetto setaccio del gel di risoluzione secondo le dimensioni. L'alta mobilità del colorante tracciante assicura che esso migrerà più veloce delle proteine, quindi, quando questo raggiunge la fine del gel, l'elettroforesi può essere interrotta in modo da non fare uscire le proteine dal fondo del gel.

Per visualizzare la presenza di bande proteiche dopo elettroforesi in gel di poliacrilamide in SDS, la tecnica usata più comunemente è quella con colorante *Coomassie Brilliant Blue R-250*: il gel viene rimosso con attenzione dalle lastre di vetro, l'SDS è lavato via con H_2O e le bande proteiche sono colorate immergendole in soluzione calda del colorante. Purtroppo, poiché le singole proteine legano il colorante in modo diverso, in assenza di una conoscenza specifica sul legame, questa tecnica consente solo una quantificazione approssimativa delle bande colorate.

5.2. Elettroforesi di DNA su gel di agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio permette di separare, e quindi identificare, frammenti di DNA in base al loro peso molecolare. I frammenti migrano, nel campo elettrico che attraversa il gel, dal polo negativo a quello positivo, in funzione delle cariche elettriche conferitegli dai gruppi fosfato. La velocità di migrazione dipende: dalle dimensioni dei frammenti, dalla percentuale di agarosio nel gel e dal voltaggio applicato. Frammenti lineari più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli grandi, mentre, a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta super avvolta (*super coiled DNA*).

L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici. È uno zucchero solubile in acqua alla

temperatura di ebollizione, mentre diventa solido man mano che si raffredda formando una matrice attraverso dei legami a idrogeno tra le catene lineari, formando un setaccio molecolare.

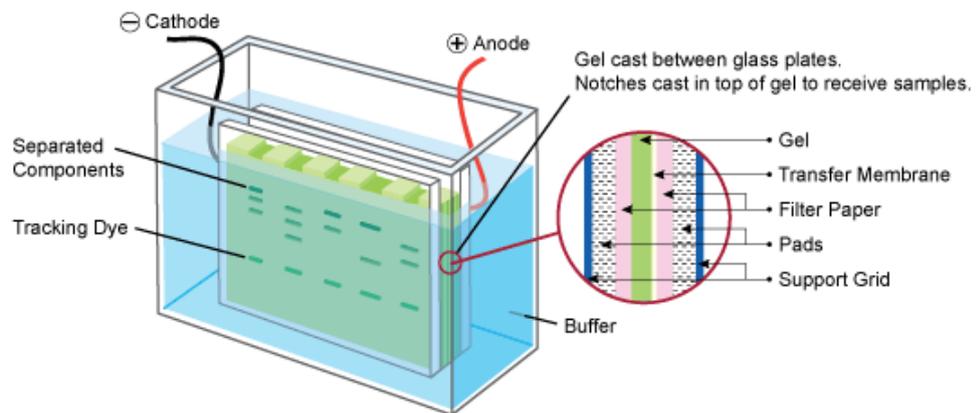
5.2.1. Separazione e rilevazione

Dopo aver sciolto l'agarosio lo si fa raffreddare fino ad una temperatura di circa 45°C prima di versarlo sullo stampo. Inoltre sullo stampo si pone un pettine in modo che, una volta versato l'agarosio e lasciandolo raffreddare, si formino dei pozzetti in cui inserire il preparato. In seguito si aggiunge il composto bromuro d'etidio, una sostanza che, intercalandosi tra il DNA, lo rende fluorescente sotto luce UV. Dopo aver preparato il supporto di agarosio, lo si immette in una vaschetta contenente il tampone, che sommergerà tutto il gel. La vaschetta viene collegata ad un voltmetro, poiché il DNA è acido sarà caricato sul catodo e, quindi, migrerà verso l'anodo. Per poter rilevare l'ampiezza del frammento di DNA, si pongono nel gel dei marcatori di lunghezza nota in modo tale da poter confrontare il cammino percorso dalle bande.

6. Western-Blot

Il *western blot* o immunofissazione o immunoblot è una tecnica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima separata in base alle loro dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un gel di poliacrilammide; successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico. Il trasferimento, di solito, si effettua per *elettroblotting*: il gel e la nitrocellulosa vengono posti in un apposito supporto a forma di sandwich, immerso in un tampone, nel quale ci sono due elettrodi paralleli. La corrente trasferisce le proteine dal gel sul foglio di nitrocellulosa. Il foglio viene quindi saturato con siero di latte in polvere privo di grassi al 10% per bloccare i legami aspecifici e, poi, sottoposto a reazione con anticorpi. L'anticorpo primario è diretto contro la proteina di interesse; il

secondario è diretto contro le IgG (immunoglobuline G) dell'organismo usato per produrre l'anticorpo primario. Gli anticorpi secondari sono opportunamente marcati in modo da poter essere rivelati una volta legato l'anticorpo primario (in genere sono coniugati ad un enzima come ad esempio la perossidasi). Il *blot* viene quindi incubato con una soluzione contenente il substrato dell'enzima che viene convertito in un prodotto colorato. La presenza di bande colorate sulla nitrocellulosa indica la presenza della proteina di interesse. Un metodo alternativo e più sensibile sfrutta il luminolo (un substrato chemiluminescente) la perossidasi ossida il luminolo con produzione di luce, la luce emessa può essere rivelata esponendo il *blot* a una lastra fotografica.



11_Apparato di Western-Blot

SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro di tesi consiste nello studio, tramite *in-cell NMR*, di alcune mutazioni FALS dell'enzima SOD1 all'interno di cellule di mammifero. Questo approccio consente di ottenere risultati che forniscono informazioni sul reale comportamento delle molecole in un ambiente di reazione del tutto simile a quello fisiologico.

Le analisi si sono concentrate sul mutante denominato V7E, nel quale l'amminoacido Valina [Val, V] in posizione 7 è sostituito con un residuo di Acido glutammico [Glu, E]. In particolare, è stato studiato il processo di maturazione post-traslazionale della proteina in presenza del solo ione Zn(II), per verificarne l'*uptake*, ed in presenza di Zn(II), Cu(II) e del metallo-chaperone CCS, esaminandone il grado di *foldig* e l'organizzazione delle strutture terziaria e quaternaria della proteina "matura".

