

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA CALABRIA**

**FACOLTÀ DI SCIENZE M.F.N**

**Dipartimento di Ecologia**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA VEGETALE**

**XXI CICLO-Settore Scientifico Disciplinare BIO/11**

**Tecnologie ricombinanti per la produzione di proteina  
HSP70 di *Arabidopsis thaliana* in organismi eterologhi**

**Coordinatore:**

**Prof. Aldo MUSACCHIO**

**Supervisore interno:**

**Prof.ssa Carla QUAGLIARIELLO**

**Dottoranda:**

**Dott.ssa Nadia ARMENTANO**

**Supervisore esterno:**

**Dott.ssa Rina IANNACONE**

## INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>pag 5</b>
<b>SOMMARIO</b> .....	<b>9</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>12</b>
1.1 Le heat shock proteins (HSPs) .....	12
1.1.1 HSP100/C1p .....	18
1.1.2 HSP90 .....	18
1.1.3 HSP60 (chaperonine) .....	19
1.1.4 HSP70 .....	20
1.1.5 sHSP( <i>small heat shock protein</i> ).....	21
1.2 HSPs e risposta immunitaria .....	22
1.3 Produzione di proteine ricombinanti in organismi eucariotici .....	26
1.3.1 Piante come biofabbriche di molecole ricombinanti.....	27
1.3.1.1 Produzione di proteine ricombinanti in essudati radicali.....	30
1.3.1 Produzione di proteine ricombinanti in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
<b>2 SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>33</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>34</b>
3.1 Induzione dello <i>shock</i> termico .....	34
3.2 Estrazione degli acidi nucleici .....	35
3.2.1 Estrazione del DNA genomico .....	35
3.2.2 Estrazione dell'RNA totale .....	36
3.3 Sintesi del cDNA .....	37
3.4 Amplificazione genica <i>in vitro</i> mediante <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	38
3.5 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR).....	41
3.6 Digestione del DNA con endonucleasi di digestione.....	43
3.7 Precipitazione del DNA .....	43
3.8 Sequenziamento automatico.....	44
3.9 Purificazione di frammenti genici da gel di agarosio.....	45
3.10 Clonaggio di DNA nel vettore pCR-Blunt II-TOPO .....	46
3.11 Trasformazione di cellule TOP10 di <i>E.coli</i> e selezione dei trasformanti.....	47

3.12 Estrazione del DNA plasmidico da cellule di <i>E.coli</i> (MiniPrep) .....	48
3.13 Costruzione del vettore pTOPOCalHSP70_3'His .....	49
3.14 Costruzione del vettore pJazz35S::CalHSP70_3'His .....	50
3.14.1 Preparazione dell'inserto e del vettore .....	52
3.14.2 Reazione di ligazione e trasformazione batterica .....	52
3.15 Sintesi del costruttoA4Y3His e costruzione del vettore pTOPOA4Y3His .....	53
3.16 Costruzione del vettore pESC-TrpA4Y3His.....	55
3.16.1 Preparazione del vettore e dell'inserto .....	55
3.16.2 Reazione di ligazione e trasformazione batterica .....	56
3.17 Trasformazione di cellule competenti di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YPH500) .....	58
3.17.1 Preparazione delle cellule YPH500 competenti .....	58
3.17.2 Trasformazione mediante <i>heat shock</i> e selezione dei trasformanti .....	58
3.18 Crescita dei trasformanti di <i>S.cerevisiae</i> .....	60
3.19 Crescita dei trasformanti di <i>S.cerevisiae</i> su media scala.....	60
3.20 Trasformazione genetica di <i>A.tumefaciens</i> (LBA4404).....	61
3.21 Estrazione di DNA plasmidico da cellule di Agrobatterio .....	62
3.22 Estrazione di proteine totali .....	63
3.22.1 Estrazione di proteine da <i>S.cerevisiae</i> mediante l'utilizzo di una French Press.....	63
3.22.2 Estrazione di proteine da <i>S.cerevisiae</i> mediante l'utilizzo di "glass-beads" .....	63
3.22.3 Estrazione di proteine da tessuto vegetale .....	64
3.23 Purificazione della proteina ricombinante HSP70 mediante cromatografia di affinità .....	65
3.24 Analisi Western Blot .....	66
3.24.1 Separazione elettroforetica delle proteine (SDS-PAGE).....	66
3.24.2 Trasferimento delle proteine su membrana PVDF .....	68
3.24.3 Immunoblotting delle proteine con anticorpi.....	68
3.25 Trasformazione mediata da Agrobatterio di espanti fogliari di <i>Nicotiana tabacum</i> .....	69
3.25.1 Preparazione della sospensione di Agrobatterio .....	69
3.25.2 Preparazione degli espanti fogliari.....	70
3.25.3 Co-coltivazione, selezione e rigenerazione.....	70
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>71</b>
4.1 Isolamento dei geni inducibili HSP70 in <i>Arabidopsis</i> .....	71
4.2 Over-espressione del gene CalHSP70_3'His in <i>Nicotiana tabacum</i> .....	73

4.3 Produzione della proteina ricombinante <i>His-tag</i> HSP70 in <i>S. cerevisiae</i> .....	87
4.3.1 Trasformazione delle cellule TOP10 con il vettore pESC-TrpA4Y3His e analisi dei trasformanti.....	88
4.3.2 Trasformazione di <i>S. cerevisiae</i> e selezione dei trasformanti .....	91
4.3.3 Crescita dei cloni di <i>S. cerevisiae</i> trasformati e verifica dell'espressione dei geni HSP70 nelle cellule trasformate .....	91
4.3.4 Produzione di HSP70 ricombinante in lievito.....	94
4.3.5 Purificazione della proteina ricombinante HSP70 .....	95
<b>5 CONCLUSIONI.....</b>	<b>98</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>99</b>

## ABSTRACT

Heat shock proteins (HSPs) are evolutionary highly conserved proteins that are present in all living organisms. They were discovered in 1962 by Ferruccio Ritossa during an heat shock experiment on fruits flies, but their identification and the term “heat shock proteins” have been coined in the 1974 (Ritossa, 1962; Tissieres *et al.*, 1974).

HSPs are classified into several families according their molecular size: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 and the small HSP (15 to 30 kDa) and they are located in all cellular and subcellular compartments (nucleus, membrane, cytosol, endoplasmic reticulum, mitochondria, lysosome).

They are expressed constitutively (cognate proteins or HSC) in all cells but their expression increases (inducible forms or HSP) after several stressful conditions, such as environmental (high temperature, oxidative stress, ultraviolet irradiation, heavy metals), pathological (viral or bacterial infections, inflammatory and malignancies) or physiological stimuli (cellular differentiation, hormones and growth factories (Ellen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Their overexpression is essential for survival of cells and their protective role has been shown *in vitro* and *in vivo*. The principal function of these class of proteins is operate as molecular chaperones contributing to cellular homeostasis. As molecular chaperones HSPs promote the correct folding of nascent proteins and misfolded proteins, prevent the protein aggregation and assist protein transport across membrane (Gehrmann *et al.*, 2008).

Recently an additional roles have been associated to HSPs as danger signals and as potent activators of immune system. It has been shown that these molecules are

capable of inducing the production of proinflammatory cytokines by the monocyte-macrophage system and the activation of antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells. In particular, mammalian cytosolic HSP70 and HSP90 bind antigenic peptides generated in cells and these complexes (HSP-PC) are taken up by antigen presentation cells via  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor (CD91)-mediated endocytosis, resulting in representation by the major histocompatibility complex (MHC) class I molecules (Srivastava, 2002). The capability of HSPs, particularly HSP70 and HSP90, to operate as molecular carrier for antigenic determinants suggests the possible application of these molecules for production of conjugated vaccines (Robert, 2003).

Lately, Kumaraguru et al. demonstrated that plant HSP70 mediated activation of mammalian immune system (Kumaraguru *et al.*, 2003). Therefore it's feasible to consider the use of plant HSP70 as adjuvant molecules for vaccines production or for other pharmaceutical applications .

Plants represent a renewable source and a safe system for production of molecules that can be used for human or animal vaccines.

Although plants could provide several pharmaceutical molecules the limitation for their massive use is mainly due to the very low content of active molecules in plant bio-mass and to difficult and expensive purification processes. Recombinant DNA technologies permit to overcome these limits. Many works reported the use of plant systems for the expression of therapeutic molecules, such as antibodies, hormones, growth factor, blood components, human and animal vaccines (Ma *et al.*, 2006). Recombinant proteins can be produced in several plant tissues or can be targeted to subcellular compartments such as endoplasmic reticulum (ER), chloroplast and mitochondria, where proteins are more stable, or intercellular space (apoplast). Latest

approach can be utilized to facilitate the recovery of recombinant proteins from roots exudates into hydroponic medium. This system, named rhizosecretion, has been used firstly by Borjsiuk and collaborators in 1999 to produce three different recombinant proteins in plant root exudates (Borjsiuk *et al.*, 1999).

In our work we used *Nicotiana tabacum* to induce constitutive expression of *Arabidopsis* HSP70. In particular we have genetically engineer tobacco to direct the recombinant HSP70 in the secretory pathway providing the HSP70 gene with a ER signal peptide from the abundant ER protein calreticulin of *N. plumbaginifolia* (Cal-HSP70). The presence of this signal peptide in the N terminal site of HSP70 should direct the recombinant protein to apoplasts and subsequently to the rhizosecretion pathway and consequently secrete the protein in the sterile hydroponic medium. Moreover, HSP70 targeted with the calreticulin signal peptide has been labelled with six histidine residues (His-tag) at its C terminus (Cal-HSP70-His). The His-tag signal will allow the rapid detection of His-tag HSP70 in transgenic tobacco by immunolocalization analysis with anti-His specific antibody.

The recombinant genes (Cal-HSP70 and Cal-HSP70-His), were inserted into binary plant expression vector “pJazz”, under transcriptional control of CaMV35S constitutive promoter. The expression of HSP70 in transgenic tobacco was evaluated by Quantitative Real Time PCR analysis. The results showed that HSP70 gene is correctly transcribed both in leaves and in roots of transgenic plants, although at different levels.

A further goal of our work was to purify the recombinant HSP70 from genetically engineered a strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this case a specific recognition sequence for enterokinase cleavage was added in 5' of the start codon

(first ATG) to allow the excision of extra sequences after purification of HSP70 protein from yeast cells.

*S. cerevisiae* combines the advantages of unicellular organism, such as ease of genetic manipulation and growth, with the capability of proteins processing that are typical for eukaryotic organism (protein folding, assembly and posttranslational modifications). As plants, yeast represent a safe system for the production of recombinant proteins, since there are no health risks arising from the presence of toxins or potential human pathogens. In fact this organism is recognized by the US Food and Drug Administration as an organism generally regarded as safe (Porro *et al.*, 2005).

Since 1995 there are many examples of recombinant proteins that were expressed in yeast, spanning from pharmaceutical products (insulin, interferon, erythropoietin, vaccines against hepatitis B) to industrial enzymes (used for treatments of food, feed, detergents and health care) (Porro *et al.*, 2005).

To obtain the expression of recombinant His-tag HSP70 in *S. cerevisiae* the protein coding gene was cloned under control of yeast inducible promoter GAL10 in the commercial vector named pESC-Trp (Stratagene). The production of His-tagged HSP70 was achieved using a 3 liters fermentator and yeast cells were disrupted by using the French Press. Proteins extracted from yeast cells were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The purification level of His-tagged HSP70 by IMAC was assessed by SDS-olyacrylamide gel electrophoresis and Western Blot analyses.

## SOMMARIO

Le *heat shock proteins* (HSPs) sono una classe di proteine altamente conservate tra gli organismi viventi. Sono state identificate per la prima volta nel 1974 (Tissieres *et al.*, 1974) come proteine coinvolte nella risposta allo stress da calore, o *heat shock*, scoperta da Ferruccio Ritossa nel 1962 durante un esperimento su *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962).

Le HSPs sono state raggruppate in diverse famiglie in relazione al loro peso molecolare: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 and the small HSP (15 to 30 kDa) e sono espresse in maniera costitutiva (cognate, HSC) in tutti i compartimenti cellulari e subcellulari (nucleo, mitocondri, cloroplasti, reticolo endoplasmatico, citosol).

La loro espressione è incrementata rapidamente (proteine inducibili) in condizioni di stress ambientali, quali lo *shock* termico, radiazioni ultraviolette, metalli pesanti, ma anche in seguito a stimoli fisiologici (fattori di crescita, ormoni e differenziazione cellulare) o patologici (infezioni batteriche o virali, infiammazione e tumori) (Wang *et al.*, 2004).

La principale funzione delle HSPs è quella di chaperoni molecolari contribuendo al mantenimento dell'omeostasi cellulare sia in condizioni normali che in condizioni di stress. Esse, infatti, provvedono al *fold*ing di proteine nascenti, prevengono la formazione di aggregati proteici in seguito a denaturazione e dirigono le proteine danneggiate verso il *pathway* di degradazione cellulare (Gehrmann *et al.*, 2008).

Studi recenti hanno associato alle HSPs un ruolo nell'attivazione della risposta immunitaria essendo capaci di indurre la produzione di citochine proinfiammatorie e l'attivazione delle “cellule presentanti gli antigeni” (APC) come le cellule

dendritiche. In particolare è stato dimostrato che le HSP70 e HSP90 citosoliche sono in grado di legare nella cellula peptidi antigenici e di dirigere questi complessi (HSP-PC) verso il *pathway* intracellulare per la presentazione ristretta agli antigeni di classe I del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) alle cellule CD8<sup>+</sup> T, mediante endocitosi mediata dal recettore CD91 (Srivastava, 2002).

La capacità delle HSP di agire come carrier di molecole antigeniche ha posto le basi per un possibile utilizzo di queste proteine per la produzione di vaccini coniugati (Robert, 2003).

Dal momento che HSPs di diversa origine presentano un'elevata omologia di sequenza ed una conservata funzione biologica *in vitro* (Kumaraguru *et al.*, 2003) è possibile pensare di utilizzare le HSPs vegetali come una risorsa alternativa di molecole adiuvanti o per la produzione di vaccini.

Le piante rappresentano una fonte rinnovabile e un sistema sicuro per la produzione di molecole di interesse farmaceutico, ma la produzione in pianta di queste molecole presenta alcune limitazioni come il basso contenuto rispetto alle proteine totali ed i complessi e costosi processi di purificazione delle proteine dai tessuti vegetali. Con l'avvento dell'ingegneria genetica è stato possibile superare questi limiti; infatti negli ultimi anni molte delle proteine ricombinanti attualmente impiegate nella clinica medica sono state espresse in pianta. L'utilizzo delle piante come sistema di espressione offre la possibilità di produrre proteine biologicamente attive; inoltre è possibile dirigere o esprimere direttamente le proteine ricombinanti in specifici compartimenti cellulari, citosol, reticolo endoplasmatico, cloroplasto o mitocondri, o spazio intercellulare (apoplasto).

In relazione a questa ultima possibilità Borisjuk e colleghi hanno sviluppato nel 1999 un sistema di produzione continua di proteine ricombinanti che sfrutta una delle caratteristiche tipiche delle piante, la secrezione (Borisjuk *et al.*, 1999).

Il primo obiettivo dell'attività di ricerca relativa a questi tesi è stato quello di indurre l'espressione costitutiva del gene HSP70 di *Arabidopsis thaliana* in *Nicotiana tabacum*, e di dirigere la proteina ricombinante HSP70 verso il pathway di secrezione, grazie alla presenza del peptide segnale della calreticulina (Cal). Con l'espressione del transgene in pianta, la proteina ricombinante (marcata con il peptide segnale della Cal, una delle proteine più abbondanti nel reticolo endoplasmatico), dovrebbe essere indirizzata verso questo compartimento, diretta verso il pathway di secrezione e, poiché manca il segnale di ritenzione nell'ER, rilasciata nell'apoplasto.

Inoltre per permettere una rapida localizzazione della HSP70 ricombinante (considerando che gli anticorpi anti-HSP70 riconoscono anche l'HSP70 endogena di tabacco) si è scelto di legare una sequenza che codifica per sei residui di istidina (His-tag) alla porzione C-terminale. L'HSP70 ricombinante potrà essere identificata mediante esperimenti di immunolocalizzazione, utilizzando anticorpi diretti contro il tag di istidina.

Per ottenere l'espressione costitutiva della proteina HSP70, il gene HSP70 che porta legato al 5' la sequenza del peptide segnale Cal ed al 3' la sequenza che codifica per l'His-tag è stato inserito nel vettore binario per l'espressione in pianta *pJazz*, sotto il controllo del promotore costitutivo CaMV35S. L'espressione del gene nelle piante di tabacco trasformate è stata valutata mediante analisi di Real Time-PCR. I risultati ottenuti hanno mostrato che il gene HSP70 è correttamente trascritto sia a livello fogliare che a livello radicale seppure a livelli differenti.

Contemporaneamente a questo lavoro nel corso di questo dottorato è stata portata avanti un'ulteriore attività di ricerca che ha avuto come obiettivo principale la produzione su media scala della proteina ricombinante HSP70 in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*.

*S. cerevisiae* combina i vantaggi dell'organismo unicellulare come la facilità di crescita e di manipolazione genetica, con la capacità di processare correttamente le proteine per la presenza dei corretti meccanismi di processing post-traduzionali tipici degli eucarioti. Inoltre è stato riconosciuto dall'US Food and Drug Administration come organismo sicuro (Porro *et al.*, 2005).

Per indurre la produzione della proteina ricombinante HSP70, la sequenza genica che codifica per questa proteina (a cui è stata aggiunta all'estremità 5' una sequenza di riconoscimento specifica per l'enterochinasi ed una sequenza specifica per l'His-tag) è stata clonata sotto il controllo del promotore inducibile di lievito GAL10 nel vettore commerciale pESC-Trp (Stratagene). La produzione della His-tag HSP70 è avvenuta mediante l'utilizzo di un fermentatore e le proteine estratte delle cellule di lievito sono state purificate mediante cromatografia per affinità. I risultati della purificazione sono stati verificati mediante elettroforesi SDS-PAGE e analisi di Western Blot.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Le *heat shock proteins* (HSPs)

Le *heat shock proteins* (HSPs) costituiscono una delle classi di proteine intracellulari più abbondanti e più conservate dal punto di vista filogenetico, presenti in tutti gli organismi, dai batteri all'uomo. Sono state identificate per la prima volta nel 1974 (Tissieres *et al.*, 1974) come proteine coinvolte nella risposta allo stress da calore, o *heat shock*, la cui scoperta risale a qualche anno prima, il 1962, quando Ferruccio Ritossa insieme ai suoi collaboratori notò che elevate temperature inducevano singolari modificazioni strutturali ed un inusuale profilo di espressione genica nei cromosomi politenici delle ghiandole salivari di *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962).