MATERIALI e METODI

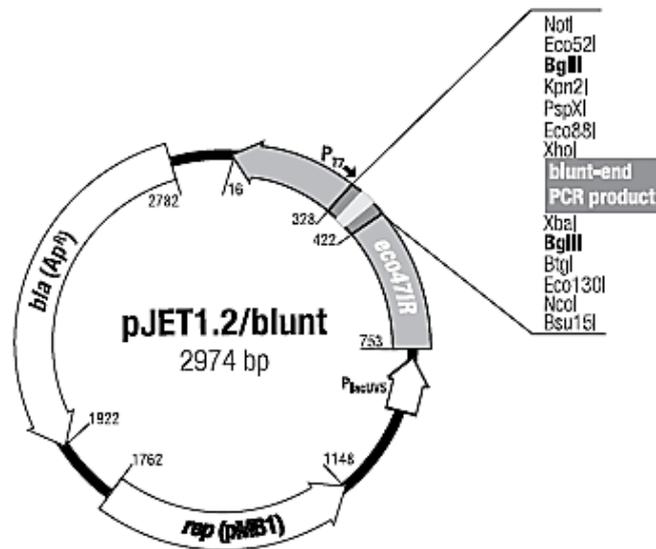
1. MATERIALI

1.1. Linea cellulare

La linea cellulare utilizzata per indurre l'espressione transiente della proteina SOD1 umana è del tipo HEK293T (human embryonic kidney), ottimizzate per questo tipo di trasfezione⁵

1.2. Plasmidi

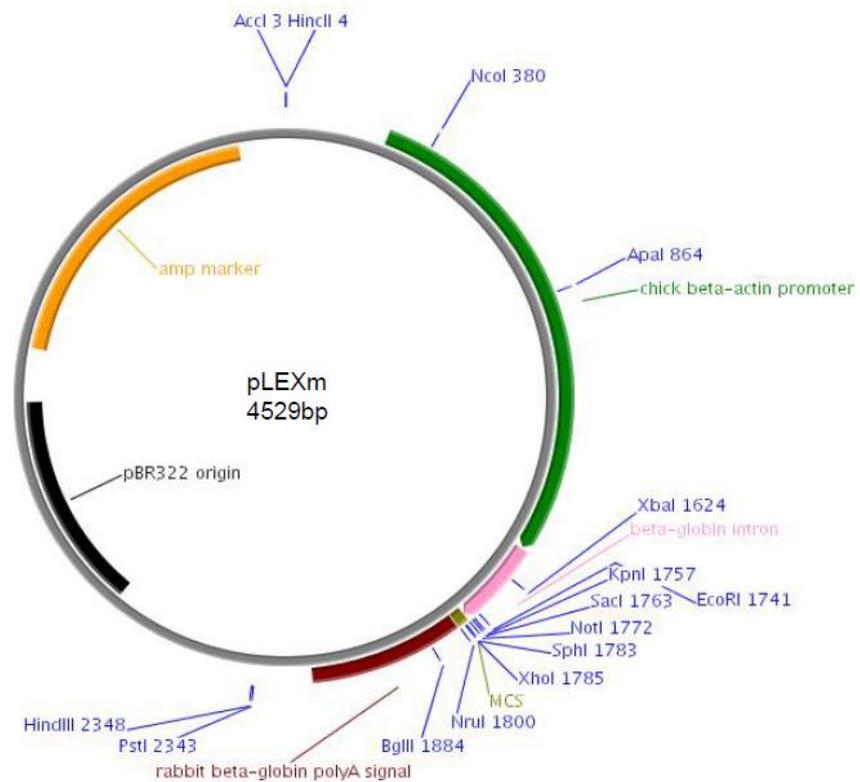
- **pJET**: plasmide non di espressione utilizzato come sub-clonaggio del gene di interesse⁶



⁵ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)

⁶ http://www.bioinfo.pt.e.hu/f2/pict_f2/pJETmap.pdf

- pHLsec:** questo vettore è costruito sul backbone del plasmide pLEXm contenente: un'origine di religazione pBR322 (che garantisce un elevato numero di copie in *E.coli* e permette di ottenere una grande quantità di plasmide per la trasfezione), resistenza l'ampicillina, un promotore *chicken β-actin* per alti livelli di espressione, un introne *rabbit β-globin* (che incrementa la produzione di RNA) ed una *poly-A* (stabilizzazione RNA). Parte della struttura è stata modificata introducendo una sequenza di Kozak (identifica il sito di aggancio del ribosoma all'mRNA durante l'avvio della sintesi proteica), un C-terminale K_His6 ed una sequenza di secrezione.



La coda di His e la sequenza di secrezione sono state successivamente rimosse e sostituite con l'inserto di DNA di interesse.

```

EcoRI HindIII Kozak M G I L P S P G M P A L L S
GAATTCAAGCTT GGCACCATGGGATCCTTCCCAGCCCTGGGATGCCTGCGTGCTCTCC
↑
L V S L L S V L L M G C V A E T G
CTCGTGAGCCTTCTCTCCGTGCTGCTGATGGGTTGCGTAGCTGAAACCGGT...insert...

```

```

G T K H H H H H * * XhoI
GGTACCAAGCACCACCATCACCATCACTAATGATCACTCGAG
↑

```

1.3. Enzimi di restrizione

Per il taglio della sequenza di DNA associata al gene V7E dal plasmide pJET sono stati utilizzati i seguenti enzimi di restrizione:

<i>nome</i>	<i>catalogo</i>	<i>sequenza di taglio</i>
EcoRI (FastDigest)	Fermentas® [nc.#FD0274]	G [▼] AATT C C TTAA [▲] G
XhoI (FastDigest)	Fermentas® [nc.#FD0694]	C [▼] TCGA G G AGCT [▲] C

1.4. Primer

I *primers* utilizzati per il processo di mutazione del DNA sono i seguenti:

<i>nome</i>	<i>primer sequence (5' to 3')</i>	<i>length (nt.)</i>	<i>T_m</i>	<i>Duplex energy at 68°C</i>	<i>Energy cost of mismatches</i>
V7E_F (primer forward)	5'-ggccgtgtgagctgaagggcg-3'	23	78,11°C	40,86kcal/mol	3,49%
V7E_R (primer reverse)	5'-cgcccttcagctcgacacggcc-3'	23	78,11°C	44,23kcal/mol	0,15%

2. METODI

2.1. Culture di cellule di mammifero

Le cellule HEK293T sono sospese in 20mL di terreno DMEM (high glucose,D6546,Sigma)⁷ addizionato con L-glutamina, antibiotici (penicillina e streptomina)(2%) e siero FBS (10%). Inoculate in fiasche di plastica da 75cm², sono fatte crescere in incubatore a 310 K, 5% CO₂ in atmosfera ad umidità controllata.

2.1.1. Passaggio cellule

Poiché il tempo di duplicazione delle cellule è di circa 24h, per garantire le migliori condizioni di sopravvivenza e crescita (ottenute con concentrazioni cellulari non superiori a 8x10⁵cell/mL e mantenendo livelli di nutrienti sufficientemente elevati) è necessario diluire 1:10 la coltura a distanza di 2/3 giorni. La procedura seguita è la seguente:

- rimuovere il terreno di coltura vecchio;
- lavare le cellule adese con PBS⁸;
- staccare le cellule adese per via enzimatica tramite 2mL di soluzione tripsina(0,05%)/EDTA(0,02%) in PBS;
- disattivare la soluzione di tripsina aggiungendo 20mL di DMEM;
- centrifugare (800rpm/5min), levare il surnatante e risospendere in 10mL di DMEM;
- prelevare 1mL, diluirlo in 19mL di DMEM ed introdurlo nella nuova fiasca.

2.2. Clonaggio DNA mutante

Ci proponiamo di isolare il gene del mutante V7E della SOD1 umana, inserirlo in un vettore di espressione ed utilizzarlo per over-esprimere la proteina mutata in cellula.

⁷ Vedi APPENDICE 1

⁸ Phosphate Buffer Solution: 137μM NaCl + 2,7μM KCl + 10μM Na₂HPO₄ + 2μM KH₂PO₄

2.2.1. Estrazione del gene Mut-SOD1 [V7E]

Il gene V7E è contenuto nel plasmide pJET, il primo passo è stato quindi il taglio e l'estrazione del segmento di DNA richiesto.

Il taglio enzimatico è stato effettuato tramite gli enzimi di restrizione EcoRI e XhoI, inseriti, insieme al plasmide, in *FastDigest Green Buffer* e riscaldati in *thermal cycler* a temperatura costante di 37°C per 20min. Abbiamo quindi ottenuto una miscela contenente gene V7E (~500 bp) + pJET libero; procediamo al recupero del DNA della Mut-SOD1 attraverso elettroforesi con gel di agarosio (1,2%) applicando ddp 90V per ~40min. Utilizzando un *marker low range* (100-1000 bp) siamo stati in grado di individuare la banda appartenente al gene, asportarla, pesarla (400mg) ed estrarne il DNA tramite kit di estrazione *NucleoBond®* ottenendo una concentrazione di 6,2ng/μL.

2.2.2. Creazione del plasmide ricombinante

Il frammento di DNA ottenuto è stato fuso col vettore pHLsec in presenza di *DNA ligasi*⁹ così da ottenere il plasmide ricombinante necessario per la trasformazione in cellula. Sappiamo da protocollo¹⁰ che il rapporto ottimale tra inserto di DNA e plasmide vettore è 3:1 (pesato sulla lunghezza del DNA); per garantire la buona riuscita della ligasi abbiamo però suddiviso il campione in ulteriori due test e provato a raddoppiare rispettivamente la quantità di plasmide (campione H) e quella dell'inserto di DNA (campione G) secondo la tabella seguente:

	E	G	H
<i>buffer 10x</i>	2μL	2μL	2μL
<i>pHLsec</i>	2μL	2μL	4μL
<i>DNA</i>	6μL	12μL	6μL
<i>DNA ligasi</i>	1μL	1μL	1μL
<i>H₂O</i>	9μL	3μL	7μL

⁹ Fermentas® [nc #ELO014]

¹⁰ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)

Abbiamo operato una *trasformazione* in cellule batteriche *E.Coli*-DH5 α , tramite la seguente procedura:

- aggiungere 5 μ L di plasmide a 50 μ L di cellule e lasciare a riposo per 30' in ghiaccio;
- scaldare la miscela a 42°C per 45";
- aggiungere 450 μ L di terreno LB;
- 1ora in agitazione a 37°C, 240rpm;
- centrifugare e rimuovere il surnatante;
- far crescere le cellule su *piastre di Petri* (LB-agar + ampicillina) in incubatore a 37°C overnight.

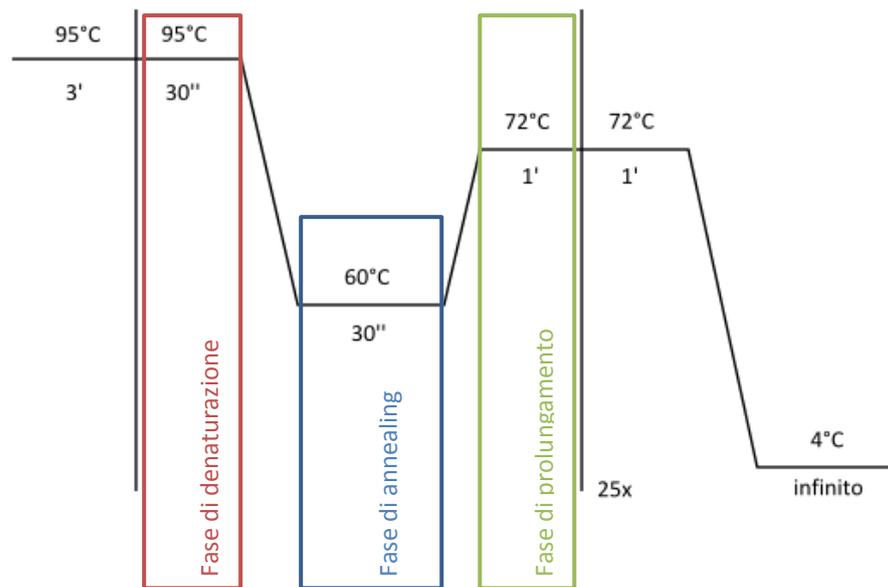
Le piastre ottenute sono risultate positive per tutti i campioni, confermando l'acquisizione del plasmide da parte delle cellule.

2.2.3. Colonies screening

Per verificare che la miscela di ligasi ottenuta contenga effettivamente il gene di interesse abbiamo prelevato campioni di 2 cellule da ognuna delle tre piastre e vi è stata applicata la tecnica PCR:

PCR Master Mix	H_2O	15,5 μ L
	buffer	2 μ L
	dNTPs	0,4 μ L
	DMSO	1 μ L
	TAQ	1 μ L
	V7E_F	0,5 μ L
	V7E_R	0,5 μ L

Il profilo di temperatura seguito è il seguente:



Per accertarci che le colonie contengano realmente il plasmide ricombinante, sui 3 campioni ottenuti dalla PCR è stata effettuata una elettroforesi su gel di agarosio (ddp 90V per 20min), che ha confermato l'inclusione del DNA della proteina mutante nel vettore di espressione.

Ottenuto il plasmide ricombinante, è stato effettuato un pre-inoculo di 300mL posto overnight in agitazione a 240rpm a 37°C. Poiché tutti i campioni sono risultati positivi abbiamo deciso di usare le cellule del campione E, ottenute tramite la metodologia riportata nel protocollo di riferimento¹¹.

Le cellule duplicate sono state quindi centrifugate e trattate con kit *NucleoBond® Xtra Midi / Maxi*¹² col quale abbiamo estratto il DNA del plasmide ottenendo una concentrazione di 314,5 ng/μL.

¹¹ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)

¹² <http://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNApurification/PlasmidDNApurificationeasyfastreliable/NucleoBondXtra-plasmidMidiprepMaxiprepkits/tabid/1479/language/en-US/Default.aspx>

2.3. Trasfezione in cellule HEK293T

La trasfezione transiente del plasmide è stata operata con metodo chimico per formazione di un complesso 1:2 di DNA (25µg) e PEI¹³ (50µg)¹⁴. Poiché il nostro obiettivo è studiare il comportamento del mutante V7E-SOD1 in presenza di Zn²⁺ + Cu²⁺ + CCS ed in presenza di solo Zn²⁺, abbiamo lavorato su 2 campioni separati; la quantità di DNA prelevato (calcolato dalla concentrazione ottenuta dal processo di estrazione) è pari a 80µL ciascuno.

Per ottenere maggiori informazioni dall'analisi *in-cell NMR* abbiamo labellato selettivamente con cisteine [¹⁵N] la proteina V7E-SOD1 + Zn²⁺ + Cu²⁺ + CCS, mentre l'arricchimento del campione V7E-SOD1 + Zn²⁺ è stato effettuato con [¹⁵N]-labeling uniforme.