Le HSPs sono espresse in maniera costitutiva nelle cellule; la loro sintesi è rapidamente aumentata, nota come risposta allo stress, in presenza di elevate temperature, ma anche in altre condizioni di stress ambientali (radiazioni ultraviolette o metalli pesanti), in seguito a stimoli patologici (infezioni batteriche, infiammazione, tumori o autoimmunità) o fisiologici (fattori di crescita, stimolazione ormonale o differenziazione cellulare) (Jaattela, 1999).

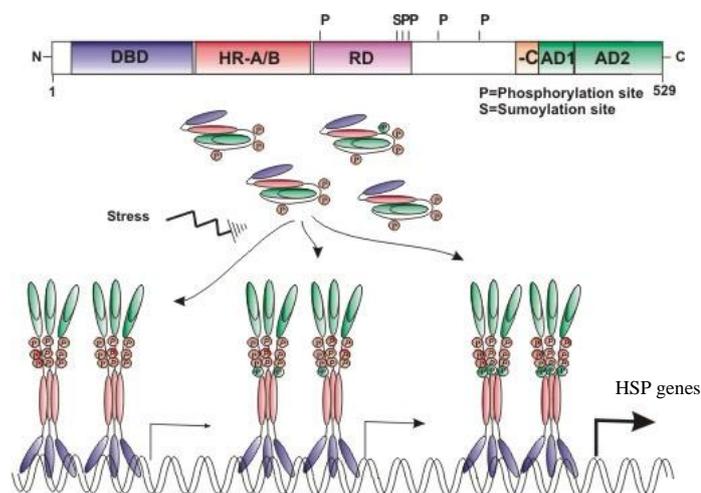
La principale funzione attribuita alle HSPs è quella di *chaperones* molecolari; esse infatti provvedono al corretto ripiegamento (*fold*ing) delle proteine, ne prevengono il *misfold*ing e l'aggregazione (Hartl *et al.*, 2002; Mayer and Bukau 2005).

Negli eucarioti i geni che codificano per queste proteine, definiti geni *heat shock* (HSG), sono stati classificati in relazione alla natura della loro attivazione trascrizionale in due gruppi principali: costitutivi (*cognate*) e inducibili.

L'attivazione trascrizionale dei geni HSP viene regolata da sequenze specifiche presenti nelle regioni promotrici. Alla base della regolazione dei geni HSP vi è l'interazione tra i cosiddetti fattori di trascrizione *heat shock* (HSF) e la sequenza *consensus*, localizzata a monte della regione promotrice, definita come *heat shock element* (HSE) che consiste di un sequenza ripetuta pentanucleotidica (5'-nGAAn-3'), altamente conservata tra i vari organismi (Pelham, 1982).

Nei vertebrati sono stati identificati quattro HSF; tra questi HSF-1 e HSF-2 sono conservati ed espressi in maniera ubiquitaria.

HSF-1 è indicato come l'elemento principale della regolazione dell'espressione dei geni *heat shock* in risposta a stress fisiologici e ambientali (Pirkkala *et al.*, 2001). Esso presenta un dominio funzionale che include un dominio di legame al DNA (DBD), due ripetizioni idrofobiche (HR-A/B, -C), un dominio regolatore (RD) e due domini di attivazione trascrizionale (AD-1, -2) (Figura 1). In particolare, il dominio RD contiene i siti per la fosforilazione costitutiva e inducibile dei residui di serina (Ser) e regola i domini AD-1 e AD-2 localizzati all'estremità C-terminale (Figura 1).

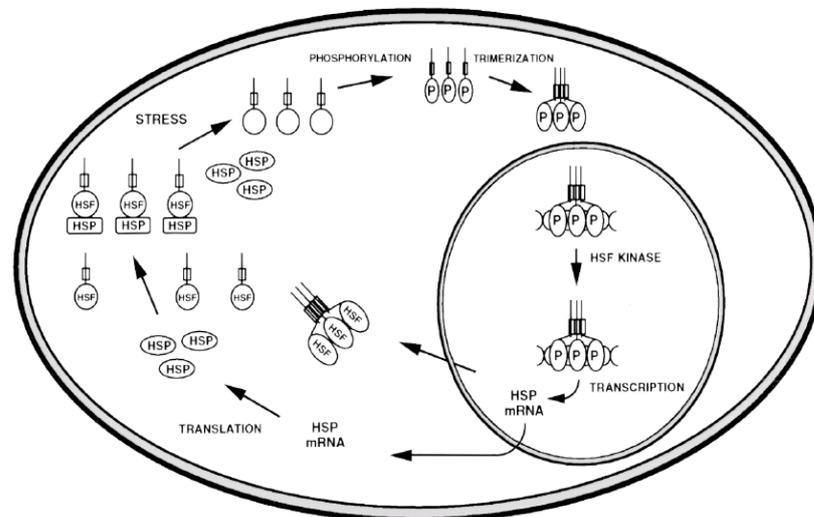


**Figura 1** Struttura e regolazione dell'attività trascrizionale di HSF-1 (Holmberg *et al.*, 2002 modificato).

HSF-1 è presente a livello citosolico legato agli *chaperones* molecolari come molecola monomerica inattiva, la cui attività trascrizionale è repressa dalla fosforilazione delle Ser303, Ser307 e Ser363 (Chu *et al.*, 1998).

In condizioni di stress, gli *chaperones* legano le proteine denaturate, con conseguente dissociazione del complesso citosolico *chaperones*/HSF-1. In seguito a questa dissociazione sull'HSF-1 si libera il segnale di localizzazione nucleare che guida la sua traslocazione dal citoplasma al nucleo. Durante questo processo HSF-1 viene fosforilato a livello del residuo Ser203, assume la forma di trimero con attivazione della sua attività trascrizionale e trasloca al nucleo (Pirkkala *et al.*, 2001).

In forma di trimero HSF-1 è in grado di legare il DNA a livello degli HSE dei geni HSP attivandone la trascrizione (Morimoto, 2002) (Figura 2).



**Figura 2** Meccanismo proposto per descrivere l'incremento stress-indotto delle HSPs in cellule umane e di *Drosophila melanogaster*. Gli HSFs sono normalmente presenti nel citosol in forma inattiva, legati alle HSPs. In condizioni di stress gli HSFs si separano dalle HSPs, sono fosforilati da proteine chinasi e formano trimeri che traslocano dal citosol al nucleo. Nel nucleo gli HSFs legano il DNA a livello degli HSE nella regione promotrice dei geni HSP. Gli HSFs sono ulteriormente fosforilati nel nucleo e inducono la trascrizione degli mRNA target. Gli HSF lasciano, quindi, il nucleo e ritornano nel citosol dove legano le HSPs (Kiang, 1998).

Le HSPs sono state raggruppate in diverse famiglie in relazione al loro peso molecolare.

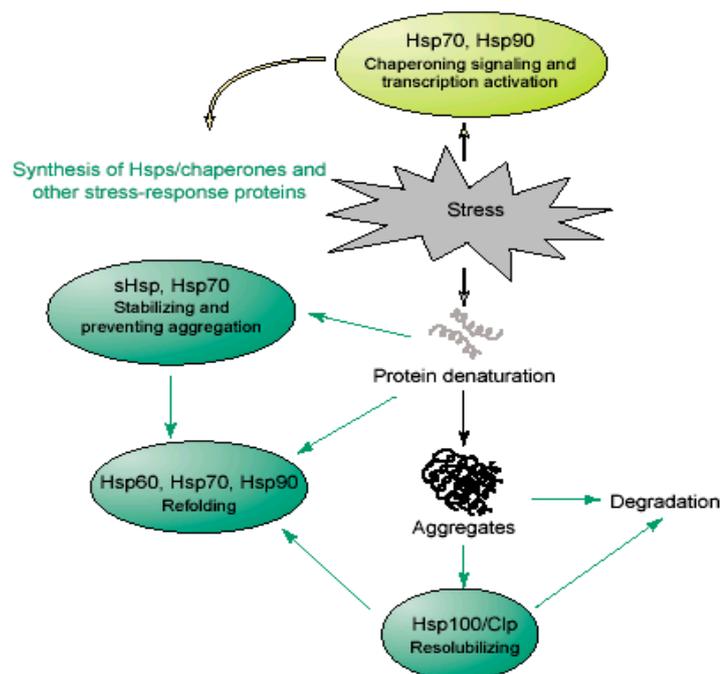
I membri equivalenti delle famiglie HSP tra i diversi organismi presentano un elevato grado di similarità di sequenza e conservano la stessa funzione biologica.

Le principali famiglie di HSPs sono rappresentate dalle HSP100/Clp, HSP90, HSP70, HSP60/chaperonine e una larga famiglia di HSPs a basso peso molecolare (12-40 kDa), definite *small HSP* (sHSP) (Wang *et al.*, 2004). In Tabella 1 sono riportati i membri rappresentativi di ciascuna famiglia, la loro localizzazione intracellulare e le principali funzioni svolte (Wang *et al.*, 2004).

Classes	Representative members	Intracellular localization	Major functions
<b>Hsp70</b>			Preventing aggregation, assisting refolding, protein import and translocation, signal transduction, and transcriptional activation
Subfamily: DnaK	Hsp/Hsc70 Hsp70 Bip <sup>1</sup>	Cytosol Chloroplast, mitochondria Endoplasmic reticulum	
Hsp110/SSE	Hsp91	Cytosol	
<b>Chaperonin/Hsp60</b>			Folding and assisting refolding
Subfamily: Group I Group II	Cpn60 <sup>2</sup> CCT <sup>3</sup>	Chloroplast, mitochondria Cytosol	
<b>Hsp90</b>	Hsp90		Facilitating maturation of signaling molecules, genetic buffering
	AtHsp90-1 AtHsp90-5 AtHsp90-6 AtHsp90-7	Cytosol Chloroplast Mitochondria Endoplasmic reticulum	
<b>Hsp100/Clp</b>	Hsp100 <sup>4</sup>		Disaggregation, unfolding
Subfamily: Class I	ClpB, ClpA/C ClpD	Cytosol, mitochondria Chloroplast	
Class II	ClpM, ClpN ClpX, ClpY	Chloroplast Chloroplast	
<b>sHsp</b>			Preventing aggregation, stabilizing non-native proteins
Subfamily: I II III IV V VI	Hsp17.6 Hsp17.9 Hsp21 Hsp26.2 <sup>5</sup> Hsp22 Hsp23 <sup>5</sup> Hsp22.3	Cytosol Cytosol Chloroplast Endoplasmic reticulum Mitochondria Membrane	

**Tabella 1** Membri principali delle famiglie HSP con rispettiva localizzazione cellulare e funzione (Wang *et al.*, 2004).

In condizioni di stress le HSPs cooperano tra loro nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. In Figura 3 è riportato il “sistema network HSP/chaperone” caratterizzato dalla cooperazione delle diverse famiglie di HSP nella protezione delle proteine e nel ripristino dell'omeostasi cellulare negli organismi viventi in condizioni di stress abiotico (Wang *et al.*, 2004). Ben documentata è inoltre l'interazione delle HSPs con un crescente numero di molecole segnale, che comprendono recettori degli ormoni nucleari, tirosine- e serine/treonine chinasi, regolatori del ciclo cellulare e della morte cellulare, dimostrando il loro ruolo chiave nei sistemi di trasduzione dei segnali cellulari (Ellen *et al.*, 2002).



**Figura 3** Cooperazione tra i membri appartenenti alle differenti famiglie di HSP/chaperone nel mantenimento dell'omeostasi cellulare in condizioni di stress (Wang *et al.*, 2004).

### **1.1.1 HSP100/Clp**

I membri di questa famiglia di proteine oltre a funzionare da *chaperones* molecolari, prevenendo il *misfolding* delle proteine, giocano un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, prevenendo la formazione di aggregati proteici e/o promuovendo la degradazione di proteine non funzionali (Wang *et al.* , 2004; Tabella 1).

Nel prevenire l'aggregazione proteica, le HSP100/Clp cooperano con un altro sistema chaperone ATP-dipendente, le HSP70. In particolare, i membri della famiglia HSP100/Clp solubilizzano gli aggregati proteici e rilasciano le proteine che, in seguito all'intervento delle HSP70, assumono la loro giusta conformazione (Goloubinoff *et al.*, 1999).

L'espressione delle HSP100, in genere presenti nelle piante in maniera costitutiva, è potenzialmente regolata e indotta da diversi fattori di stress ambientali, come il calore, il freddo, la siccità e l'alta concentrazione salina dei suoli (Queitsch *et al.*, 2000).

### **1.1.2 HSP90**

La famiglia delle HSP90 si distingue dalle altre famiglie di HSP per la natura dei suoi substrati, coinvolti principalmente nei meccanismi trasduzionali, come il recettore degli ormoni steroidei e le proteine chinasi (Young *et al.*, 2001). Il loro ruolo principale resta comunque quello di dirigere il *folding* delle proteine (Frydman, 2001).

Dati recenti hanno associato a queste proteine un'ulteriore funzione, ossia quella di interagire con il proteasoma 26S e di giocare un ruolo essenziale nel suo assemblaggio e mantenimento (Imai *et al.*, 2003).

Le funzioni delle HSP90 sono state associate anche con lo sviluppo morfologico. In *Drosophila*, infatti, una diminuzione dei livelli di HSP90 funzionali, generata mediante mutagenesi o in seguito a trattamenti con un inibitore delle HSP90, è correlata a cambiamenti morfologici e ad uno sviluppo anomalo (Rutherford and Lindquist, 1998).

Sebbene le HSP90 siano presenti in maniera costitutiva, come per i membri delle altre famiglie di HSP, la loro espressione incrementa in risposta agli stress sia nei procarioti che negli eucarioti (Krishna *et al.*, 2001).

### **1.1.3 HSP60 (chaperonine)**

Questa famiglia di proteine, è anche nota con il termine di *chaperonine*, suggerito per la prima volta nel 1988 per descrivere una classe di *chaperones* molecolari omologhi dal punto di vista evolutivo alla proteina GroEL di *E. coli* (Hemmingsen *et al.*, 1988). I membri della famiglia delle *chaperonine* 60 hanno una caratteristica struttura a doppio anello, ciascuno costituito da 14 subunità, che racchiude una cavità centrale all'interno della quale si legano i substrati proteici che devono subire il *folding* (Ranford *et al.*, 2000). Ciascuna delle 14 subunità è costituita da tre domini: un dominio apicale, responsabile del legame con il substrato e GroES; un dominio equatoriale, che contiene il sito di legame per l'ATP; e un dominio intermedio che connette i primi due.

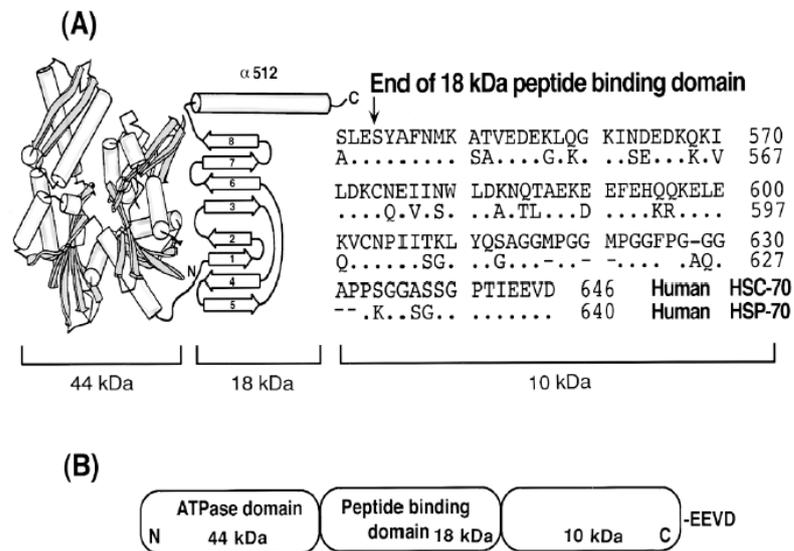
Le *chaperonine* sono suddivise in due classi: le *chaperonine* GroEL presenti in batteri, mitocondri e cloroplasti, e le *chaperonine* CCT, trovate negli Archea e nel citosol degli eucarioti (Ranson *et al.*, 1998; Tabella 1).

Insieme con GroES (*chaperonina* 10), GroEL gioca un ruolo critico nel *folding* di molte proteine cellulari, sia in condizioni normali che di stress (Ewalt *et al.*, 1997).

### 1.1.4 HSP70

La famiglia HSP70 costituisce la più conservata e meglio studiata tra le famiglie delle HSPs. Oltre che dirigere il *fold*ing delle proteine, le HSP70 sono coinvolte in diverse attività cellulari, come la degradazione di proteine, la riorganizzazione di componenti del citoscheletro, l'inizio della traduzione, l'*import* e l'*export* di proteine nucleari, l'assemblaggio dei ribosomi e la sintesi del DNA (Forreiter and Nover, 1994).

Tutte le HSP70 presentano nella regione N-terminale, un dominio di legame per l'ATP di 44 kDa (*ATPase-domain*), un sito di legame per il peptide (*peptide binding domain*) localizzato in un frammento di 18 kDa, formato da due porzioni, ciascuna costituita da 4 foglietti  $\beta$  antiparalleli ( $\beta$ -*sheets*) e da una porzione ad  $\alpha$ -elica, ed un dominio C-terminale di 10 kDa (Wang *et al.*, 1993; Morshauser *et al.*, 1995) (Figura 4).



**Figura 4** Struttura molecolare dell'HSC70 e HSP70 umane (A) e caratterizzazione dei singoli domini (B) (Kiang JG and Tsokos GC, 1998).