2.3.1. Mut-SOD1 [V7E] + Zn²⁺ + Cu²⁺ + CCS

Sono state preparate 2 soluzioni in terreno privo di cisteine, creato appositamente seguendo la composizione del DMEM (high glucose, D6546, Sigma)¹⁵:

soluzione plasmide	2,5mL DMEM medium <i>no-Cys</i>	80µL DNA	11,5µL CCS
soluzione PEI	2,5mL DMEM medium <i>no-Cys</i>	50µL PEI	

Successivamente sono state unite e lasciate a riposo per 20' così da permettere la formazione del complesso. Le cellule HEK293T sono state quindi trasfettate, unendo la

¹³ Polietilenimmina

¹⁴ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)

¹⁵ Vedi sezione APPENDICE 1

soluzione del complesso, utilizzando 20mL di DMEM medium *no-Cys* addizionato con L-glutamina, antibiotici (penicillina e streptomina), siero FSB (2%), 63µL di soluzione di cisteine [¹⁵N] 25mg/mL (concentrazione finale coincidente con la composizione del DMEM tradizionale) e 4µL di ZnSO₄ 50mM (concentrazione finale di 10µM). L'espressione della proteina labellata inizia dopo circa 6 ore dalla trasfezione. Il Cu²⁺ è stato aggiunto al terreno di crescita dopo 48h di espressione in concentrazione finale di 100µM, così da evitare la morte prematura delle cellule per avvelenamento. L'incubazione è durata ulteriori 24h, allo scadere delle quali sono stati registrati gli spettri *in-cell NMR*.

2.3.2. Mut-SOD1 [V7E] + Zn²⁺

Sono state preparate 2 soluzioni in terreno arricchito in [¹⁵N]¹⁶:

soluzione plasmide	2,5mL terreno [¹⁵ N]	80µL DNA
soluzione PEI	2,5mL terreno [¹⁵ N]	50µL PEI

Successivamente sono state unite e lasciate a riposo per 20' così da permettere la formazione del complesso. Le cellule HEK293T sono state quindi trasfettate, unendo la soluzione del complesso, utilizzando 20mL di terreno [¹⁵N] addizionato con L-glutamina, antibiotici (penicillina e streptomina), siero FSB (2%) e 4µL di ZnSO₄ 50mM (concentrazione finale di 10µM). L'espressione della proteina labellata inizia dopo circa 6 ore dalla trasfezione. Dopo 48h di incubazione sono stati registrati gli spettri *in-cell NMR*.

¹⁶ BioExpress6000 medium [CIL]

2.4. Spettroscopia *in-cell* NMR

I campioni per *in-cell* NMR sono stati preparati seguendo il protocollo di riferimento¹⁷. Le cellule HEK293T sono state distaccate dalla parete della fiasca tramite una soluzione di tripsina-EDTA 0,05% e risospese in 20mL di DMEM contenente il 10% di FBS (atto a disattivare la tripsina). Le cellule sono state quindi centrifugate a 800g per 5min, risciacquate con 10mL di PBS così da rimuovere le tracce di Zn²⁺ e Cu²⁺ e, infine, risospese in 150µL di DMEM medium integrato con 65mM di glucosio (90mM finali), 16mM di buffer HEPES¹⁸ e 20% di D₂O (per ottenere il 10% di D₂O nei campioni NMR finali). La sospensione cellulare è stata trasferita in tubi *Shigemi* da 3mm e centrifugata delicatamente così da compattare le cellule sul fondo (senza che vengano compromesse) e formare un pellet in corrispondenza del *coil* dello spettrometro. Dopo l'esperimento il campione è stato recuperato per effettuare sul surnatante il *protein-leakage test*, così da escludere l'interferenza da parte di segnali dovuti alla presenza di proteina in soluzione nel terreno. Le cellule sono state quindi risospese in poco volume di PBS + 0,5mM EDTA + AEBSF¹⁹ e lisate con metodo *freeze-thaw* tramite shock termico. Il lisato ottenuto è stato centrifugato a 16000g per 30min a 4°C, analizzato tramite spettroscopia NMR ed utilizzato per quantificare la concentrazione di proteina espressa tramite western-blot.

Gli spettri NMR sono stati acquisiti utilizzando una spettrometro 950-MHz *Bruker Avance III* equipaggiato con un *CP TCI CryoProbe*. Sono stati esaminati spettri 1D ¹H e 2D ¹H-¹⁵N SOFAST HMQC effettuati a temperatura di 305K.

¹⁷ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)

¹⁸ 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid [Sigma, CAS#7365-45-9]

¹⁹ 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride [Sigma CAS#30827-99-7]

2.5. Verifiche di espressione

2.5.1. Viability

Tecnica atta a verificare la sopravvivenza delle cellule durante la spettroscopia NMR, così da garantirne l'attendibilità dei risultati.

10µL di sospensione cellulare sono prelevati dal campione NMR prima e dopo l'analisi e trattati con una soluzione di DMEN e *Trypan Blue*, che ne evidenzia le cellule morte con una colorazione indaco. È stata utilizzata una *camera di Burker* per il conteggio delle cellule totali e quelle morte tramite microscopio ottico.

2.5.2. Western-Blot

Per quantificare approssimativamente la concentrazione della proteina espressa in cellula è stata utilizzata la tecnica del *Western-Blot* sui lisati post-NMR. Sono state effettuate 3 diluizioni su entrambi i lisati dei campioni di proteina (Zn^{2+} e $Zn^{2+}+Cu^{2+}+CCS$) e fatte correre su gel al 12% di SDS-poliacrilamide (*resolving* 12%, *stacking* 4%) a ddp 220V per ~20min. Le deposizioni effettuate sono state di 15µL totali dei quali 5 µL di FSB 3x + H₂O+ sample (in rapporto alla diluizione). Sul gel sono stati depositati anche 4 standard a concentrazioni crescenti di SOD1 *wild-type* e 2 marker specifici: *BenchMark™ Pre-Stained*²⁰, che permette di verificare la buona riuscita dell'operazione di trasferimento; *MagicMark™ XP Western Protein Standard*²¹, visibile durante il processo di chemiluminescenza.

²⁰ Novex® nc.#10748-010

²¹ Novex® nc.# LC5602

STD				V7E [Zn ²⁺]			V7E [Zn ²⁺ +Cu ²⁺ +CCS]				MagicMark	BenchMark
1:5	1:10	1:25	1:50	1:10	1:25	1:50	1:10	1:25	1:50	<input type="text"/>		
10µM	5µM	2µM	1µM									

Le proteine così separate sono state trasferite a 100V costanti per 85min su una membrana di nitrocellulosa immersa nel *transfer buffer*²² e mantenuta a 0°C in ghiaccio. Dopo il trasferimento, la membrana è stata colorata con *rosso ponceau*²³ per 5 minuti e decolorata più volte con acqua distillata per visualizzare le bande delle proteine; il gel di poliacrilammide è stato controllato con *Coomassie* per verificare iltrasferimento quantitativo della nostra proteina.