L'*ATPase-domain* ed il *peptide binding domain* sono altamente conservati, le uniche variazioni nella sequenza aminoacidica riscontrate tra i membri appartenenti alla famiglia HSP70 sono state identificate tutte a livello delle estremità N- e C-terminale dove risiede l'informazione per la localizzazione subcellulare e per le interazioni intra- ed intermolecolari (Freeman *et al.*, 1995; Hartl 1996). La famiglia delle HSP70 umane consiste di almeno 12 membri, tra i quali i più conosciuti sono rappresentati dalle HSP70 espresse nelle cellule in maniera costitutiva (Hsc70 o HSP73, peso molecolare di 73 kDa), le HSP70 inducibili (HSP70 o HSP72; peso molecolare di 72 kDa), le HSP70 mitocondriali (HSP75; peso molecolare di 75 kDa) e del reticolo endoplasmatico (Grp78; peso molecolare di 78 kDa) (Asea, 2007).

#### **1.1.5 sHSP ( *Small Heat Shock Protein* )**

Le sHSP costituiscono le HSPs a più basso peso molecolare (12-40 kDa); sono up-regolate in risposta a *heat shock* e ad altri tipi di stress, durante la meiosi e presentano un'espressione tessuto specifica e differenziata durante i vari stadi dello sviluppo (Greyson *et al.*, 1996; Friedberg and Walden, 1998).

Le sHSP sono presenti in maggior numero nelle piante rispetto ad animali e lieviti e differiscono tra loro in relazione alla localizzazione cellulare ed alle funzioni svolte (Waters *et al.*, 1996).

Nelle piante questa famiglia di proteine è stata suddivisa in sei classi in base alla similarità aminoacidica ed alla localizzazione cellulare (Wang *et al.*, 2004; Tabella 1).

La presenza delle sHSP in molti compartimenti cellulari riflette probabilmente un adattamento molecolare alle condizioni di stress che sono uniche per le piante. L'alto numero di queste proteine e le caratteristiche funzionali di legame e di

stabilizzazione delle proteine denaturate, conferiscono alle sHSP un ruolo importante nella tolleranza acquisita agli stress negli organismi vegetali (Sun *et al.*, 2002).

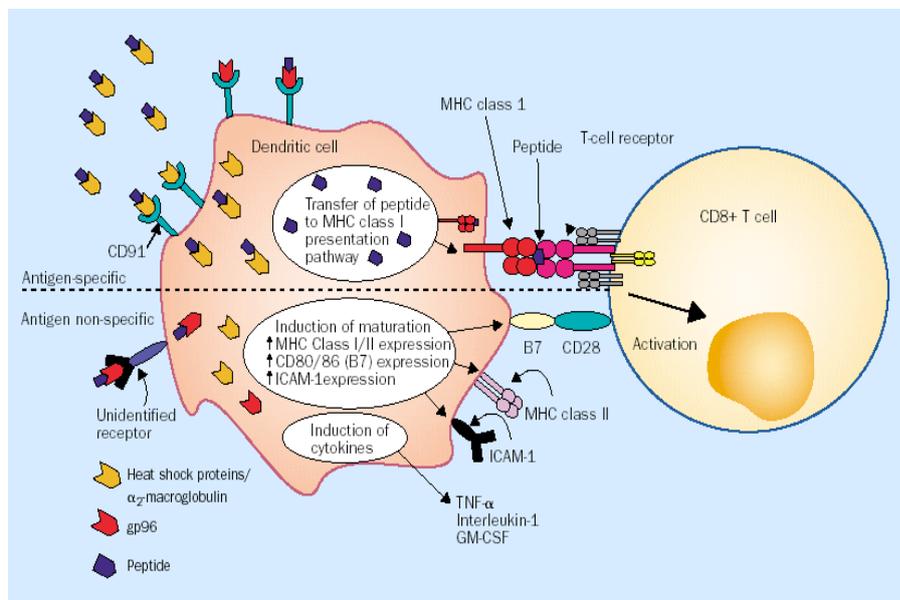
## **1.2 HSPs e risposta immunitaria**

Studi recenti hanno associato alle HSPs dei mammiferi la funzione di molecole *carrier* ed una forte potenzialità nel promuovere la risposta immunitaria in seguito all'infezione da parte di patogeni e contro i tumori, insieme ad una elevata proprietà adiuvante (Kumaraguru *et al.*, 2003).

Le HSPs del citosol, come HSP70 e HSP90, e del reticolo endoplasmatico come gp96, presentano, infatti, una immunogenicità peptide-dipendente poiché, come *chaperones* intracellulari, sono in grado di legare un'ampia varietà di peptidi e di interagire efficientemente con le "cellule presentanti l'antigene" (APC), coinvolte nell'attivazione della risposta immunitaria acquisita (Srivastava 2002; Miller *et al.*, 2003). In relazione alla loro doppia funzione, di *chaperones* molecolari e citochine, è stato designato per le HSPs un nuovo termine quello di "chaperokine" (Asea *et al.*, 2000). Proprio attraverso la loro funzione come citochine queste proteine potrebbero servire alle cellule come "segnale di pericolo" e, quindi, stimolare il sistema immunitario (Wallin *et al.*, 2002).

Numerosi sono i dati riportati in letteratura che dimostrano la caratteristica di potenti attivatori del sistema immunitario. HSPs provenienti da preparazioni purificate da batteri e mammiferi, come da prodotti ricombinanti batterici e umani, hanno mostrato indurre la produzione di citochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$ , l'interleuchina (IL)-1, IL-6 e IL-12 e il rilascio di ossido nitrico e chemochine (Tsan and Gao, 2004).

Un elevato numero di dati emersi da studi *in vitro* con cellule murine e umane indica che le APC, come le cellule dendritiche (DC), internalizzano rapidamente complessi HSP-peptide purificati, mediante endocitosi mediata da recettori (Srivastava 2002; Pockley, 2003; Figura 5). In particolare, i complessi HSP/peptidi (HSP-PC) sono internalizzati nelle DC mediante il recettore CD91 (membro delle lipoproteine a bassa densità) e conducono l'antigene verso il *pathway* intracellulare per la presentazione ristretta agli antigeni di classe I del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) alle cellule CD8<sup>+</sup> T (Figura 5). Non tutte le HSPs sono in grado di legare il recettore CD91, HSP60 infatti non lega questo recettore e l'identificazione di un sito di legame unico per questa classe di HSPs sui macrofagi, ne suggerisce un ruolo nella immunoregolazione che è distinto da quello delle altre HSPs, come HSP70 e HSP90 (Habich *et al.*, 2002).



**Figura 5** Effetti delle HSPs sulle cellule dendritiche (DC) e induzione dell'immunità peptide-specifica. Le HSPs sono internalizzate dalle DC attraverso il recettore CD91 e conducono i peptidi legati verso il *pathway* di presentazione degli antigeni di classe I del MHC per la successiva presentazione alle cellule CD8<sup>+</sup> T (Pockley, 2003).

È stato suggerito per le HSPs anche un ruolo nel *processing* degli antigeni MHC II e quindi nell'attivazione delle CD4<sup>+</sup> T. Tobian e collaboratori hanno infatti dimostrato che HSPs batteriche esogene, come la DnaK di *E. coli* e la HSP70 di *Mycobacterium tuberculosis*, sono in grado di potenziare la presentazione ristretta agli antigeni MHC II alle cellule CD4<sup>+</sup> T (Tobian *et al.*, 2004).

Un recente studio ha attribuito alle HSP70 un'attività immunostimolatoria sulle cellule NK. Mediante esperimenti di citometria di flusso, usando uno specifico anticorpo anti-HSP70, è stata infatti identificata una HSP70 legata alla membrana in grado di stimolare l'attività citotossica delle NK in linee cellulari tumorali. Nessuna proteina HSP70 è stata invece trovata legata alla membrana di cellule sane (Welch and Suhan, 1986; Multhoff *et al.*, 1995; Hantschel M *et al.*, 2000). L'epitopo dell'anticorpo utilizzato per identificare nelle cellule tumorali l'HSP70 legata alla membrana è stato localizzato nel dominio di legame del substrato nella porzione C-terminale dell'HSP70, ed è corrispondente ad una sequenza di 14 aminoacidi (aa<sub>450-463</sub>) identificata come TKD.

Questo dato è stato confermato dai risultati ottenuti in una serie di studi clinici condotti su pazienti affetti da tumori. In questi esperimenti è stato osservato infatti che l'incubazione con TKD di linfociti provenienti da sangue periferico, in presenza di una piccola dose di IL-2, è in grado di indurre sia *in vitro* che *in vivo* l'attivazione delle NK contro forme tumorali che presentano la proteina HSP70 legata alla membrana, mentre non c'è attivazione delle NK nell'incubazione delle stesse cellule con il TKD modificato a livello di due residui aminoacidici (Multhoff *et al.*, 2001). Nella fase I della sperimentazione clinica condotta da Krause e collaboratori è stato verificato inoltre che la stimolazione *ex vivo* delle cellule NK con TKD è risultata sicura e ben tollerata (Krause *et al.*, 2004). Questi incoraggianti risultati hanno

avviato una serie di attività di ricerca con lo scopo di testare in studi clinici un'ampia varietà di reagenti in grado di modulare l'espressione delle HSP70 a livello della membrana e influenzare la suscettibilità alla lisi cellulare mediata da NK. Queste scoperte potrebbero fornire le basi per lo sviluppo di studi clinici e protocolli terapeutici che combinano classiche terapie come radio- e chemioterapia ad approcci immunologici (Gehrmann *et al.*, 2008).

Secondo uno studio recente condotto da Srivastava (Srivastava, 2008), HSP-PC estratti e reintrodotti in forma purificata in pazienti affetti da patologie tumorali potrebbero agire come potenti vaccini in grado di stimolare il sistema immunitario ad attaccare le cellule che mostrano questi specifici antigeni tumorali. Questo approccio è stato testato negli USA, in Australia, Europa e Russia in una serie di studi (fase I e II di sperimentazione clinica) condotti su pazienti affetti da diverse forme di tumore, come il cancro renale ed il melanoma. In particolare, individui affetti da melanoma che avevano ricevuto sufficienti dosi di vaccini con HSP-PC hanno mostrato una maggiore sopravvivenza rispetto ai soggetti trattati con le terapie classiche, come la chemioterapia. Questi risultati sono bastati al governo russo per approvare il trattamento con il primo vaccino (HSPPC-96/vitespen; Antigenics) contro tumori solidi da inserire negli attuali usi clinici (Srivastava, 2008).

Oltre al ruolo come stimolatori del sistema immunitario, alle HSPs è stato anche attribuito un ruolo come inibitori della risposta immunitaria. Cohen e collaboratori sono convinti da tempo che la HSP60 potrebbe fungere nell'uomo da autoantigene nel diabete di tipo I, stimolando una risposta immunitaria diretta verso le cellule pancreatiche produttrici dell'insulina. Da un po'di anni sono in corso molti esperimenti per dimostrare il coinvolgimento di queste proteine nelle malattie

autoimmunitarie, e già alcuni dei risultati ottenuti sembrerebbero confermare questa idea (Srivastava, 2008).

### **1.3 Produzione di proteine ricombinanti in organismi eucariotici**

Le risorse naturali di proteine sono spesso limitate ed i costi per la loro estrazione e purificazione risultano comunque molto elevati. Oggi questi ostacoli possono essere superati grazie allo sviluppo di tecniche di ingegneria genetica grazie alle quali è possibile produrre proteine eterologhe in nuovi ospiti.

La tecnologia del DNA ricombinante offre la possibilità di estendere la varietà di molecole nutrizionali, terapeutiche e di importanza industriale che potrebbero essere prodotte in sistemi cellulari che naturalmente non producono tali molecole. I primi prodotti biotecnologici ottenuti nel mondo sono state molecole ad uso farmaceutico, come l'insulina, l'interferone, l'eritropoietina, il vaccino contro l'epatite B, e enzimi industriali come quelli impiegati nel trattamento di prodotti alimentari e detersivi (Porro *et al.*, 2005).

I sistemi impiegati per la produzione di proteine eterologhe sono rappresentati da organismi sia procariotici che eucariotici (batteri, lievito, mammiferi e piante) (Fischer *et al.*, 1999). L'ospite procariotico per eccellenza più utilizzato in ingegneria genetica è *E. coli*, per il quale sono ben noti la genetica, la biochimica e la fisiologia, nonché le tecniche di fermentazione. Gli svantaggi nell'utilizzare questo microrganismo sono legati al fatto che esso manca dei meccanismi di *processing* post-traduzionale delle proteine ed in molti casi le proteine eterologhe prodotte sono internalizzate in corpi di inclusione nella cellula batterica, che determina spesso la perdita dell'attività enzimatica e della corretta struttura tridimensionale delle proteine prodotte. Come risultato di queste deficienze le proteine così prodotte non possono

essere utilizzate nell'uomo, a meno che non subiscano il corretto folding *in vitro* (Porro *et al.*, 2005).

Molti sono invece i vantaggi della produzione di proteine ricombinanti in cellule eucariotiche (mammiferi, lievito e piante) rispetto ai sistemi procariotici, come la presenza dei processi di glicosilazione, fosforilazione, acetilazione e carbossilazione, la formazione di ponti di solfuro, il corretto folding, il taglio proteolitico della forma precursore, che sono essenziali per ottenere proteine stabili e biologicamente attive. Infine, ma non meno importante, il rischio di contaminazione da tossine o potenziali patogeni per l'uomo è ridotto al minimo (Daniell *et al.*, 2001).

### **1.3.1 Piante come biofabbriche di molecole ricombinanti**

L'utilizzo delle piante come sistema di produzione di molecole di interesse farmaceutico costituisce una delle maggiori attività nel campo della genetica e della biotecnologie vegetali.

Le piante transgeniche produttrici di molecole ricombinanti possono essere ottenute sia mediante meccanismi di trasformazione diretta che indiretta. La trasformazione diretta è effettuata mediante elettroporazione, microiniezione, tramite sistema biolistico o "particle gun", o mediata da polietilenglicole (PEG). La trasformazione indiretta è invece effettuata mediante l'utilizzo di virus delle piante o dell'*Agrobacterium tumefaciens*.

La trasformazione mediata da *A. tumefaciens* sfrutta la capacità posseduta naturalmente dal batterio di infettare la pianta e di trasferire, con conseguente integrazione nel DNA cromosomico delle cellule vegetali, una regione del proprio plasmide Ti (induttore del tumore del colletto), nota come T-DNA.

Il T-DNA è compreso tra due sequenze molto conservate definite *left* (LB) e *right border* (RB) di circa 25 paia di basi (bp) che delimitano la regione del T-DNA che va ad integrarsi nel genoma nucleare vegetale. Nei ceppi wild type il T-DNA contiene i geni che regolano la sintesi delle opine, che rappresentano nelle cellule infettate la fonte di azoto e carbonio per il batterio, ed i geni che codificano per enzimi coinvolti nella divisione cellulare. L'integrazione stabile e l'espressione del T-DNA induce nelle piante infettate le caratteristiche modificazioni morfologiche e differenziative tipiche del tumore.

La tecnica della trasformazione genetica è stata sviluppata proprio sulla base di queste scoperte. I geni di interesse da trasferire nel genoma della pianta ospite possono essere inseriti nella regione delimitata dal LB e RB mediante cointegrazione per ricombinazione del vettore che porta il gene di interesse ed il plasmide Ti (Ti disarmato).

Molto più utilizzato nelle tecniche di biotecnologie vegetali è la trasformazione mediante l'utilizzo del sistema binario, ossia l'utilizzo di due plasmidi. In questo sistema un "mini plasmide" Ti disarmato, che contiene un'origine di replicazione riconosciuta sia da *E. coli* che da Agrobatterio, e nella regione delimitata da LB e RB il costrutto genico di interesse ed un gene marcatore per la selezione delle cellule trasformate, è inserito in un ceppo di Agrobatterio portatore di un plasmide "helper", dove sono contenuti i geni per la virulenza, indispensabili per indurre il trasferimento del T-DNA.

Dall'avvento dell'ingegneria genetica moltissime sono le molecole ricombinanti, di interesse farmaceutico, che sono state espresse in sistemi vegetali.

La prima proteina ricombinante utilizzata in campo farmacologico espressa in pianta (tabacco) è stato l'ormone della crescita (Barta *et al.*, 1986), successivamente

Sijmons e collaboratori hanno prodotto l'albumina umana in piante transgeniche di tabacco e patata (Sijmons *et al.*, 1990). In Tabella 2 sono riportate alcune delle proteine di interesse farmacologico prodotte in sistemi vegetali.

<b>Proteina ricombinante</b>	<b>Pianta ospite</b>	<b>Applicazione farmacologica</b>
Proteina C umana	Tabacco	Anticoagulante
Somatropina umana	Tabacco	Controllo proliferazione cellulare
Eritropoietina umana	Tabacco	Anemia
Interferone $\alpha$ umano	Riso	Epatite B e C
Interferone $\beta$ umano	Tabacco	Epatite B e C
Albumina umana	Tabacco	Cirrosi epatica
Lattoferrina umana	Patata	Antimicrobico
$\alpha$ -1-antitripsina	Riso	Fibrosi cistica
Glucocerebrosidasi	Tabacco	Malattia di Gaucher's

**Tabella 2** Prodotti di interesse farmacologico ottenuti in piante transgeniche (Daniell *et al.*, 2001).

Molte delle proteine prodotte negli ultimi anni in piante transgeniche sono rappresentate da antigeni. Alcuni esempi sono l'antigene marcatore di carcinomi epiteliali (CEA), che è stato espresso sia in riso che in mais (Stoger, 2000), l'antigene dello *Streptococcus mutans*, agente della carie dentaria, espresso da Ma e collaboratori in tabacco (Ma *et al.*, 1998), che sono attualmente in fase II di sperimentazione clinica, e l'antigene di superficie del virus dell'epatite B espresso in patata, anch'esso utilizzato nella sperimentazione clinica (Richter *et al.*, 2000).

### 1.3.1.1 Produzione di proteine ricombinanti in essudati radicali

Come descritto nel precedente paragrafo molti sono gli esempi di proteine ricombinanti che grazie alla tecnologia del DNA ricombinante sono state prodotte in diversi sistemi vegetali. I convenzionali sistemi di estrazione di queste proteine dalle piante prevedono l'utilizzo di solventi, che spesso sono anche sinonimo di complessi e costosi processi di purificazione.