Abbiamo proceduto, quindi, con il bloccaggio dei siti della membrana non contenenti proteine (che potrebbero formare legami aspecifici durante il trattamento con anticorpi) ponendola in agitazione a 4°C overnight in soluzione di 10% TBS_{1x} + 6% latte scremato in polvere + 0,05% Tween20²⁴. Dopo aver effettuato 3 lavaggi da 15min con TBS_{1x} + 0,05% Tween20, la nitrocellulosa è stata incubata per 2h e 30min con la soluzione di anticorpo primario²⁵ 1:100. Sono seguiti ulteriori 3 lavaggi e quindi l'incubazione con anticorpo secondario²⁶ 1:80000 per 1h.

La rilevazione delle bande della proteina è stata effettuata tramite reazione di chemiluminescenza²⁷ analizzata in uno strumento *Gel Doc™ EZ System* compiendo scansioni con intervallo di 60'' per un totale di 5min. L'integrazione delle bande ottenute è stata effettuata con il programma di elaborazione digitale di immagini *ImageJ*.

²² 700mL H₂O + 200mL MeOH + 100mL runner buffer

²³ 1,5mLCH₃COOH + 100mg ponceau

²⁴ Polyoxyethylene sorbitan monolaurate

²⁵ Rabbit anti-human SOD1 polyclonal primary antibody (BioVision)

²⁶ Anti-rabbit IgGperoxidase secondary antibody for detection (Sigma)

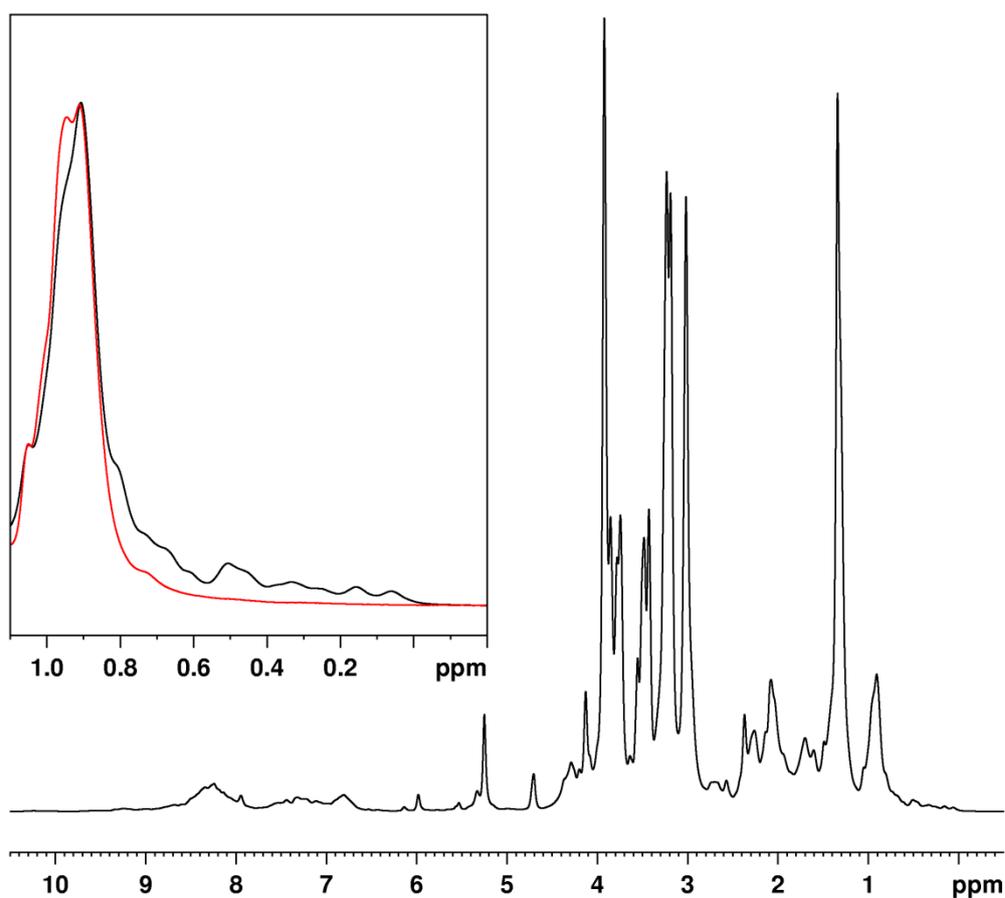
²⁷ GE Healthcare Amersham ® ECL Wester blotting detection reagents and analysis system)

RISULTATI e DISCUSSIONE

1. Spettri NMR

1.1. V7E-SOD1 + Zn²⁺

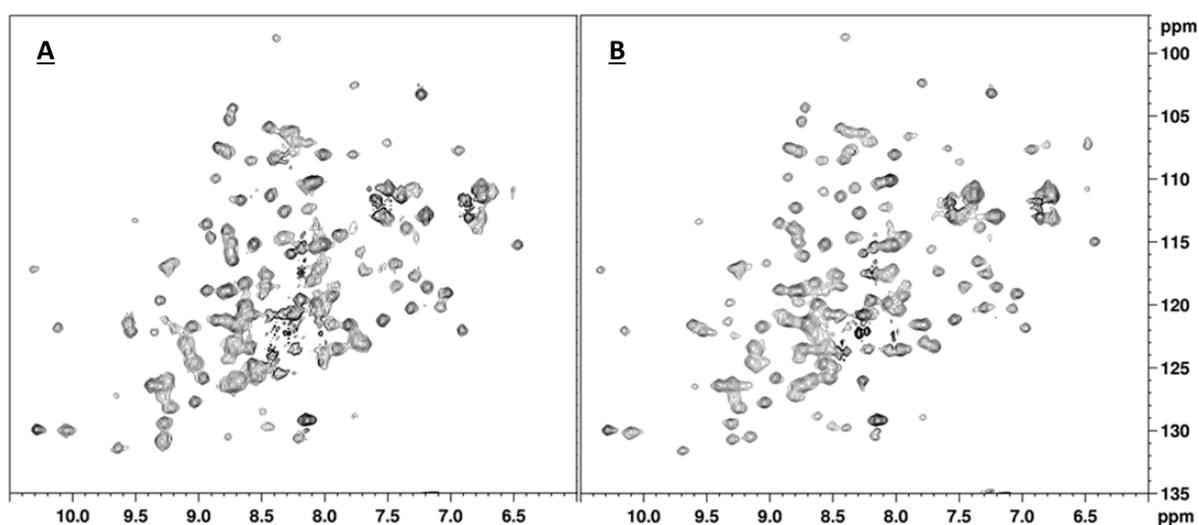
È stato registrato uno spettro 1D ¹H NMR del mutante V7E-SOD1, espresso in presenza di Zn²⁺. Poiché i segnali del background sono molto intensi è stata evidenziata una finestra a bassi valori di ppm, laddove possiamo isolare i segnali propri della proteina.



Spettro 1_1D ¹H NMR del mutante V7E-SOD1

Effettuando un confronto tra gli spettri 1D ^1H NMR del mutante V7E-SOD1, espresso in presenza di Zn^{2+} (in nero), ed un secondo registrato su cellule non trasfettate e, quindi, prive di proteina (in rosso), si nota la presenza di picchi supplementari nello spettro di V7E-SOD1. Questi sono riconducibili ai gruppi CH_3 delle catene laterali dei residui della proteina; in particolare la presenza di picchi separati dai segnali di background cellulare è tipica della presenza di proteina.

Analizziamo degli spettri 2D ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC del mutante V7E-SOD1 (Spettro 2-A) e della SOD1-wt espressa, anch'essa, in presenza di solo Zn^{2+} (Spettro 2-B). Gli spettri sono stati elaborati sottraendo il contributo dovuto al *labeling* del background cellulare (tramite sottrazione dello spettro 2D ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC di un campione di controllo).



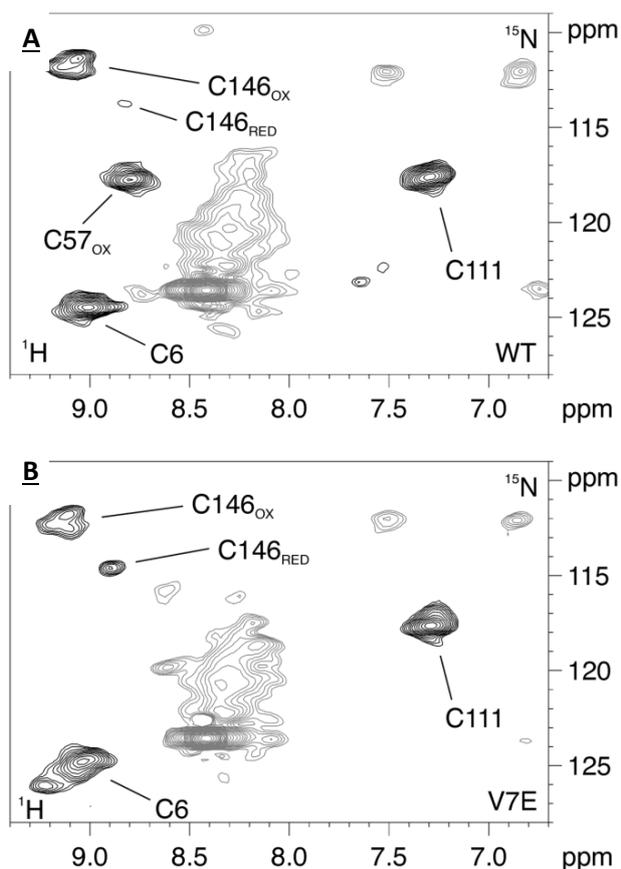
Spettro 2_2D ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC di V7E-SOD1 (A) e di SOD1-wt (B) espresse in $\text{Zn}(\text{II})$

Gli spettri registrati risultano estremamente simili. Poiché precedenti studi hanno evidenziato che la proteina SOD1-wt, in presenza di solo $\text{Zn}(\text{II})$, non raggiunge la struttura terziaria tipica dell'ambiente fisiologico²⁸, possiamo riscontrare lo stesso *folding* incompleto nel nostro campione V7E-SOD1.

²⁸ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)

1.2. V7E-SOD1 + Zn²⁺ + Cu²⁺ + CCS

Sono stati registrati gli spettri 2D ¹H-¹⁵N SOFAST HMQC del mutante V7E-SOD1 (spettro 3-B) e di SOD1-wt (spettro 3-A) espressi nelle stesse condizioni ed in terreno selettivamente arricchito contenente cisteine ¹⁵N:



Spettro 3_2D ¹H-¹⁵N SOFAST HMQC di SOD1-wt (A) e di V7E-SOD1 (B) espresse in Zn(II) + Cu(II) + CCS

L'analisi di questi spettri ci permette di studiare direttamente le cisteine che prendono parte alla formazione del ponte disolfuro in ogni sub-unità dell'enzima, ovvero la Cys57 e la Cys146. In particolare, osservando i segnali della proteina *wild-type*, identifichiamo tre picchi particolarmente significativi²⁹: i segnali della forma ossidata delle due cisteine, indice dell'avvenuta formazione del legame, ed una

²⁹ Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013)

trascurabile presenza di Cys146_{RED}. Quest'ultimo segnale è attribuibile al non raggiungimento della piena maturazione di parte della SOD1, probabilmente a causa di una insufficiente concentrazione di CCS, che non è riuscita a far fronte alla grande quantità di enzima over-espresso.

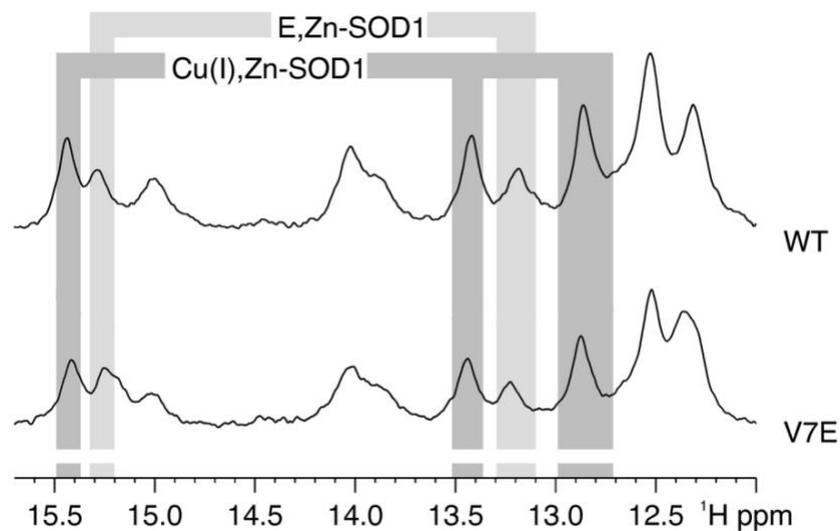
Confrontando le posizioni dei picchi delle cisteine nella SOD1-*wt*, possiamo procedere con l'analisi dello spettro riferito al mutante V7E-SOD1. Dall'intensità del segnale relativo alla Cys146, è riscontrabile la presenza di circa i 2/3 della proteina ancora in forma ridotta, mentre il segnale della Cys57 è completamente assente. Il primo risultato è chiaramente attribuibile ad una difficoltà del mutante nella formazione del legame disolfuro e, quindi, nella formazione della struttura quaternaria della proteina. L'analisi della Cys57 presenta, invece, maggiori problemi. Da studi di dinamica *in vitro*, effettuati su SOD1-*wt*³⁰, è stato verificato che il segnale della Cys57 in forma ridotta non è normalmente visibile in spettroscopia NMR, probabilmente a causa di processi di scambio che portano ad un allargamento del picco. Ciononostante questo non spiega il perché dell'assenza anche della Cys57_{OX}, che pur dovrebbe essere presente associata al segnale della Cys146_{OX}. Non è chiaro il motivo di questo fenomeno; l'ipotesi più accreditata è l'intervento, anche in questo caso, di fenomeni di scambio non ancora noti, che dovranno essere approfonditi ed analizzati in studi futuri di dinamica *in vitro*.