Particolare attenzione è stata rivolta negli ultimi anni allo sviluppo di sistemi in grado di abbassare i costi di estrazione e purificazione delle molecole ricombinanti prodotte nelle piante, sfruttando una delle caratteristiche di questi sistemi, ossia la capacità di secernere un'ampia varietà di composti nella rizosfera. La secrezione rappresenta una delle funzioni fondamentali di cellule e organi vegetali, ed è particolarmente sviluppata nelle radici (Roshchina and Roshchina, 1993).

Borisjuk e colleghi sono stati i primi a sviluppare nel 1999 un sistema di produzione continua di proteine ricombinanti in essudati radicali, che è stato definito come "rizosecrezione" (Borisjuk *et al.*, 1999).

Con questo sistema gli autori hanno dimostrato la produzione in pianta di tre proteine ricombinanti funzionanti di diversa origine: la *xylanase* di *Clostridium thermocellum*, la GFP (*green fluorescent protein*) di *Aequorea victoria* e la fosfatasi alcalina secreta dalla placenta umana (SEAP). In particolare, la rizosecrezione di tutte e tre le proteine nelle piante di tabacco transgeniche, è avvenuta in presenza di un target per il reticolo endoplasmatico, come il peptide segnale della calreticulina, una delle proteine più rappresentate in questo compartimento cellulare (Borisjuk *et al.*, 1999).

Molti altri lavori condotti successivamente hanno sfruttato questa proprietà delle piante per produrre molecole di interesse farmaceutico, come per la produzione continua di anticorpi monoclonali in tabacco, riportata da Drake e collaboratori

(Drake *et al.*, 2003), ma anche di alti livelli di singole catene di immunoglobuline e immunoglobuline intere, riportata da Komarnytsky e collaboratori (Komarnytsky *et al.*, 2006).

### **1.3.2 Produzione di proteine ricombinanti in *Saccharomyces cerevisiae***

*S. cerevisiae* combina le caratteristiche dell'organismo unicellulare, quindi la facilità di crescita e manipolazione genetica, a quelle dell'organismo eucariotico, che come già descritto nel paragrafo 1.3, riguardano principalmente l'assemblaggio, il folding, nonché i meccanismi di *processing* post-traduzionale delle proteine. Inoltre di questo organismo sono ben noti il genoma, la fisiologia, la biochimica e le tecniche di fermentazione (Porro *et al.*, 2005).

Molte delle proteine ricombinanti di interesse farmaceutico attualmente in commercio sono state prodotte in *Saccharomyces cerevisiae*, riconosciuto dall'US Food and Drug Administration (FDA) come organismo sicuro (GRAS).

L'espressione di una proteina eterologa in lievito consiste nel clonare la sequenza genica che codifica per la proteina di interesse in una cassetta di espressione che contiene oltre ad un promotore specifico per il lievito anche una sequenza di terminazione della trascrizione e, successivamente trasformare le cellule in modo da garantire la stabile integrazione del DNA esogeno nell'ospite.

L'efficienza della trascrizione del gene di interesse in lievito rappresenta uno dei punti chiave della produzione di proteine ricombinanti in questo organismo. Molti sono i promotori sia eterologhi che omologhi, costitutivi o inducibili disponibili per regolare l'espressione dei geni eterologhi in lievito (Porro *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda la trasformazione genetica essa può avvenire utilizzando plasmidi integrativi, circolari autonomi o episomali. Con l'utilizzo dei plasmidi

integrativi, l'integrazione del gene esogeno nel genoma della cellula ospite avverrà mediante eventi di ricombinazione, mentre se utilizzano plasmidi autonomi, la replicazione del DNA esogeno avverrà con la replicazione del plasmide circolare, garantita dalla presenza di specifiche sequenze di replicazione autonoma, note come ARS (Porro *et al.*, 2005). In genere i vettori utilizzati per la trasformazione delle cellule di lievito sono spesso degli ibridi tra sequenze di origine batterica e sequenze provenienti da lievito. La porzione batterica di questi vettori contiene un origine di replicazione batterica (in genere quella di *E. coli*) ed un marcatore di selezione (gene che conferisce resistenza ad antibiotici).

Le metodiche utilizzate per la trasformazione sono: l'elettroporazione, la preparazione di sferoplasti ed il metodo del litio acetato; quest'ultima rappresenta la tecnica maggiormente utilizzata (Burgers and Percival, 1987; Gietz and Woods, 2002; Porro *et al.*, 2005). La selezione delle cellule trasformate può essere condotta sia utilizzando marcatori auxotrofici, costituiti dai geni che codificano per gli aminoacidi (URA3, LEU2, TRP1, HIS3, HIS4, ADE1, tra quelli più utilizzati), sia utilizzando marcatori dominanti, ossia i geni che conferiscono resistenza ad antibiotici (igromicina, zeocina, G418) (Porro *et al.*, 2005).

Molte sono le molecole ricombinanti che negli ultimi anni sono state prodotte in lievito: proteine di impiego in diagnostica (proteina del virus dell'epatite C e antigeni HIV-1), vaccini (antigene di superficie del virus dell'epatite B e la proteina dell'involucro di HIV-1) e agenti terapeutici (fattore di crescita dell'epidermide e dei fibroblasti, proinsulina, insulina, antitripsina  $\alpha_1$ ) (Gerngross, 2004).

## 2 SCOPO DELLA TESI

L'attività di ricerca relativa a questo lavoro di tesi è stata svolta presso la società di ricerca agrobiotecnologica "Metapontum Agrobios" di Metaponto, ed ha previsto l'impiego di tecnologie ricombinanti per indurre l'espressione dei geni HSP70 di *Arabidopsis* in organismi eterologhi.

Grazie alla tecnologia del DNA ricombinante molte sono state le molecole ricombinanti prodotte negli ultimi anni in sistemi eucariotici come piante e lieviti. L'ampio utilizzo di questi sistemi nella produzione di proteine ricombinanti di interesse farmaceutico è legato alla possibilità di produrre proteine biologicamente attive e sicure per la salute umana.

Sulla base di queste caratteristiche si è scelto di utilizzare i due sistemi *Nicotiana tabacum* e *Saccharomyces cerevisiae*, per indurre, rispettivamente, l'espressione costitutiva dei geni HSP70 di *Arabidopsis* e per produrre su media scala il prodotto genico corrispondente.

Per la prima linea di ricerca lo scopo è quello di esprimere i geni HSP70 di *Arabidopsis* in tabacco e indurre il rilascio della proteina negli essudati radicali, legando alla porzione N-terminale il peptide segnale della calreticulina. Questa strategia dovrebbe semplificare il recupero della HSP70 e, quindi anche i successivi processi di purificazione.

Con lo scopo di accelerare e semplificare i processi di purificazione la proteina ricombinante HSP70 è stata marcata con un His-tag e prodotta in *S. cerevisiae* utilizzando un processo su media scala. La presenza dell'His-tag consentirà la purificazione mediante cromatografia per affinità della HSP70, sulla quale potrà essere valutata *in vivo* la capacità immunostimolante.

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 Induzione dello *shock* termico

Per gli esperimenti di *heat shock* sono state utilizzate piante di *Arabidopsis* allevate in camera di crescita alla temperatura di 20 °C. Gli esperimenti sono stati condotti in una stufa da laboratorio a temperature comprese tra i 40 °C ed i 60 °C, secondo le condizioni riportate in Tabella 3.

Sigla	Temperatura	Tempo di induzione	Recovery dopo <i>heat shock</i>
A	20°C	non indotto	0
B	40°C	30 min	0
C	40°C	60 min	0
D	40°C	90 min	0
E	50°C	15 min	0
F	50°C	15 min	30 min
G	50°C	15 min	60 min
H	50°C	60 min	0
I	50°C	60 min	30 min
L	50°C	60 min	60 min
M	60°C	15 min	0
N	60°C	15 min	30 min
O	60°C	15 min	60 min

**Tabella 3** Condizioni di *heat shock*

## **3.2 Estrazione degli acidi nucleici**

### **3.2.1 Estrazione del DNA genomico (Protocollo Peterson modificato)**

300 mg di materiale verde sono stati triturati mediante l'utilizzo di mortai e pestelli in presenza di azoto liquido. Alla polvere ottenuta sono stati aggiunti 1 ml di buffer di estrazione (sorbitolo 0.35 M, Tris-HCl 0.1 M, EDTA bisodico 0.005 M pH 7.5, sodio bisolfito 0.02 M). La soluzione è stata agitata per qualche minuto mediante un vortex, e centrifugata a 13000 rpm per 5 minuti a 4 °C.

Il pellet ottenuto è stato sciolto in 300 µl di buffer di estrazione, 300 µl di buffer di lisi (Tris 0.2 M pH 7.5, EDTA 0,05 M, NaCl 2 M; CTAB 2% w/v) e 120 µl di sarcosyl 5%. La soluzione è stata agitata e incubata a 65°C per 30 minuti.

Terminata l'incubazione a 65 °C sono stati aggiunti 600 µl di cloroformio e dopo aver agitato per circa 1 minuto, la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 5 minuti.

Al surnatante recuperato è stato aggiunto isopropanolo, ed il tutto è stato centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti. Il pellet ottenuto è stato, lavato con etanolo al 70%, centrifugando come sopra, ed infine sciolto in 100 µl di TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8; EDTA 1 mM) aggiunto di RNasi (100 µg/ml).

La qualità del DNA estratto è stata verificata mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio concentrato all'1% in tampone TAE 1X, preparato da uno stock concentrato 50X (242 g/l tris base, 57,1 ml/l acido acetico glaciale, 100ml/l Na<sub>2</sub>EDTA 0,5M pH 8).

### 3.2.2 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata utilizzando i reagenti forniti dal kit Totally RNA procedendo seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice (Ambion).

100 mg di tessuto vegetale sono stati omogenizzati in 10 volumi/mg di soluzione denaturante; l'omogenato aggiunto di una soluzione di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1, pH 6.6) è stato agitato mediante un vortex a temperatura ambiente per un minuto, incubato per 5 minuti in ghiaccio e, quindi, centrifugato a 10000 g per 5 minuti a 4 °C. È stato recuperato il surnatante ed è stata aggiunta una soluzione di acetato di sodio e di fenolo:cloroformio (5:1, pH 4.7).

I campioni dopo essere stati agitati per 1 minuto a temperatura ambiente, sono stati incubati in ghiaccio per 5 minuti.

È stato aggiunto un ugual volume di isopropanolo e, per favorire la precipitazione dell'RNA, i campioni sono stati incubati a -20°C per 30 minuti. L'RNA è stato recuperato mediante centrifugazione a 10000 g per 15 minuti; il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, essiccato e sciolto in H<sub>2</sub>O trattata con DEPC (diethyl-pirocarbonato).

La purezza dell'RNA estratto (assenza di sostanze contaminanti come proteine, polisaccaridi o fenolo) è stata stimata dalla misura del rapporto  $A_{260}/A_{280}$ . Per una buona preparazione di RNA tale rapporto deve avere un valore compreso tra 1,7 e 2.

La qualità dell'RNA estratto è stata poi saggiata mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio.

### 3.3 Sintesi del cDNA

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Prima di procedere con la reazione di sintesi del cDNA, l'RNA è stato sottoposto a reazione con l'enzima DNase I (DNase free; Ambion) per rimuovere ogni eventuale contaminazione da DNA. I campioni di RNA aggiunti di:

DNase I buffer	0.1 vol
rDNase I	1 $\mu$ l

sono stati incubati a 37°C per 30 minuti. La reazione con la DNasi I è stata interrotta lasciando i campioni a temperatura ambiente per 2 minuti in presenza del "DNase Inactivation Reagent" (Ambion). L'RNA è stato, quindi, recuperato mediante centrifugazione a temperatura ambiente a 10000 g per 1 minuto e 30 secondi. Per la sintesi del cDNA ai campioni di RNA trattati con DNase I sono stati aggiunti:

Random primers	1 $\mu$ l
10 mM dNTP mix	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O -DEPC	9 $\mu$ l

Dopo una incubazione di 5 minuti a 65°C e rapido raffreddamento in ghiaccio è stata aggiunta la mix di reazione, preparata nel seguente modo (protocollo per un campione):

5X cDNA Synthesis Buffer	4 $\mu$ l
0.1 M DDT	1 $\mu$ l
RNase OUT (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
ThermoScript RT (15 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O -DEPC	1 $\mu$ l

I campioni sono stati, quindi, incubati a 25°C per 10 minuti e subito dopo a 50°C per 50 minuti. La reazione di sintesi del cDNA è stata completata con un'incubazione a 85°C per 5 minuti, seguita poi dall'incubazione con 1  $\mu$ l di RNase H a 37°C per 20

minuti. L'intera popolazione di cDNA a singolo filamento ottenuta mediante retrotrascrizione è stata convertita in DNA a doppio filamento amplificando mediante amplificazione genica *in vitro* con primers specifici per le sequenze geniche di interesse.

### 3.4 Amplificazione genica *in vitro* mediante *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Le reazioni di amplificazione effettuate in questo lavoro di tesi sono state condotte utilizzando due differenti Taq DNA polimerasi con relativi buffer a seconda del destino del prodotto amplificato. La Taq DNA polimerasi fornita dalla Invitrogen è stata utilizzata quando non erano indispensabili proprietà come alta fedeltà e processività, nonché attività esonucleasica 3'-5', caratteristiche della Taq Phusion DNA polimerasi (Finnzymes).

Di seguito sono riportate le composizioni delle miscele di reazione condotte con le due Taq polimerasi sopra menzionate ed i relativi cicli di amplificazione.

➤ Reazione con Taq Phusion DNA polimerasi (Finnzymes)

DNA	circa 100 ng
5X Phusion Buffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
primer forward (20 pmol/ µl)	1 µl
primer reverse (20 pmol/ µl)	1 µl
Taq Phusion DNA polimerasi (U/µl)	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O	fino a 50 µl

Ciclo di amplificazione

denaturazione	a 98°C per 30 secondi	1 ciclo
denaturazione	a 98°C per 10 secondi	30 cicli
annealing	(T variabile) per 30 secondi	30 cicli
estensione	a 72 °C 1 minuto per ogni kb	30 cicli
estensione finale	a 72°C per 7 minuti	1 ciclo

➤ Reazione con Taq DNA polimerasi (Invitrogen)

DNA	circa 100 ng
10X buffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
primer forward (20 pmol/ µl)	1 µl
primer reverse (20 pmol/ µl)	1 µl
Taq Phusion DNA polimerasi (2U/µl)	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O	fino a 50 µl

Ciclo di amplificazione

denaturazione	a 95°C per 5 minuti	1 ciclo
denaturazione	a 95°C per 30 secondi	30 cicli
annealing	(T variabile) per 45 secondi	30 cicli
estensione	a 72 °C 1 minuto per ogni kb	30 cicli
estensione finale	a 72°C per 7 minuti	1 ciclo

I primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione effettuate in questo lavoro di tesi sono elencati nella Tabella 4 dove sono riportate anche le relative sequenze nucleotidiche.

I prodotti di PCR ottenuti sono analizzati mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio concentrato all'1% in presenza del buffer TAE 1X.

<b>Primers</b>	<b>Sequenza nucleotidica 5'-3'</b>
<b>P1</b> (AtHSP70 5'bis)	TAATGGCGGGTAAAGGTGAA
<b>P2</b> (AtHSP70 3'bis)	GCCAAAAGGCTTAATCAACTTC
<b>P3</b> (AtHSP70_3'int)	CAGAGCTCTTTCCCATTGAAG
<b>P4</b> (AtHSP70 5'int bis)	ACTCGTGCTAGGTTTCGAGGA
<b>P5</b> (Cal_long 5')	TCTAGACAGTGGTCATGGCTAC
<b>P6</b> (HSP70RevHis)	GTAGTAGTGGTAGTGGTGATTCCTAGG
<b>P7</b> (AtHSP_int 5'ter)	CACAAACGACAAGGGAAGGT
<b>P8</b> (AtHSP70ter_int3')	GAACCATCGACGAGATTTCC
<b>P9</b> (M13F)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTG
<b>P10</b> (M13R)	TGAGCGGATAACAATTTACACAG
<b>P11</b> (AtHSP70 5' _06)	ATGGCGGGTAAAGGTGAA
<b>P12</b> (35Sint5'F)	AAACCTCCTCGGATTCCATT
<b>P13</b> (35SF_05)	GCTCCTACAAATGCCATCA
<b>P14</b> (AtHSP70 5'int)	CAAGGATTCCCAAAGTGCAG
<b>P15</b> (NOSR_05)	TTGCGCGCTATATTTTGT
<b>P16</b> (35S 5'F)	CAAGACGATCTACCCGAGCAA
<b>P17</b> (GAL10F)	GGTGGTAATGCCATGTAATATG
<b>P18</b> (HSPF07Y3)	GGATCCAAGATGACGACGATAAGATGGCGGGTAAAGGTGA
<b>P19</b> (HSPBam3')	GGATCCGCCAAAAGGCTTA
<b>P20</b> (HSPY3HisF)	GGATCCAACATCATCACCATCACCACGATGACGACGATAA
<b>P21</b> (TaqMan At_HSP70)	AACTGCTGCTGCTATTGCTTACGGTCTT
<b>P22</b> (At_HSP70F)	GTCTCAACGTGATGCGTATCATC
<b>P23</b> (At_HSP70R)	AGTACCACCTCCCAAATCAAAGAT
<b>P24</b> (TaqMan Le18S)	AACCTTCTCATTTCCTTCACCACT
<b>P25</b> (Le_rRNA18SF)	GAAACGGCTACCACATCCAAG
<b>P26</b> (Le_rRNA18SR)	CCCCGTGTTAGGATTGGGT

**Tabella 4** Elenco dei primers utilizzati in questo lavoro di tesi

### **3.5 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)**

La qRT-PCR è una particolare PCR che permette la misurazione diretta e la quantificazione di un gene target mediante segnali di fluorescenza che sono emessi nel corso della reazione come conseguenza dell'amplificazione del gene di interesse.

La possibilità di seguire le reazioni in tempo reale permette di analizzare le reazioni quando queste sono nella fase esponenziale di amplificazione. La quantità di fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione sarà proporzionale alla quantità di prodotto amplificato. L'emissione di fluorescenza è legata all'utilizzo della sonda ad ibridazione TaqMan complementare alla sequenza del gene target che presenta una molecola fluorescente definita "Reporter" (Fam) all'estremità 5' ed una molecola "Quencher" (Tamra) all'estremità 3', che impedisce al "Reporter" di emettere liberamente segnale. Quando la DNA polimerasi, che sta sintetizzando sul DNA stampo il filamento complementare a partire dal primer di innesco, incontra la sonda anch'essa legata al template, effettua il cosiddetto "strand-displacement", ossia rimuove dalla sonda alcuni nucleotidi. In seguito a questo taglio la molecola "Reporter" passa in soluzione, aumentando l'intensità della fluorescenza che sarà direttamente proporzionale alla concentrazione nella reazione del prodotto sintetizzato.

Le qRT-PCR effettuate in questo lavoro di tesi sono state condotte utilizzando un ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Le miscele di reazione sono state preparate utilizzando il "Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG kit" (Invitrogen). Sono state effettuate tre repliche di amplificazione per ciascun campione di cDNA analizzato e per ridurre al minimo gli errori derivante da differenze nelle condizioni di reazione, è stato aggiunto ad ogni mix di reazione il "ROX Reference Dye". Questo colorante, fornito nel kit è utilizzato come

riferimento passivo interno per normalizzare le fluttuazioni nel segnale di fluorescenza che non sono legate alla PCR, ma sono legate a variazioni di concentrazione o di volume.

La miscela di reazione per un campione è stata allestita nel seguente modo:

cDNA	2 $\mu$ l
qPCR Supermix-UDG	12.5 $\mu$ l
Primer forward (20 $\mu$ M)	0.75 $\mu$ l
Primer reverse (20 $\mu$ M)	0.75 $\mu$ l
TaqMan (20 $\mu$ M)	0.375 $\mu$ l
ROX	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	fino a 25 $\mu$ l

Il cDNA è stato amplificato utilizzando sia i primers specifici per i geni target sia con i primers specifici dell'RNA ribosomale 18S, utilizzato come gene controllo. Per ogni esperimento di qRT-PCR è stata costruita una curva standard di riferimento utilizzando diluizioni scalari di cDNA (1; 1:10; 1:100; 1:1000), sulla base della quale verrà calcolata la quantità iniziale di DNA presente in ogni campione analizzato.

Il programma di amplificazione è stato impostato come segue:

step 1	50°C x 2 min
step 2	95°C x 2 min
step 3 (40 volte)	95°C x 15 sec - 60°C x 45 sec
step 4	4°C $\infty$

Per le reazioni di amplificazione quantitativa del gene HSP70 sono stati utilizzati la sonda P21 (Tabella 4) ed i primers P22 e P23 (Tabella 4), mentre per il gene controllo 18S sono stati utilizzati la sonda P24 ed i primers P25 e P26 (Tabella 4).

### **3.6 Digestione del DNA con endonucleasi di restrizione**

Le reazioni di digestione con endonucleasi di restrizione (NEB) effettuate in questo lavoro di tesi sono state condotte tutte a 37 °C per circa 3 h in un volume finale di 30 µl aggiungendo a circa 10 µg di DNA:

Buffer 10X	3 µl
Enzima (20U/ µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	fino a 30 µl

Nelle reazioni doppie condotte utilizzando due enzimi di restrizione, il buffer aggiunto alla miscela di reazione è stato scelto seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice (NEB).

I frammenti ottenuti dalle digestioni enzimatiche sono stati separati mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio concentrato all'1% in buffer TAE 1X.

### **3.7 Precipitazione del DNA**

La soluzione contenente DNA, aggiunta di 1/10 del volume di sodio acetato 3M e di 2.5 volumi di etanolo assoluto, è stata agitata per inversione e incubata a -20°C per 30 minuti. Successivamente, la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 20 minuti a 4°C ed il pellet ottenuto è stato lavato con 300 µl di etanolo al 70% centrifugando a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il pellet allontanato del surnatante è stato essiccato e risospeso in 20 µl di ddH<sub>2</sub>O.

### 3.8 Sequenziamento automatico

Per la determinazione della sequenza nucleotidica viene eseguita una PCR che utilizza oltre ai comuni dNTP anche i ddNTP marcati con differenti fluorocromi. Questi ddNTP non presentano come i dNTP un 3'-OH sullo zucchero deossiribosio, bensì un 3'-H, quindi se vengono inseriti nella catena in via di allungamento, impediscono la formazione del legame fosfodiesterico bloccando la reazione di sintesi. Il risultato è la formazione di frammenti di PCR di differente lunghezza, ciascuno terminante con un nucleotide marcato con un fluorocromo di diverso colore, che viene rivelato durante l'analisi elettroforetica condotta attraverso un capillare costituito da gel fluido di poliacrilammide ad altissima risoluzione in grado di separare frammenti di DNA che differiscono fra loro per un singolo nucleotide. Durante il passaggio attraverso il capillare i frammenti contenenti questi gruppi marcati sono colpiti da un raggio laser che determina l'eccitazione dei fluorocromi che lo attraversano con l'emissione di fluorescenza.

La sequenza nucleotidica è determinata da un software in grado di interpretare e di elaborare le misure di fluorescenza in uscita, registrate da un rivelatore. Le informazioni vengono integrate e convertite in picchi di diverso colore, con aree proporzionali all'intensità dell'emissione (elettroferogramma).

Le reazioni di amplificazione per le sequenze sono state tutte condotte utilizzando il Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem).

#### Miscela di reazione

DNA	300-400 ng
Primer (2pmol/ µl)	1.6 µl
Buffer 5X	2 µl
Mix	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	fino a 10 µl

### Cicli di amplificazione

denaturazione	a 96°C per 1 minuto	1 ciclo
denaturazione	a 96°C per 10 secondi	30 cicli
<i>annealing</i>	a 50°C per 5 secondi	30 cicli
allungamento	a 60°C per 4 minuti	30 cicli

Per il sequenziamento è stato utilizzato il sequenziatore ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) e le analisi delle sequenze ottenute sono state effettuate utilizzando il programma Chromas Pro version 1.33. La verifica della corrispondenza della sequenze ottenute con le sequenze geniche attese è stata condotta utilizzando il programma ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)).

### **3.9 Purificazione di frammenti genici da gel di agarosio**

La purificazione di bande di DNA da gel di agarosio è stata condotta mediante l'utilizzo del GENE CLEAN II kit, seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice (Q-BIOgene).

Una volta asportata dal gel di agarosio la banda d'interesse è stato aggiunto un volume (ml) pari a tre volte il peso (mg) della banda, di una soluzione di NaI, il tutto è stato agitato mediante l'utilizzo di un vortex per qualche secondo ed incubato a 55°C per qualche minuto fino a quando l'agarosio non è completamente sciolto. Nel frattempo si risospende la GLASSMILK agitando per 1 minuto su vortex e, quindi si aggiunge alla soluzione di DNA/agarosio. La quantità di GLASSMILK aggiunta è stata determinata valutando la scala di equivalenza riportata a pagina 17 del manuale allegato al kit. Dopo aver incubato per 5 minuti a temperatura ambiente, la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 1 minuto ed il pellet ottenuto è stato risospeso in 700 µl di "wash buffer", agitando su vortex per qualche secondo. La sospensione è stata centrifugata per 1 minuto a 13000 rpm ed è stato eliminato il surnatante. Le

operazioni di lavaggio del pellet con “wash buffer” sono state ripetute per altre due volte. Dopo aver effettuato il terzo lavaggio ed eliminato completamente il surnatante, il pellet è stato sciolto in 10 µl di ddH<sub>2</sub>O ed il tutto centrifugato come riportato precedentemente. Il surnatante contenente il DNA è stato recuperato e trasferito in un nuovo tubo eppendorf. Queste ultime operazioni sono state ripetute in modo da avere un volume totale di DNA pari a 20 µl.

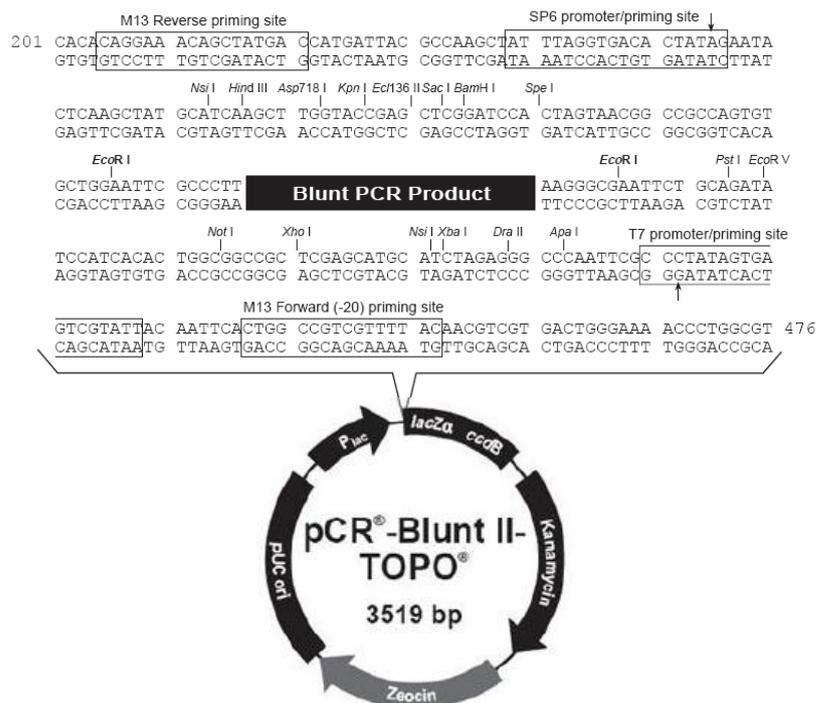
### **3.10 Clonaggio di DNA nel vettore pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)**

Questo sistema di clonaggio si basa sull'attività dell'enzima topoisomerasi I legata covalentemente ad un gruppo fosfato presente all'estremità del vettore pTOPO che lega l'estremità 3' del prodotto genico amplificato all'interno del “TOPO-Cloning site” (Figura 6).

La reazione di ligazione è stata preparata aggiungendo al DNA (4 µl) da clonare nel vettore pTOPO i seguenti componenti forniti dal kit:

Salt solution	1 µl
Vettore	1 µl

Dopo un'incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti la miscela di reazione è pronta per essere utilizzata nella trasformazione di cellule TOP10 di *E. coli* chimicamente competenti (Invitrogen). Poiché questo vettore contiene come marker di selezione un gene che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina i batteri trasformati saranno selezionati su terreno selettivo contenente questo antibiotico.



**Figura 6** Mappa del vettore pCR-Blunt II- TOPO (Invitrogen). In alto è riportata la sequenza nucleotidica del vettore compresa tra i nucleotidi 201 e 476. La regione compresa tra i nucleotidi 269 e 399 costituisce il “Multiple cloning Site” (o polilinker) del vettore pTOPO, mentre il “TOPO-Cloning site” è compreso tra i nucleotidi in posizione 336 e 337.

### 3.11 Trasformazione di cellule TOP10 di *E. coli* e selezione dei trasformanti

Dopo 30 minuti di incubazione in ghiaccio le cellule TOP10 competenti, aggiunte della miscela di reazione di ligazione, sono state sottoposte a *shock* termico incubando per 45 secondi a 42°C, quindi, riposte in ghiaccio per pochi minuti e aggiunte di 300 µl di terreno SOC (2 % w/v triptone, 0,5 % w/v estratto di lievito, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucosio). La coltura è stata incubata a 37°C per 1h, piastrata su terreno LB (Bacto-tryptone 10 g/l, Bacto-yeast extract 5 g/l, NaCl 10g/l, Bacto-agar 15 g/l) aggiunto dell’antibiotico selettivo (kanamicina 50 mg/l o ampicillina 100 mg/l) per la selezione dei trasformanti ed incubata tutta la notte a 37°C.

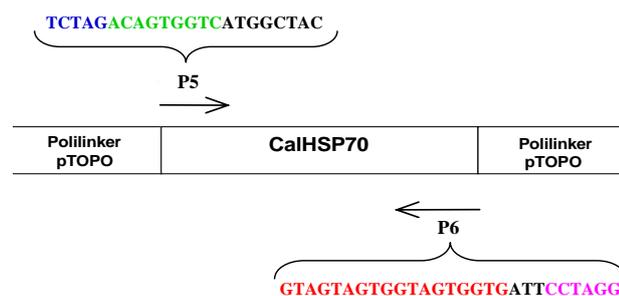
### **3.12 Estrazione di DNA plasmidico da cellule di *E. coli* (Mini Prep)**

La coltura batterica, ottenuta inoculando una singola colonia di *E. coli* in 5 ml di LB contenente l'antibiotico selettivo, dopo la crescita O/N a 37 °C è stata centrifugata per 5 minuti a 13000 rpm a temperatura ambiente. Il pellet ottenuto è stato sciolto in 200 µl di soluzione 1 (Glucosio 50mM, Tris 25mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8, 0,4 % lisozima) e, successivamente, incubato a temperatura ambiente per 5 minuti. La sospensione è stata aggiunta di 300 µl di soluzione 2 (NaOH 0,2 N; SDS 1 %) agitata per inversione per qualche secondo e incubata in ghiaccio per 5 minuti. Trascorso tale periodo sono stati aggiunti 300 µl di soluzione 3 (Potassio Acetato 3 M pH 4.8), la miscela è stata agitata e incubata per altri 5 minuti in ghiaccio. Completata l'incubazione in ghiaccio la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Al surnatante recuperato è stata aggiunta l'RNasi, ad una concentrazione finale di 20 µg/ml, ed è stato incubato a 37°C per 1 h. Trascorso tale periodo la soluzione è stata aggiunta di 400 µl di cloroformio, agitata mediante l'utilizzo di un vortex per 1 minuto e centrifugata a 13000 rpm per 5 minuti. Tale operazione è stata condotta per due volte. Alla fase acquosa recuperata è stato aggiunto isopropanolo e la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C per favorire la precipitazione del DNA plasmidico. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70% centrifugando a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C. Dopo il lavaggio con etanolo al 70%, il pellet è stato sciolto in 30 µl di ddH<sub>2</sub>O e aggiunto, successivamente, di 30 µl della soluzione 4 (PEG 8000 al 13%, NaCl 1,6 M). La soluzione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti e, quindi centrifugata a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, procedendo come già descritto, e infine sciolto in ddH<sub>2</sub>O.

### 3.13 Costruzione del vettore pTOPOCalHSP70\_3'His

Il costrutto genico CalHSP70\_3'His da inserire nel vettore pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen), è stato ottenuto amplificando il DNA plasmidico pTOPOCalHSP70 (ottenuto nel corso di attività sperimentali condotte in parallelo all'attività di ricerca relativa a questa tesi di dottorato) mediante PCR con la Taq Phusion DNA polimerasi (Finnzymes). In questa reazione di amplificazione sono stati utilizzati come *forward* il primer P5 e come *reverse* il primer P6 (Tabella 4; Figura 7).

I primers utilizzati sono stati disegnati in modo tale da inserire a monte dell'ATG del gene CalHSP70 la sequenza di riconoscimento dell'enzima XbaI ed al 3' del gene, a monte del codone di stop, una sequenza nucleotidica che codifica per un tag di 6 residui di istidine (His-tag) seguita dal sito di riconoscimento dell'enzima BamHI (Figura 7). La presenza delle sequenze di riconoscimento delle endonucleasi di restrizione sopra riportate è indispensabile per il successivo clonaggio del costrutto nel vettore di espressione per pianta.



**Figura 7** Strategia di sintesi del costrutto genico CalHSP70\_3'His. La PCR è stata condotta utilizzando i primer P5 e P6 (Tabella 4). In figura sono riportate le sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati. Primer P5: la sequenza evidenziata in blu corrisponde alla sequenza di riconoscimento dell'enzima XbaI, i nucleotidi in verde sono stati inseriti per mettere in frame il gene, mentre in nero è indicata la porzione 5' del gene CalHSP70. Primer P6: i primi 18 nt evidenziati in rosso codificano per un tag di 6 residui di istidina (His-tag), i 3 nt in nero sono complementari al codone di stop del gene CalHSP70 e i 6 nt in rosa sono corrispondenti alla sequenza di riconoscimento dell'enzima BamHI.

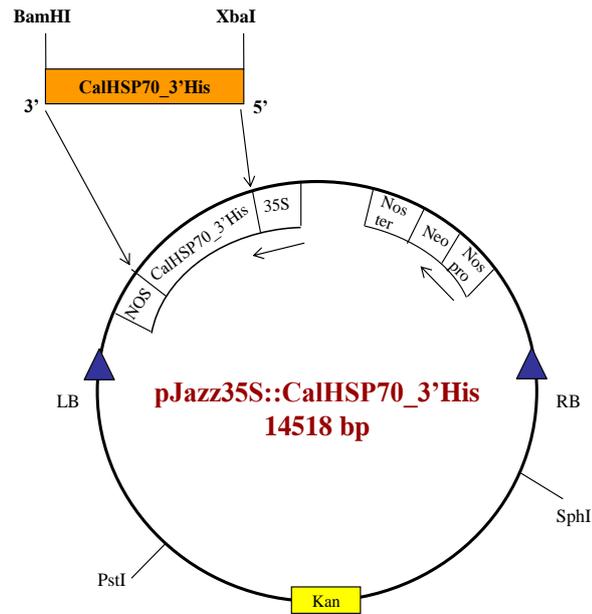
Il prodotto di amplificazione ottenuto è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio concentrato all'1% e la banda attesa, corrispondente al gene CalHSP70\_3'His, è stata asportata e purificata dal gel mediante GENECLAN (Q-BIOgene).

Il costrutto genico ottenuto CalHSP70\_3'His è stato successivamente clonato in pCR-BluntII-TOPO ed il vettore generato è stato identificato con la sigla pTOPOCalHSP70\_3'His.

### **3.14 Costruzione del vettore pJazz35S::CalHSP70\_3'His**

Il vettore di espressione binario per pianta pJazz è un derivato del vettore pBin19 ed è stato progettato per permettere l'espressione costitutiva del gene CalHSP70\_3'His.

Il vettore contiene il promotore costitutivo CaMV35S (35S; presente nel genoma del virus del mosaico del cavolfiore), il terminatore NOS (sequenza di terminazione della trascrizione del gene *Nopaline synthase*, derivante da *A. tumefaciens*) e la cassetta Nos-Neo-Nos per l'espressione del gene neomicina fosfotransferasi, che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina, importante per la selezione dei trasformanti (Figura 8).