In grigio sono riportati i segnali del background cellulare, dovuto sia all'incorporazione delle cisteine labellate, sia al loro inserimento nel metabolismo della cellula ed alla conseguente formazione di ulteriori amminoacidi arricchiti con isotopo ¹⁵N (notare i picchi a *chemical shift* di 112ppm attribuibili a catene laterali). L'intenso segnale ad altezza 124ppm appartiene alla molecola di glutatione³¹ nel quale vengono incorporate le cisteine labellate durante il metabolismo cellulare.

Infine, per confermare l'*uptake* degli ioni metallici, sono stati registrati e confrontati spettri 1D ¹H NMR di V7E-SOD1 e SOD1-*wt* espressi in solo Zn²⁺ ed in presenza di Zn²⁺ + Cu²⁺ + CCS:

³⁰ Banci L., Bertini I., Cantini F., D'Onofrio M., Viezzoli M.S., *Protein Science*, Vol. **11**, Issue **10**, 2479-2492 (2009)

³¹ [γ -L-glutamyl-L-cisteinylglycine] tripeptide formato da Cys, Gly e Glu



Spettro 4_1D ^1H NMR di V7E-SOD1 e di SOD1-wt con evidenziati i segnali caratterizzanti dell'*uptake* di solo Zn(II) e di Zn(II) + Cu(II)

Evidenziando la zona di frequenze dove risuonano i segnali degli NH dell'anello delle istidine osserviamo una serie di segnali propri della proteina metallata. Poiché le His hanno $pK_a \sim 6.5$, simile a quella del buffer nel quale le cellule sono sospese, lo scambio del protone mobile dell'anello imidazolico è molto veloce e, quindi, lo spettro non dovrebbe mostrare segnali. La presenza dei picchi è attribuibile all'avvenuta formazione del legame tra un azoto imidazolico delle istidine poste nei siti di aggancio dei metalli e gli ioni Zn^{2+} (His80, 71, 63) e Cu^{2+} (His120, 48, 46). Il legame tra uno ione e l'anello impegna uno dei due atomi di N, cambiando la pK_a dell'altro azoto e rendendo, quindi, più lento lo scambio protonico.

2. Viability

Per verificare l'attendibilità degli spettri NMR registrati, è stato effettuato un controllo della vitalità cellulare sulle cellule contenute nei tubi *Shigemi* estratti del *probe*³².

<i>V7E-SOD1 + Zn²⁺</i>	pre-NMR	Tot.207 Morte 9	4,30%
	post-NMR	Tot.272 Morte 26	9,50%

<i>V7E-SOD1 + Zn²⁺ + Cu²⁺ + CCS</i>	pre-NMR	Tot.149 Morte 11	7,30%
	post-NMR	Tot.190 Morte 29	15,20%

Le stime percentuali di decessi rivelano una bassa mortalità cellulare durante l'acquisizione degli spettri e, quindi, confermano che l'analisi NMR è stata effettuata su cellule vive. Le percentuali sensibilmente maggiori riscontrate nei campioni di proteina espressa in Zn(II) + Cu(II) + CCS sono attribuibili alla presenza dello ione rame, che ha un effetto tossico sulle cellule³³.

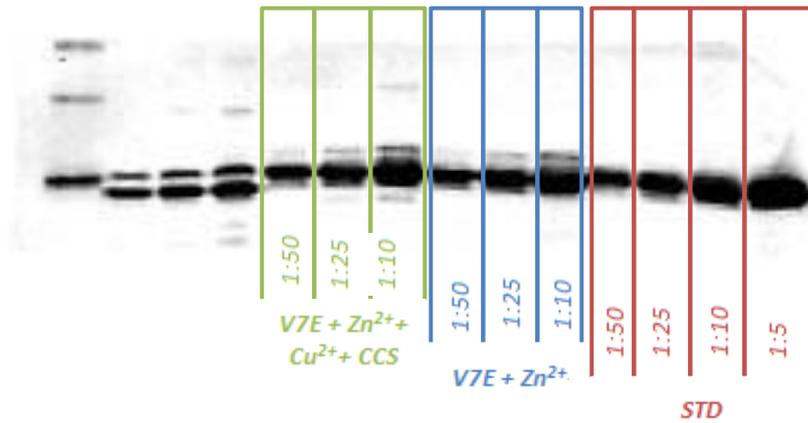
3. Western-Blot

Attraverso la tecnica di Western-Blot è stata stimata la concentrazione citoplasmatica della proteina mutata espressa. L'analisi è stata eseguita su entrambi i campioni di *V7E-SOD1*³⁴.

³² Vedi sezione TECNICHE DI COLTURA CELLULARE

³³ Vedi sezione METODI

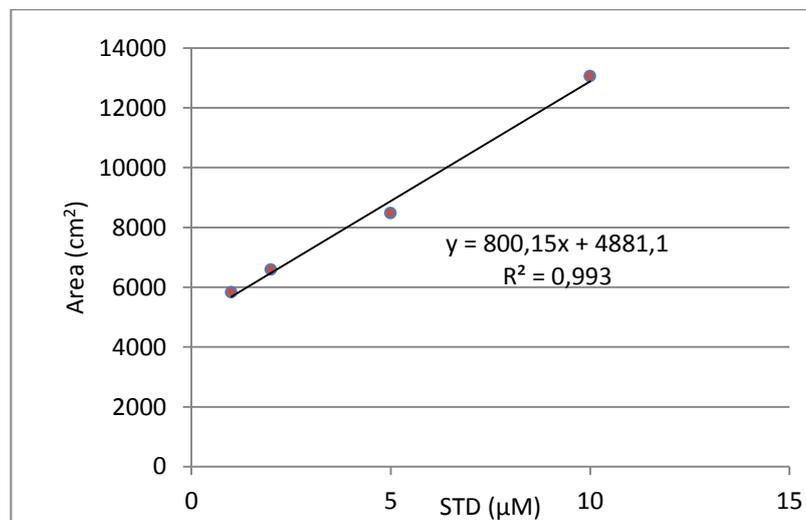
³⁴ Rispetto alla tabella riportata nella sezione METODI, l'immagine della membrana, trattata con reagenti chemiluminescenti, risulta ribaltata a causa dei processi di sviluppo.



12_Membrana Western-Blot con evidenziate le bande analizzate

Utilizzando *ImageJ* per integrare le bande è stata ottenuta una retta di taratura dagli standard, sulla quale sono state calcolate le concentrazioni di proteina nei campioni, fatta la media ed estratta la deviazione standard:

STD [μM]	Area [cm^2]
10	13052
5	8476
2	6580
1	5819



V7E + Zn²⁺

	y [cm ²]	x	conc.iniziale [μM]	Media [μM]	dev.std [μM]
1:10	8980	5,12	51,23	52,78	3,59
1:25	6702	2,28	56,89		
1:50	5685	1,00	50,23		

V7E + Zn²⁺ + Cu²⁺ + CCS

	y [cm ²]	x	conc.iniziale [μM]	Media [μM]	dev.std [μM]
1:10	8508	4,53	45,33	37,47	8,68
1:25	5782	1,13	28,15		
1:50	5504	0,78	38,92		

CONCLUSIONI

Il protocollo di espressione seguito per il mutante V7E della Superossido Dismutasi Cu/Zn ha portato ad ottenere concentrazioni d'enzima in cellula sufficienti per registrare spettri NMR ad alta risoluzione, con un'ottima percentuale di sopravvivenza cellulare durante l'acquisizione degli spettri.