**Figura 8** Schema di clonaggio del costrutto genico CalHSP70\_3'His nel vettore binario pJazz per l'espressione in pianta.

La procedura di clonaggio del costrutto CalHSP70\_3'His nel vettore di espressione pJazz ha previsto:

- la preparazione dell'inserto e del vettore;
- l'inserzione stabile dell'inserto nel vettore mediante reazione di ligazione con T4 DNA ligasi;
- la trasformazione di cellule batteriche competenti con selezione dei trasformanti su terreno selettivo.

### 3.14.1 Preparazione dell'inserto e del vettore

L'inserto CalHSP70\_3'His da inserire nel vettore pJazz è stato ottenuto digerendo il vettore pTOPOCalHSP70\_3'His con la coppia di enzimi di restrizione XbaI e BamHI in modo da excidere la sequenza genica di interesse. La stessa coppia di enzimi di restrizione è stata utilizzata per la digestione del vettore pJazz.

I frammenti digeriti XbaI/BamHI sono stati purificati da gel di agarosio mediante GENECLAN.

### 3.14.2 Reazione di ligazione e trasformazione batterica

La reazione di ligazione è stata effettuata utilizzando l'enzima DNA ligasi proveniente dal batteriofago T4 (T4 DNA ligase; Roche). La quantità di inserto e di vettore utilizzate nella reazione di ligazione era tale da avere un rapporto molare pari a 3:1. Di seguito è riportata la composizione della miscela di reazione:

pJazz XbaI/BamHI	50 ng
inserto XbaI/BamHI	150 ng
buffer 10X	4 µl
T4 DNA ligasi	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	fino a 20 µl

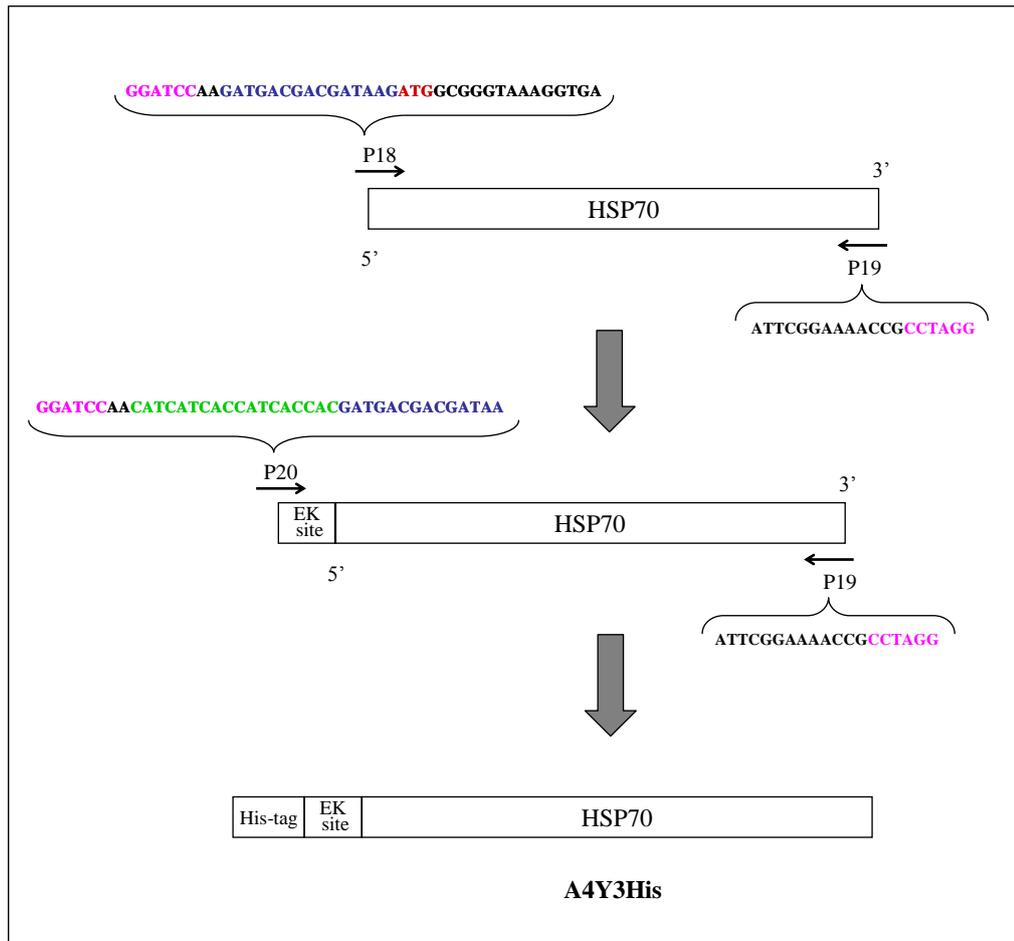
La miscela di reazione è stata mantenuta a 4°C O/N e, successivamente, 2 µl della stessa sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti TOP10 mediante *heat shock*. I trasformanti ottenuti sono stati selezionati su LB contenente kanamicina (50 mg/l).

### **3.15 Sintesi del costrutto A4Y3His e costruzione del vettore pTOPOA4Y3His**

Il costrutto genico A4Y3His è stato sintetizzato amplificando con la taq DNA polimerasi Phusion (Finnzymes) il gene HSP70 isolato in *Arabidopsis* e clonato nel vettore pCR-Blunt II-TOPO (pTOPOA4) con la coppia di primers P18 e P19 (Tabella 4). I due primers P18 e P19 sono stati disegnati in modo da poter inserire al 5' ed al 3' del gene HSP70 la sequenza di riconoscimento dell'endonucleasi di restrizione BamHI. Inoltre l'oligonucleotide P18 è stato disegnato in modo da inserire al 5' del gene di interesse, a valle del sito di riconoscimento BamHI, una sequenza di 18 nucleotidi che codifica per una proteasi, ossia l'enterochinasi (Figura 9).

Il prodotto genico di interesse, purificato mediante GENE CLEAN è stato successivamente clonato in pCR-Blunt II-TOPO, ed il vettore risultante, identificato come pTOPOA4Y3, è stato utilizzato per trasformare mediante *heat shock* cellule competenti TOP10.

Il DNA plasmidico estratto dai cloni positivi pTOPOA4Y3 è stato utilizzato da stampo per una seconda amplificazione con Taq DNA polimerasi Phusion (Finnzymes) condotta utilizzando i primers P20 e P19 (Tabella 4). La scelta del primer P20 è stata dettata dalla necessità di sintetizzare un frammento genico che al 5' sia fuso alla sequenza specifica per l'His-tag (Figura 9).



**Figura 9** Schema di sintesi del costrutto genico A4Y3His. In figura sono riportati i primers, P18, P19 e P20 (Tabella 4) utilizzati nella sintesi mediante PCR del costrutto e le relative sequenze nucleotidiche. P18: in rosa è evidenziata la sequenza di riconoscimento dell'endonucleasi di restrizione BamHI, in blu la sequenza di riconoscimento dell'enterochinasi ed in rosso il codone di inizio della trascrizione del gene HSP70. P19: in nero è riportata la sequenza dell'oligonucleotide complementare alla porzione 3' del gene HSP70 seguita dal sito di riconoscimento dell'enzima BamHI. P20: in verde è evidenziata la sequenza nucleotidica che codifica per l'His-tag, seguita dalla sequenza di riconoscimento dell'enterochinasi (in blu).

Il prodotto amplificato è stato purificato da gel mediante GENECLEAN e clonato in pCR-BluntII TOPO (pTOPOA4Y3HisF) per poter essere trasferito successivamente in cellule TOP10 competenti.

### 3.16 Costruzione del vettore pESC-TrpA4Y3His

Il vettore commerciale pESC-Trp (Stratagene) disegnato per l'espressione e l'analisi funzionale di geni eucariotici nel lievito *S. cerevisiae*, contiene due sequenze di promotori inducibili da galattosio, in opposto orientamento, GAL1 e GAL10, il gene marker Trp che codifica per l'aminoacido triptofano, il gene per la resistenza all'ampicillina, due regioni di clonaggio multiple (MCS1 e MCS2), una sequenza per l'epitopo FLAG contenuta nel MCS1 a valle del promotore GAL10 ed una sequenza per l'epitopo c-myc nel MCS2 a valle del promotore GAL1 (Figura 10).

#### 3.16.1 Preparazione del vettore e dell'inserto

Per poter effettuare il clonaggio, il vettore pESC-Trp è stato digerito con l'enzima di restrizione BglII e, successivamente precipitato con sodio acetato 3 M ed etanolo assoluto. Prima di essere utilizzato per il clonaggio il vettore pESC-Trp digerito con BglII e precipitato è stato trattato con l'enzima fosfatasi alcalina o CIP (Calf Intestinal Phosphatase alcaline; NEB).

Il trattamento del vettore con il CIP consente la rimozione dei gruppi fosfato al 5'sul DNA inibendo la chiusura del vettore in presenza dell'enzima T4 DNA ligasi.

La miscela di reazione è stata preparata aggiungendo a circa 1µg del vettore pESC-Trp digerito con BglII:

Buffer 10X	3 µl
CIP (10U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	fino a 30 µl

La reazione è stata effettuata a 37°C per 1h.

Contemporaneamente alla preparazione del vettore si è proceduto alla preparazione del frammento A4Y3His da clonare nel MCS1 del vettore pESC-Trp digerito con BglII e defosforilato.

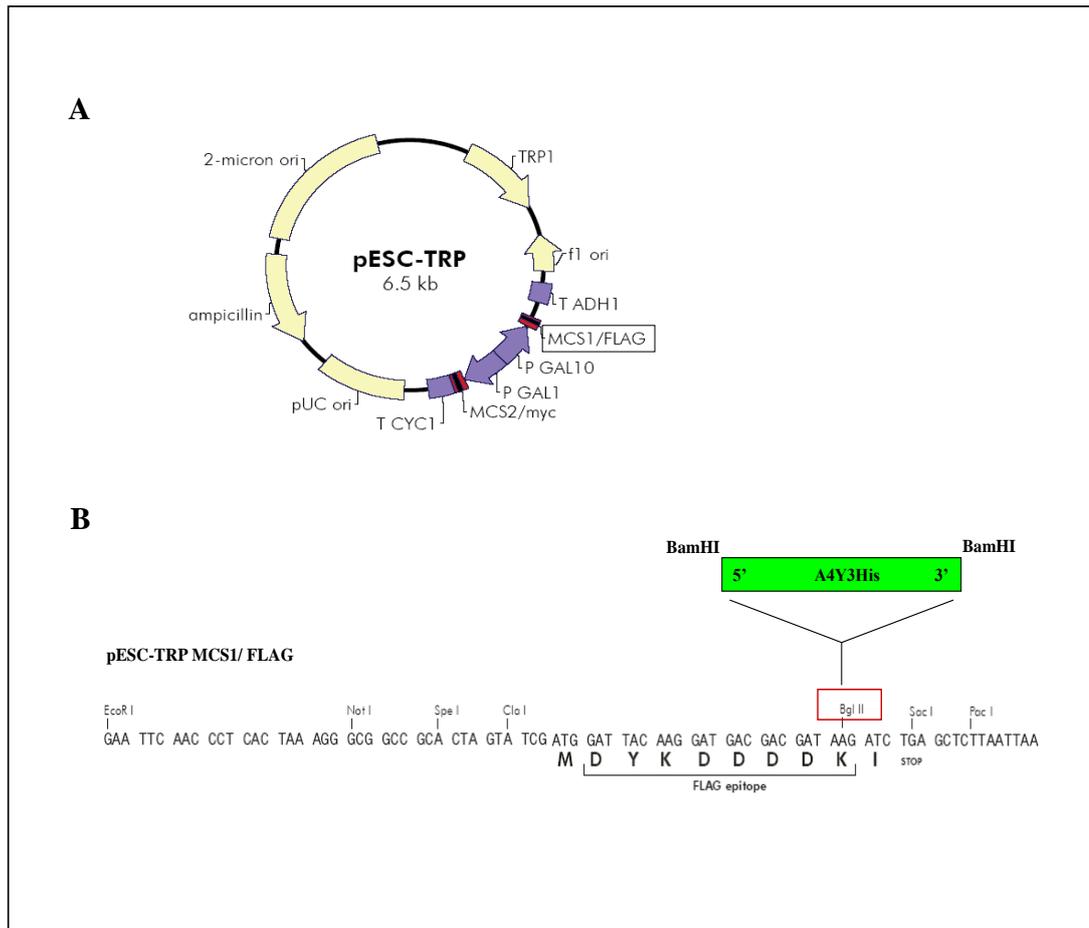
Il DNA plasmidico pTOPOA4Y3His è stato digerito con l'enzima BamHI. La banda attesa dalla digestione è stata purificata dal gel mediante GENECLAN ed il risultato dell'eluizione è stato verificato mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio all'1%.

### 3.16.2 Reazione di ligazione e trasformazione batterica

La reazione di ligazione tra il vettore pESC-Trp e l'inserto A4Y3His è stata effettuata utilizzando il Fast Link DNA ligase kit (Epicentre Biotechnologies). La miscela di reazione composta da:

pESC-Trp BglII	50 ng
A4Y3His BamHI	150 ng
Buffer 10X	1.5 µl
ATP 10X	1.5 µl
DNA ligasi (2U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	fino a 15 µl

è stata incubata 5 minuti a temperatura ambiente ed, infine, denaturata a 70 °C per 15 minuti. Dopo la denaturazione 2 µl della miscela di reazione sono stati utilizzati per trasformare mediante *heat shock* cellule competenti TOP10. Dopo la trasformazione la coltura batterica è stata piastrata su LB con ampicillina (100 mg/l) per la selezione dei trasformanti.



**Figura 10** (A) Mappa del vettore pESC-Trp. (B) Schema di clonaggio del frammento genico A4Y3His, digerito con l'enzima BamHI, nel Multiple Cloning Site 1 (MCS1) del vettore pESC-Trp per l'espressione in lievito.

### 3.17 Trasformazione di cellule competenti di *S. cerevisiae* (YPH500)

#### 3.17.1 Preparazione delle cellule YPH500 competenti

Una singola colonia YPH500 è stata inoculata in 1 ml di terreno YPAD (composizione riportata a fine paragrafo) ed incubata a 30 °C O/N.

La coltura è stata quindi diluita con altro YPAD fino ad ottenere un valore di OD<sub>600</sub> pari a 0,25 ed incubata per circa 4-5 h a 30°C in agitazione in modo da portare il valore di OD<sub>600</sub> a 1. Raggiunto questo valore, la coltura è stata centrifugata a 1000 g per 5 minuti. Il pellet ottenuto è stato sciolto in 10 ml di LTE buffer (LiOAc 0.1 M; Tris-HCl 10mM pH 7.5; EDTA 1mM); la sospensione cellulare è stata centrifugata come sopra, ed il pellet è stato infine sciolto in 500 µl di LTE buffer. Tale sospensione di cellule è stata suddivisa in aliquote da 50 µl ciascuna e conservata a 4°C (la sospensione è stabile per qualche giorno).

#### Terreno YPAD

0.0075% sale di L-adenina emisolfato (Sigma)

1% Bacto Yeast Extract (Difco)

2% Bacto Peptone (Difco)

2% Destrosio

2% Difco Agar Granulated (YPAD solido)

autoclavare 15 minuti a 121°C

### **3.17.2 Trasformazione mediante *heat shock* e selezione dei trasformanti**

Due delle preparazioni di cellule competenti YPH500, preparate come descritto nel precedente paragrafo, sono state utilizzate per la trasformazione con i plasmidi pESC-TrpA4Y3His e pESC-Trp. Alle cellule competenti sono stati aggiunti 2 µl (circa 3 µg) di plasmide e 300 µl di Transformation Mix (40% PEG3350 ; LiOAc 0.1M ; Tris-HCl 10mM pH 7.5; EDTA 1mM). Dopo aver agitato per inversione per qualche secondo, la sospensione è stata incubata a 30°C in agitazione per 30 minuti e, successivamente, a 42°C per 15 minuti. Dopo lo *shock* termico 100 e 200 µl della

sospensione di cellule sono state piastrate su piastre di SD per la selezione dei trasformanti e incubate a 30°C per qualche giorno.

#### Synthetic Dextrose Minimal Medium (SD)

6.7 g/l Yeast Nitrogen Base without amino Acid (Difco)

20 g/l Destrosio

1.3 g/l Amino Acid Dropout Powder (privo di L-triptofano; Tabella 5)

20 g/l Bacto Agar (SD solido)

autoclavare 15 minuti a 121°C

Aminoacido	Quantità in dropout powder (g)	Concentrazione finale (mg/l)
Adenina solfato	2,5	40
L-arginina (HCl)	1,2	20
L-acido aspartico	6	100
L-acido glutammico	6	100
L-istidina	1,2	20
L-leucina	3,6	60
L-lisina	1,8	30
L-metionina	1,2	20
L-fenilalanina	3	50
L-serina	22,5	375
L-treonina	12	200
L-triptofano	2,4	40
L-tirosina	1,8	30
L-valina	9	150
Uracile	1,2	20

**Tabella 5** Composizione dell'Amino Acid Dropout Powder utilizzato nella preparazione dei terreni di crescita SD e SG.

### 3.18 Crescita dei trasformanti di *S. cerevisiae*

Le colonie di lievito ottenute dalla trasformazione con il plasmide pESC-TrpA4Y3His e pESC-Trp sono state inoculate in 5 ml di SD e fatte crescere O/N a 30°C. Il giorno successivo 500 µl della coltura con valore di OD<sub>600</sub> compreso tra 1 e 1.5, sono stati inoculati in terreno SG e incubati per 2 giorni a 30°C in agitazione per l'induzione della sintesi proteica operata dal galattosio.

Synthetic galactose Minimal Medium (SG)

6.7 g/l Yeast Nitrogen Base without amino Acid (Difco)

20 g/l Galattosio

1.3 g/l Amino acid dropout powder (privo di L-triptofano; Tabella 5)

20 g/l Bacto Agar (SG solido)

autoclavare 15 minuti a 121°C

### 3.19 Crescita dei trasformanti di *S. cerevisiae* su media scala

Il clone di lievito scelto per la produzione di proteine su media scala, è stato inoculato in 5 ml di SD ed incubato O/N a 30 °C. Quando il valore di OD<sub>600</sub> della coltura ha raggiunto valore 1, il pre-inoculo è stato aggiunto a 50 ml di SD ed incubato a 30 °C O/N. Dopo circa 16 h di incubazione i 50 ml di coltura O/N (OD<sub>600</sub>=1) sono stati aggiunti a 3,5 litri di SG contenuti nel fermentatore LiFlus GX (BIOTRON). Le condizioni di crescita sono stati impostati come segue:

temperatura= 30°C

pH= 4

ossigeno disciolto (DO)= 150mg/l

agitazione= 300 rpm

La crescita in fermentatore è durata circa due giorni in modo da portare la coltura di lievito ad un valore di OD<sub>600</sub> compreso tra 1 e 1.5.

### **3.20 Trasformazione genetica di *A. tumefaciens* (LBA4404)**

La preparazione delle cellule di *A. tumefaciens* (ceppo LBA4404) e la trasformazione delle stesse è stata condotta seguendo il protocollo riportato di seguito (Mozo e HooyKaas, 1991; Mersereau *et al.*, 1990).

#### Crescita

L'Agrobatterio è stato inoculato e fatto crescere in 100 ml di terreno di crescita AB (100ml/l Sali AB, 25ml/l glucosio 20%, 1,2 ml/l MgSO<sub>4</sub> 1M, 2 ml/l CaCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 ml/l FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 2,5 mg/l) con streptomicina (500 mg/l) e rifampicina (150 mg/l). La crescita è stata interrotta quando il valore di OD<sub>600</sub> della coltura batterica era compreso tra 0,4 e 0,6. La coltura batterica è stata, quindi, centrifugata a freddo ed il pellet lavato 2 volte con HEPES 1 mM e glicerolo al 10 % e, successivamente, con solo glicerolo 10 %. Il pellet di batteri è stato, quindi, sciolto in 500 µl di glicerolo 10% (densità cellulare pari a 1,6x10<sup>11</sup> batteri/ml), suddiviso in aliquote da 45 µl e conservato a -80°C.

#### Trasformazione

200 ng del plasmide pJazz35S::CalHSP70\_3'His sono stati aggiunti a 45 µl di cellule competenti di Agrobatterio; la sospensione è stata trasferita in cuvette da 0,2 cm pre-raffreddate in ghiaccio e sottoposta ad elettroporazione nelle seguenti condizioni:

Resistenza = 400 Ohm  
Voloaggio = 2,5 KV  
Capacitanza = 25  $\mu$ F

Le cellule aggiunte immediatamente di 1ml di mezzo di crescita SOC (Invitrogen) sono state incubate per circa 2 h a 28°C, quindi, piastrate su terreno solido con selettivo e incubate alla stessa temperatura per qualche giorno.

### **3.21 Estrazione di DNA plasmidico da cellule di Agrobatterio**

La coltura batterica ottenuta inoculando una singola colonia di Agrobatterio in 5 ml di AB e cresciuta per 2 giorni a 28°C è stata centrifugata per qualche minuto a temperature ambiente; il pellet ottenuto è stato sciolto in 100  $\mu$ l di soluzione I fredda (lisozima 4 mg/ml; glucosio 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8) e incubato 10 minuti a temperatura ambiente. Alla sospensione sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di soluzione II (SDS 1 %; NaOH 0,2 N) e il tutto è stato lasciato per altri 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 30  $\mu$ l di fenolo equilibrato con 2 volumi di soluzione II e 150  $\mu$ l di sodio acetato 3 M pH 4,8 ed il tutto è stato incubato a -20°C per 15 minuti. La soluzione è stata centrifugata per pochi minuti, ed al surnatante recuperato è stato aggiunto etanolo assoluto. Per favorire la precipitazione del DNA, la soluzione è stata lasciata a -80°C per 15 minuti, e successivamente, centrifugata per 3 minuti. Il pellet ottenuto è stato sciolto in 500  $\mu$ l di sodio acetato 0,3 M pH 7 e incubato a -80°C per 15 minuti. Il DNA è stato, infine, recuperato con una centrifugazione a freddo a 13000 rpm per 3 minuti, lavato con etanolo al 70%, essiccato e sciolto in TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8; EDTA 1 mM) contenente RNasi (20  $\mu$ g/ml).

## **3.22 Estrazione di proteine totali**

### **3.22.1 Estrazione di proteine da *S. cerevisiae* mediante l'utilizzo di una French Press**

La coltura di lievito fatta crescere in fermentatore è stata suddivisa in tubi da 250 ml e centrifugata a 10000 rpm per 10 minuti a 4 °C. Il pellet ottenuto è stato sciolto in 37 ml totali di “lysis buffer” (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) aggiunto prima dell'uso di una pastiglia di inibitori di proteasi (Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche).

La rottura delle cellule di lievito è stata condotta presso il CNR-ISPA di Lecce mediante l'utilizzo della French Press Cell Disrupter (Thermo Electron Corporation).

La sospensione cellulare è stata trasferita nella cella porta campioni Cell 40 K chiusa con un pistone da 1 pollice e inserita nella French Press. La rottura delle cellule di lievito è stata condotta settando il valore di pressione a 20000 psi (Pound per Square Inches). Sono stati condotti complessivamente 5 passaggi, controllando alla fine di ogni passaggio la rottura delle cellule al microscopio ottico. Il lisato cellulare ottenuto è stato quindi ultracentrifugato (KONTRON Centrikon T-2080) a 28000 rpm per 1 h in modo da eliminare i detriti cellulari e le cellule di lievito intere. È stato, quindi, recuperato il surnatante contenente le proteine ed è stato congelato a -80°C.

### **3.22.2 Estrazione di proteine da *S. cerevisiae* mediante l'utilizzo di “glass-beads”**

Le colture di cellule di lievito cresciute nei terreni SD e SG sono state centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti a 4 °C. Il *pellet* ottenuto è stato sciolto in 1 ml di “lysis

buffer” (sorbitolo 0.8 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM) aggiunto al momento dell’uso di PMSF 1 mM e di una pastiglia di inibitori di proteasi (Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche).

Per favorire la rottura delle cellule di lievito e, quindi, il rilascio delle proteine citosoliche comprese le HSP70, alla soluzione sono state aggiunte le “glass beads” ed il tutto è stato agitato mediante un vortex per 40 secondi. Dopo l’agitazione, i campioni sono stati incubati in ghiaccio per 40 secondi e agitati di nuovo come sopra (6 ripetizioni).

Il lisato è stato trasferito in un nuovo tubo e le “glass beads” sono state lavate aggiungendo 500 µl di “lysis buffer”. Le cellule di lievito intere ed i detriti cellulari sono stati rimossi dalla sospensione centrifugando a 4000 rpm per 5 minuti a 4 °C.

Il surnatante recuperato da questa ultima centrifugazione aggiunto al surnatante prelevato, dopo la precedente centrifugazione, è stato suddiviso in aliquote e congelato a -80 °C.

### **3.22.3 Estrazione di proteine da tessuto vegetale**

200 mg di tessuto sono stati triturati in presenza di azoto liquido mediante l’utilizzo di un mortaio e di un pestello.

Il tessuto è stato omogenizzato con 2 volumi di acqua deionizzata (ddH<sub>2</sub>O) sterile, agitato mediante un vortex per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugato a 10000 g per 20 minuti a 4°C. Il surnatante è stato prelevato e centrifugato a 10000 g per 15 minuti a 4°C. Dopo questa seconda centrifugazione è stato recuperato il surnatante contenente le proteine.

La concentrazione delle proteine totali è stata determinata mediante l’utilizzo del kit DC Protein Assay (Bio-Rad) procedendo seguendo il protocollo (metodo Lowry)

suggerito dalla casa produttrice (Bio-Rad). La concentrazione di ciascun campione proteico espressa in mg/ml è stata calcolata mediante regressione lineare tra quantità crescenti di uno standard proteico (BSA) e valori di densità ottica (OD) rilevati a 695 nm utilizzando il software Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad).

### **3.23 Purificazione della proteina ricombinante HSP70 mediante cromatografia di affinità**

La cromatografia di affinità sfrutta le interazioni altamente specifiche delle molecole biologiche; questa tecnica prevede, infatti, che la molecola da purificare si leghi ad uno specifico ligando immobilizzato su di una matrice insolubile.

La cromatografia utilizzata nella purificazione di proteine legate ad un His-tag viene comunemente denominata cromatografia di affinità su metallo chelato, poiché impiega una resina a cui, grazie alla presenza di gruppi funzionali chelanti, possono essere legati ioni bivalenti di metalli di transizione. Tra questi quello maggiormente utilizzato è il nichel ( $\text{Ni}^{2+}$ ).

La sequenza dell'His-tag possiede elevata affinità per il  $\text{Ni}^{2+}$  grazie alla capacità dell'anello imidazolico della catena laterale dell'istidina di stabilire legami di coordinazione con lo ione metallico.

Nel caso specifico, la purificazione della proteina ricombinante *His-tag* HSP70 prodotta in lievito è stata effettuata utilizzando la colonna cromatografica HisPrep FF16/10 (Ge-Healthcare) contenente Ni-Sepharose 6 Fast flow.

La colonna cromatografica è stata collegata al sistema FPLC AKTA (Amersham-Biosciences).

Il campione di proteine totali estratto dalle cellule di lievito (10 ml) è stato equilibrato con il “binding buffer” (NaPO<sub>4</sub> 20 mM pH 7.4, NaCl 500mM, Imidazolo 40 mM) e caricato sulla colonna cromatografica.

Dopo alcuni lavaggi della colonna con il “binding buffer”, in modo da rimuovere le proteine contaminanti non contenenti l’His-tag, la proteina di fusione *His-tag* HSP70, è stata eluita dalla colonna mediante l’aggiunta del “binding buffer” a concentrazione crescente di imidazolo (40 mM-400 mM).

L’imidazolo compete con l’His-tag per la chelazione del metallo, determinando il rilascio della proteina di fusione, che viene recuperata sotto forma di soluto della fase mobile utilizzata per l’eluizione. Le diverse frazioni eluite dalla colonna, ciascuna da 4 ml, sono state recuperate in tubi e conservate a -20°C.

### **3.24 Analisi Western Blot**

#### **3.24.1 Separazione elettroforetica delle proteine (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).**

Le proteine aggiunte del 6X SDS gel “loading buffer” (Tris-HCl 120 mM pH 8.6, 6% SDS, 2% β-mercaptoetanolo, 50% glicerolo, 0.2% blu di bromofenolo) sono state denaturate a 100°C per 5 minuti e separate mediante SDS-PAGE.

Il gel di poliacrilammide per la separazione delle proteine, o “resolving gel”, è stato preparato ad una concentrazione del 12 % per un volume finale di 15 ml:

ddH <sub>2</sub> O	4.9 ml
PAA (30%)*	6.0 ml
Tris 1.5M pH 8.8	3.8 ml
SDS 10%	0.15 ml
APS 10%	0.15 ml
TEMED	0.006 ml

Avvenuta la polimerizzazione del “resolving gel”, è stata preparata e versata la soluzione (8 ml) dello stacking gel al 5 %:

ddH <sub>2</sub> O	5.5 ml
PAA (30%)*	1.3 ml
Tris 1M pH 6.8	1.0 ml
SDS 10%	0.08 ml
APS 10%	0.08 ml
TEMED	.008 ml

Gli agenti polimerizzanti TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiammina) e APS (ammonio persolfato) sono stati aggiunti prima di versare la soluzione tra le due lastre di vetro.

\*La soluzione stock di Acrilammide/Bisacrilammide 30 % (PAA) è stata preparata sciogliendo:

Acrilammide	30 g
N',N'-Metilenbisacrilammide	1 g

in ddH<sub>2</sub>O fino ad un volume di 100 ml. Tale soluzione è stata successivamente filtrata e conservata, a riparo dalla luce, a 4°C.

La separazione elettroforetica delle proteine totali è stata condotta a 100 Volt per 2 h utilizzando il sistema elettroforetico “Mini Protean 3 cell” (Bio-Rad), in presenza del buffer Tris-Glicina 1X (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%).

Per ogni elettroforesi condotta in questo lavoro di tesi, le stesse quantità di proteine sono state caricate contemporaneamente su due gel. Uno è stato sottoposto a colorazione O/N con Coomassie Brilliant Blue R250 e, quindi, decolorato in una soluzione contenente metanolo (30%) e acido acetico (10%) per valutare la qualità dell'estrazione e della separazione elettroforetica delle proteine, l'altro è stato utilizzato per il trasferimento delle proteine su membrana PVDF (Polivinilidenefluoruro; BioRad). L'acquisizione dei gel colorati con Coomassie Brilliant Blue R250 è stata effettuata mediante l'utilizzo del software QuantityOne (Bio-Rad).

### **3.24.2 Trasferimento delle proteine su membrana PVDF**

Il trasferimento delle proteine dal gel di acrilammide alla membrana PVDF è stato effettuato mediante l'utilizzo del “Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad). Il trasferimento è avvenuto a 25 Volt per 2 h in presenza del buffer di trasferimento (Tris base 25 mM, Glicina 150 mM, Etanolo 20 %).

### **3.24.3 Immunoblotting delle proteine con anticorpi**

Dopo il trasferimento la membrana è stata lavata due volte per 5 minuti in TBS 1X (Tris 20 mM, NaCl 500 mM), quindi, lasciata O/N a 4°C in agitazione nel “blocking buffer” preparato aggiungendo in TBS 1X il 3% di NFDM (Non-Fat Dry Milk; Bio-Rad), per consentire la saturazione sulla membrana dei siti di legame non specifici.

Il giorno successivo la membrana è stata sottoposta a 5 lavaggi in TTBS e, successivamente, è stata incubata per 1h a temperatura ambiente in una soluzione di anticorpo policlonale anti-HSP70, prodotto in seguito all'immunizzazione di coniglio con la proteina estratta da *E. coli* (PRIMM) diluito 1:10000 in TTBS (0,1% Tween-20 in TBS).

L'eccesso di anticorpo primario non legato alla membrana è stato eliminato mediante una serie di lavaggi in TTBS. La membrana è stata, quindi, incubata per 1h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario prodotto in capra, GAR-AP (Goat Anti Rabbit-Alkaline Phosphatase; Bio-Rad) diluito 1:10000 in TTBS. Dopo ripetuti lavaggi in TTBS la membrana è stata incubata con il substrato (Immun-Star AP substrate, Bio-Rad) per 5 minuti al buio. Il complesso antigene anticorpo è stato, quindi, rivelato sviluppando la lastra autoradiografica (CL-X Posure film; Pierce) esposta per 5 minuti sulla membrana.

### **3.25 Trasformazione mediata da Agrobatterio di espianti fogliari di *Nicotiana tabacum***

#### **3.25.1 Preparazione della sospensione di Agrobatterio**

Il clone di Agrobatterio selezionato (pJazz35S::CalHSP70\_3'His) è stato preinoculato in 3 ml di terreno di crescita AB contenente 50 mg/l di kanamicina e incubato a 28 °C per 2 giorni. Dopo tale periodo, il preinoculo è stato utilizzato da *starter* per una coltura di 100 ml da utilizzare negli esperimenti di trasformazione. La coltura è stata incubata O/N a 28°C. Il giorno successivo la coltura è stata

centrifugata 15 minuti a 4000 rpm; il pellet ottenuto è stato sciolto in 20 ml di terreno AB e centrifugato come sopra.

Il pellet è stato, infine, sciolto in AB fino ad ottenere una sospensione batterica con OD<sub>600</sub> pari a 0,8.

### **3.25.2 Preparazione degli espianti fogliari**

Foglie di tabacco provenienti da piantine cresciute *in vitro* in camera di crescita alla temperatura di 20°C, sono state tagliate e poste sul terreno di rigenerazione, REG (4,3 g/l MS salts, 0,4 mg/l tiamina, 100 mg/l Mio-Inositolo, 30 g/l saccarosio, 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP; 8 g/l Plant agar; pH 5.6). Gli espianti sono stati lasciati in camera di crescita per 2 giorni.

### **3.25.3 Co-coltivazione, selezione e rigenerazione**

Gli espianti di foglie di tabacco sono stati incubati nella soluzione batterica contenente l'agrobatterio (pJazz35S::CalHSP70\_3'His) per 10 minuti, quindi, posti su carta da filtro e trasferiti in piastre contenenti REG senza antibiotici. Dopo 2 giorni di co-coltivazione gli espianti sono stati trasferiti su nuovo terreno di coltura contenente carbenicillina (500 mg/l) per il controllo della crescita batterica e kanamicina (200 mg/l) per la selezione dei trasformanti, e lasciati in camera di crescita per 3-4 settimane, per la formazione dei calli e, quindi, di nuovi germogli.

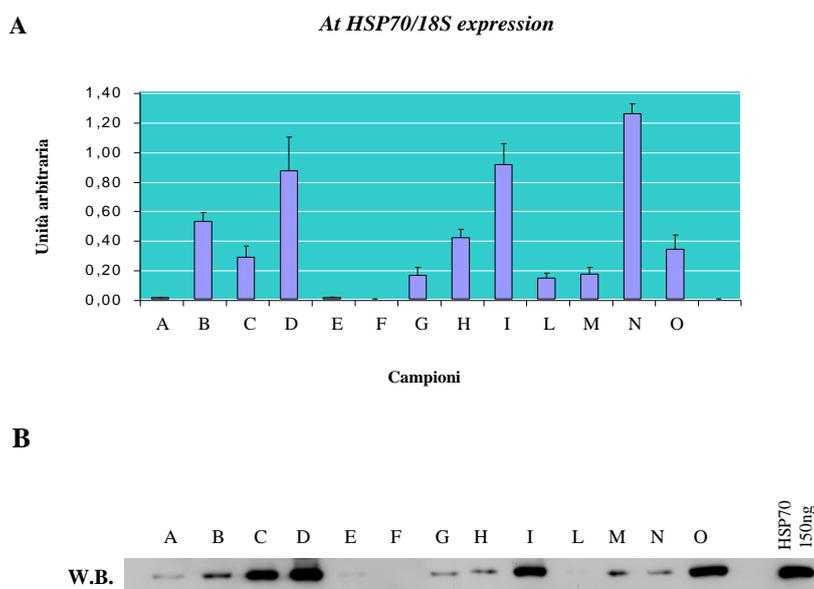
I germogli sono stati asportati e trasferiti in Magenta box su terreno MS (Murashige and Skoog, modificato: 4,3 g/l sali MS, 0,4 mg/l tiamina, 100 mg/l mio-inositolo, 30 g/l saccarosio, 8 % plant agar; pH 5.8) con kanamicina 100 mg/l e carbenicillina 250 mg/l, per consentire lo sviluppo delle piante.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Isolamento dei geni inducibili HSP70 in *Arabidopsis*

Il genoma di *Arabidopsis* contiene almeno 18 geni che codificano per membri della famiglia HSP70. La maggior parte di questi geni è espressa ad un livello basale durante la normale crescita mentre alcuni membri mostrano un' aumentata espressione in particolari stadi dello sviluppo ed in condizioni di stress (Lin *et al.*, 2001).