Dalle analisi effettuate tramite *in-cell NMR* è stata osservata la presenza contemporanea di forma ossidata e ridotta della proteina, indice di una difficoltà nel completamento del *folding* e nel raggiungimento di una struttura quaternaria stabile. Poiché i valori che si discostano dal comportamento della SOD1-*wt* sono stati registrati solo nel campione espresso in presenza di entrambi i gli ioni metallici e del metallo-chaperone CCS, le perturbazioni dalla normale maturazione biologica dell'enzima sono attribuibili ad una interferenza della mutazione con la formazione dell'eterodimero SOD1-CCS.

BIBLIOGRAFIA

- Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu AR., *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299 (2013);
- Sheng Y., Chattopadhyay M., Whitelegge J., Valentine J.S., *Med. Chem.* **12**, 2560-2572 (2012);
- Seetharaman S.V., Prudencio M., Karch C., Holloway S.P., Borchelt D.R., Hart P.J., *Exp. Biol. Med.* **234(10)**, 1040-1154 (2009);
- Valentine J.S., Doucette P.A., Potter S.Z., *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 563-593 (2005);
- Crow J.P., Sampson J.B., Zhuang Y., Thompson J.A., Beckman J.S., *J. Neurochem.*, Vol. **69**, No. **5** (1997);
- Chattopadhyay M., Valentine J.S., *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol. **11**, No. **7** (2009);
- Sandelin E., Nordlund A., Andersen P.M., Marklund S.S.L., Oliveberg M., *J. Biol. Chem.*, Vol. **282**, No. **29**, 21230–21236 (2007);
- Ip P., Mulligan V.K., Chakrabartty A., *J.Mol.Biol.*, **409**, 839–852 (2011);
- Furukawa Y., O'halloran T.V., *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol. **8**, No. **5-6** (2006);
- Hayward L.J., Rodriguez J.A., Kim J.W., Tiwari A., Goto J.J., Cabelli D.E., Valentine J.S., Brown R.H.Jr., *J. Biol. Chem.*, Vol. **277**, No. **18**, 15923–15931 (2002);
- Strange R.W. et al. *J.Mol.Biol.* (2003);
- Banci L., Bertini I., Boca M., Giroto S., Martinelli M., Valentine J.S., Vieru M., *PLoS ONE*, Vol. **3**, Issue **2**, e1677 (2008);
- Mercedes Prudencio M., Borchelt D.R., *Mol. Neurodegen.*, **6**:77 (2011);

- Boncinelli E., Simeone A., Idelson P.I., *Ingegneria genetica*, Idelson-Gnocchi (2003) [ISBN: 8879473948]
- Bordo D., Pesce A., Bolognesi M. Stroppolo M.E., Falconi M., Desideri A., *Handbook of Metalloproteins*, 319-442 (2006);
- Bertini I., Sigel A., Sigel H., *Handbook on Metalloproteins*, Marcel Dekker Inc. [ISBN: 0-8247-0520-3] (2001);
- Robinson N.J., Winge D.R., *Annu. Re. Biochem.*, **79**, 537-562 (2010);
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell* (2007);
- Bordo D., Djinovic K., Bolognesi M., *J. Mol. Biol.*, **238(3)**, 366-86 (1994);
- Bordo D., Matak D., Djinovic-Carugo K., Rosano C., Pesce A., Bolognesi M., Stroppolo M.E., Falconi M., Battistoni A., Desideri A., *J. Mol. Biol.*, **285(1)**, 283-96 (1999);
- Banci L., Bertini I., Cantini F., D'Onofrio M., Viezzoli M.S., *Protein Science*, Vol. **11**, Issue **10**, 2479-2492 (2009);

APPENDICE 1

Tabella composizione DMEM (high glucose,D6546,Sigma)

		g/L
Inorganic Salts	<i>CaCl₂</i>	0,20000
	<i>Fe(NO₃)₃*9H₂O</i>	0,00010
	<i>MgSO₄</i>	0,09767
	<i>KCl</i>	0,40000
	<i>NaHCO₃</i>	3,70000
	<i>NaCl</i>	6,40000
	<i>NaH₂PO₄</i>	0,10600
Amino Acids	<i>L-Arginine*HCl</i>	0,08400
	<i>L-Cysteine*2HCl</i>	0,06260
	<i>Glycine</i>	0,03000
	<i>L-Histidine*HCl*H₂O</i>	0,04200
	<i>L-Isoleucine</i>	0,10500
	<i>L-Leucine</i>	0,10500
	<i>L-Lysine*HCl</i>	0,14600
	<i>L-Methionine</i>	0,03000
	<i>L-Phenylalanine</i>	0,06600
	<i>L-Serine</i>	0,04200
	<i>L-Threonine</i>	0,09500
	<i>L-Tryptophan</i>	0,01600
	<i>L-Tyrosine*2Na*2H₂O</i>	0,10379
	<i>L-Valine</i>	0,09400
Vitamins	<i>Choline Chloride</i>	0,00400
	<i>Folic Acid</i>	0,00400
	<i>myo-Inositol</i>	0,00720
	<i>Niacinamide</i>	0,00400
	<i>D-Panththenic Acid*(1/2)Ca</i>	0,00400
	<i>Pyridoxine*HCl</i>	0,00400
	<i>Riboflavin</i>	0,00040
	<i>Thiamine*HCl</i>	0,00400
Other	<i>D-Glucose</i>	4,50000
	<i>Phenol Red*Na</i>	0,01590
	<i>Pyruvic Acid*Na</i>	0,11000
Add	<i>L-Glutamine</i>	0,58400

Ringrazio la professoressa Pieratelli e la professoressa Banci per avermi dato la possibilità di venire a contatto con l'ambiente cordiale del CERM e per essersi dimostrate sempre pazienti nel colmare la mia ignoranza. Un profondo ringraziamento va a chi mi ha dovuto sopportare quotidianamente in questi mesi: Leonardo, che, tra battute e risa, in un frenetico mese, è riuscito a presentarmi tutto ciò che un laboratorio ha da offrire; Enrico, sempre prodigo di ottime spiegazioni e, ovviamente, Letizia, disponibile oltre ogni dire, con un allegro benvenuto ogni mattina. Grazie a tutti voi, ad Erica e a tutti gli abitanti del CERM, sempre pronti a scambiare un sorriso.

Questo è il traguardo di un percorso che dura ormai anni. È, quindi, davvero necessario ringraziare tutte le persone che, per tutto questo tempo, ho turbato in vario modo. Inizierò col ringraziare tutto il parentado, presente e passato, a partire dai miei amatissimi genitori, passando da sorella, zii, neo-nipote, nonni, fino ai cugini di vario grado, che mi hanno sostenuto e accompagnato fin qua. Infine grazie a tutti gli amici vicini e lontani, che ci sono o ci sono stati, perché se son quel che sono è anche colpa vostra.

Grazie Al cubo.