In *Arabidopsis* l'incremento dell'espressione dei geni HSP70 indotto da stress è stato dimostrato sperimentalmente mediante analisi di qRT-PCR. Sono stati analizzati i cDNA provenienti dalle piante di *Arabidopsis* sottoposte a differenti trattamenti di *heat shock*, effettuati in laboratorio secondo le condizioni riportate in Tabella 3, ed i risultati ottenuti, normalizzati con il gene controllo 18S, sono riportati in Figura 11-A.



**Figura 11** Quantificazione mediante qRT-PCR del livello di espressione delle HSP70 in *Arabidopsis* (At) in seguito ai trattamenti di *heat shock* riportati in Tabella 3 (A) e risultato dell'analisi di Western Blot condotta sugli stessi campioni (B).

Come si può osservare in Figura 11, nel campione controllo non sottoposto ad *heat shock* (Tabella 3 - A) i livelli di mRNA per le HSP70 sono praticamente nulli, mentre un incremento di questi livelli è stato osservato rapidamente durante l'incubazione dei campioni a 40°C per 30 minuti (B; Tabella 3).

Particolarmente efficienti nell'indurre una maggiore espressione dei geni HSP70 si sono rivelati anche i trattamenti D, I e N (Tabella 3; Figura 11).

Il confronto dei livelli di mRNA con il contenuto delle HSP70 rilevato in seguito ad analisi di Western Blot utilizzando anticorpi policlonali anti-HSP70 (Figura 11), ha mostrato una perfetta corrispondenza, ed in alcuni casi, come atteso, un incremento della sintesi dell'mRNA precoce rispetto a quella delle proteine (Figura 11). Le informazioni emerse da questi dati si sono rivelate particolarmente importanti poiché hanno permesso di concentrare su un minor numero di campioni gli esperimenti diretti all'isolamento dei geni inducibili HSP70 in *Arabidopsis*. Sono stati amplificati mediante PCR, esclusivamente i cDNA provenienti dai campioni di *Arabidopsis* che dopo l'*heat shock* hanno mostrato una maggiore espressione del gene inducibile HSP70 ossia i campioni B, D, I e N (Figura 11). Le PCR sono state effettuate utilizzando sia primers che consentono di amplificare la sequenza del gene HSP70 intero (P1 e P2; Tabella 4), sia primers interni che amplificano o solo la porzione 5' (P1 e P3; Tabella 4) o la sola porzione 3' del gene HSP70 (P2 e P4; Tabella 4).

Le sequenze di tutti i primers utilizzati sono state disegnate sulla sequenza genica HSP70 di *Arabidopsis* disponibile in banca dati ([www.ebi.ac.uk/embl/](http://www.ebi.ac.uk/embl/)) e identificata con l'Accession Number AY059885. Mentre l'amplificazione della porzione 5' e 3' del gene è stata ottenuta per tutti e quattro i campioni analizzati (B, D, I, N; Tabella 3), l'amplificazione del gene intero, di circa 2 kb, si è avuta solo per il campione B (Tabella 3). Il gene HSP70 così ottenuto è stato, quindi, clonato nel vettore pCR-

Blunt II-TOPO (pTOPOA4) e trasferito in TOP10 competenti. Le colonie ottenute dalla trasformazione con il plasmide pTOPOA4 sono state sottoposte ad una serie di analisi molecolari per verificare l'incorporazione del plasmide. L'analisi di sequenza condotta sulle colonie positive ha permesso di dimostrare l'integrità del gene clonato nel vettore pCR-Blunt II-TOPO. L'allineamento mediante ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) contro il database nucleotidico ha permesso infine di confermare la perfetta corrispondenza della sequenza genica isolata con la sequenza del gene inducibile HSP70 di *Arabidopsis* AY059885.

#### **4.2 Over-espressione del gene CalHSP70\_3'His in *Nicotiana tabacum***

L'utilizzo di fonti rinnovabili, come le piante, per la produzione di proteine ricombinanti ha ricevuto negli ultimi anni particolare attenzione.

Uno dei maggiori problemi legati a questa produzione riguarda i costi spesso elevati di estrazione e purificazione delle molecole ricombinanti prodotte in pianta. Questa limitazione può essere superata sfruttando la capacità di secrezione delle radici delle piante. È per tale motivo che si è scelto di dirigere la proteina d'interesse HSP70 verso il pathway di secrezione e, quindi indurre il rilascio della stessa nello spazio intercellulare (apoplasto), marcandola con una sequenza segnale per il reticolo endoplasmatico. Inoltre per consentire una rapida localizzazione della proteina ricombinante e distinguerla quindi dalla HSP70 endogena, si è scelto di legare un His-tag alla sua porzione C-terminale, che potrà essere identificata mediante esperimenti di immunolocalizzazione, utilizzando anticorpi diretti contro His-tag.

Sperimentalmente per esprimere questa proteina in pianta, il gene d'interesse identificato come CalHSP70\_3'His è stato sub-clonato nel vettore pCR-BluntII-

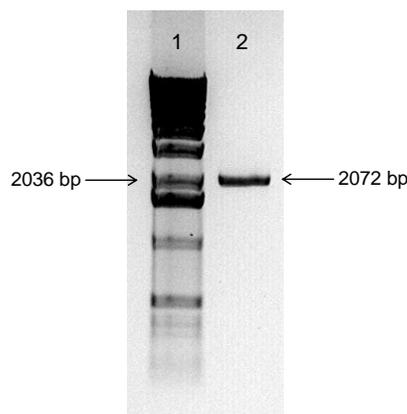
TOPO (pTOPOCalHSP70\_3'His) per essere successivamente trasferito nel vettore binario pJazz per l'espressione in pianta.

Il vettore pTOPOCalHSP70\_3'His è stato generato utilizzando come stampo per la sintesi del frammento genico CalHSP70\_3'His il DNA plasmidico estratto dalle colonie di *E. coli* trasformate con il vettore pTOPOCalHSP70. Questo vettore, ottenuto nel corso di attività sperimentali condotte in parallelo all'attività di ricerca relativa a questo lavoro di tesi, contiene il costrutto genico CalHSP70, sintetizzato inserendo al 5' del gene HSP70 isolato in *Arabidopsis* la sequenza del peptide segnale della calreticulina (Cal). Questa proteina costituisce una delle proteine maggiormente rappresentate nel reticolo endoplasmatico. Con l'espressione del transgene in pianta, la proteina sintetizzata, marcata con il peptide segnale della Cal dovrebbe essere indirizzata verso questo compartimento, diretta al pathway di secrezione e, quindi rilasciata nell'apoplasto. Molti sono i dati riportati in letteratura che dimostrano la produzione continua di molecole ricombinanti da essudati radicali, sfruttando questo sistema, proposto per la prima volta da Borisjuk e collaboratori e definito come rizosecrezione (Borisjuk *et al.*, 1999).

Per poter seguire il destino della proteina d'interesse CalHSP70 e, quindi, verificare se essa viene secreta a livello radicale, al costrutto genico CalHSP70 è stata legata una sequenza che codifica per 6 residui di istidina (His-tag), rilevabile mediante esperimenti di immunolocalizzazione con anticorpi anti His-tag.

Per la sintesi di questo costrutto il DNA plasmidico pTOPOCalHSP70 è stato amplificato mediante PCR con i primers P5 e P6 (Tabella 4; Figura 7).

La PCR ha generato un frammento di dimensioni pari a 2072 bp (Figura 12) che dopo essere stato purificato da gel di agarosio è stato clonato nel vettore pCR-Blunt II TOPO.

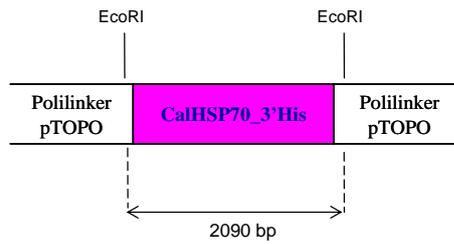


**Figura 12** Analisi elettroforetica del prodotto dell'amplificazione genica *in vitro* mediante PCR del DNA plasmidico pTOPOCalHSP70 utilizzando la coppia di primers P5 e P6 (Tabella 4). La dimensione del frammento atteso è indicata dalla freccia, ed è stata determinata utilizzando come marcatore di peso molecolare il 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) (pozzetto 1).

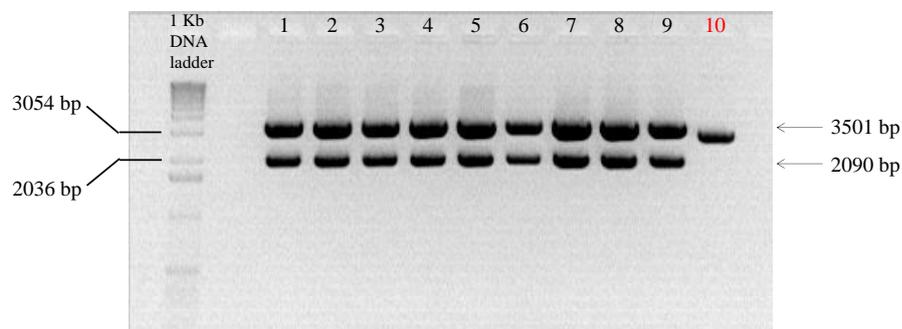
Il vettore generato, identificato come pTOPOCalHSP70\_3'His è stato utilizzato per trasformare cellule competenti TOP10. L'efficienza della trasformazione è risultata elevata ma lo screening dei trasformanti è stato condotto solo su alcune delle colonie ottenute. In particolare, per confermare la presenza del plasmide pTOPOCalHSP70\_3'His nei cloni ottenuti, il DNA plasmidico proveniente da queste colonie è stato sottoposto ad analisi di restrizione con l'enzima EcoRI.

Le sequenze di riconoscimento dell'enzima EcoRI sono localizzate nel plasmide pTOPO, precisamente 11 nucleotidi a valle e 7 nucleotidi a monte del "TOPO-cloning site". La digestione enzimatica con EcoRI consente l'escissione di un frammento di 2090 bp che comprende il gene CalHSP70\_3'His ed uno di 3501 bp costituito dal corpo del plasmide. I frammenti ottenuti dalla digestione con EcoRI sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% ed il risultato è riportato in Figura 13.

**A**



**B**

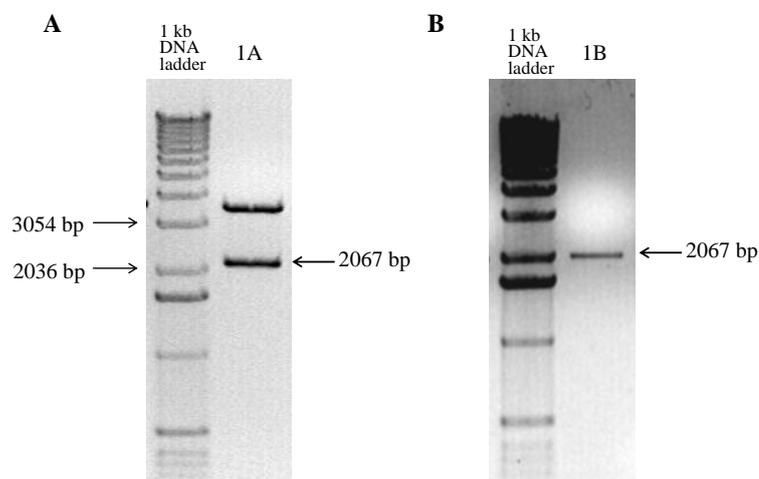


**Figura 13** Localizzazione dei siti di restrizione dell'enzima EcoRI nel costrutto pTOPOCalHSP70\_3'His (A) e analisi elettroforetica dei frammenti prodotti dalla digestione (B). Le dimensioni (indicate dalle frecce) dei due frammenti attesi dalla digestione con EcoRI sono state determinate utilizzando come marcatore di peso molecolare il 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen); in rosso è indicata l'unica colonia (10), tra quelle analizzate, che non presenta il corretto *pattern* di digestione.

Nove dei dieci cloni sottoposti a digestione con EcoRI hanno mostrato il corretto *pattern* di digestione, ossia i due frammenti di dimensioni pari a 3501 bp e 2090 bp (campioni 1-9; Figura 13); quattro di questi sono stati scelti per la determinazione della sequenza nucleotidica. Il sequenziamento dei cloni è stato effettuato utilizzando due primers specifici per il gene HSP70, indicati come P7 e P8 (Tabella 4), e i due primers P9 e P10 (Tabella 4) complementari alle regioni del vettore fiancheggianti il "Multiple Cloning Site". Verificata la correttezza della sequenza nucleotidica, uno tra i cloni pTOPOCalHSP70\_3'His che presentava la corretta sequenza,

precisamente il clone numero 1, è stato scelto per essere clonato nel vettore di espressione binario pJazz per l'espressione in pianta, che contiene il promotore costitutivo 35S ed il terminatore NOS.

Il DNA plasmidico pTOPOCalHSP70\_3'His ed il vettore pJazz sono stati digeriti con la coppia di enzimi di restrizione XbaI e BamHI; i frammenti ottenuti dalla digestione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio concentrato all'1% (Figura 14). La banda corrispondente al gene CalHSP70\_3'His di dimensione pari a 2067 bp (Figura 14) è stata asportata dal gel di agarosio e purificata mediante GENECLAN.



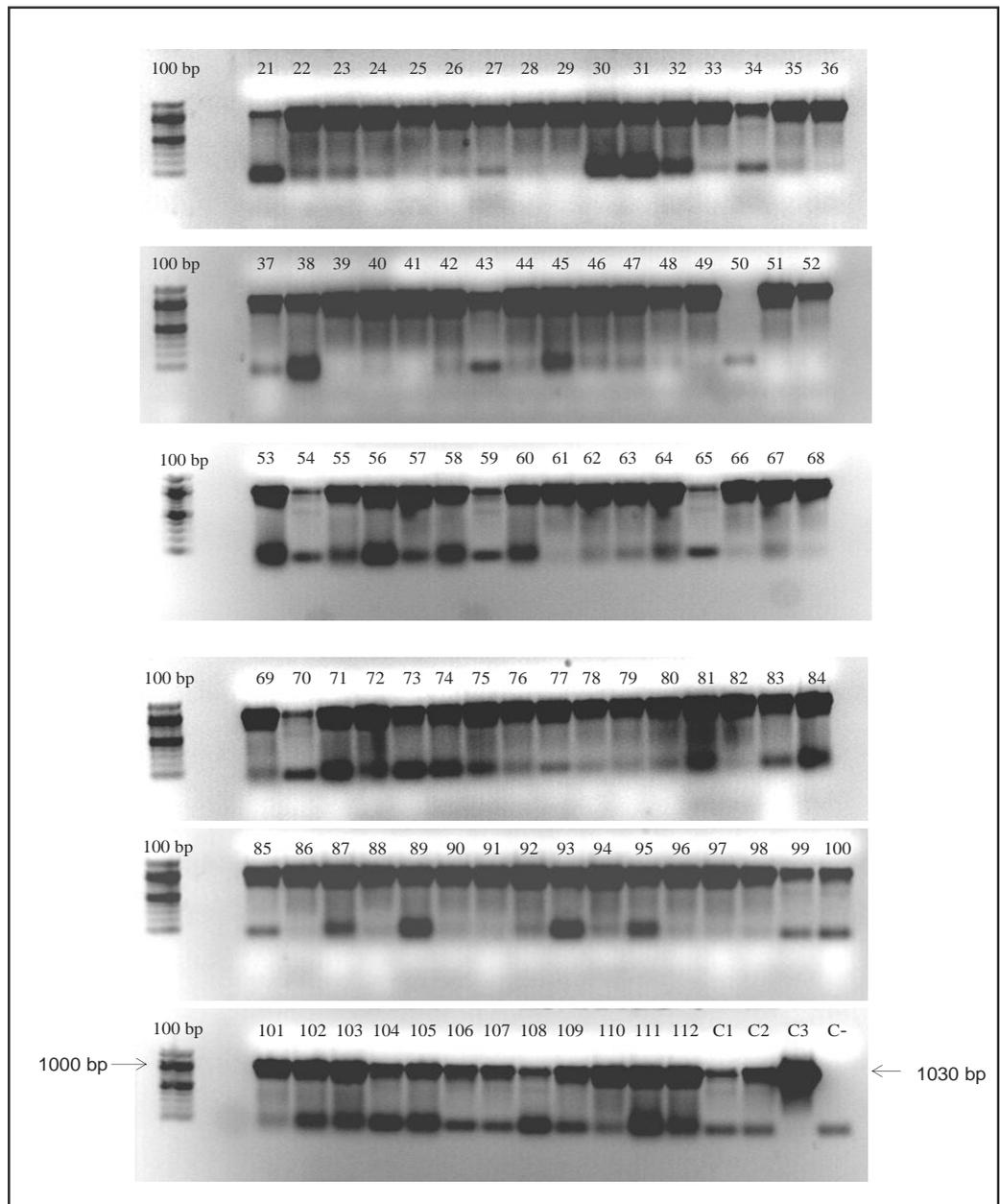
**Figura 14** (A) Analisi elettroforetica dei frammenti ottenuti dalla digestione del DNA plasmidico pTOPOCalHSP70\_3'His con gli enzimi XbaI e BamHI (1A). La banda attesa di dimensione pari a 2067 bp è stata asportata dal gel di agarosio e purificata mediante GENECLAN (B). Le dimensioni dei frammenti sono state determinate utilizzando come marcatore di peso molecolare il 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Il frammento pTopoCalHSP70\_3'His digerito XbaI/ BamHI è stato, quindi, clonato nel vettore pJazz, digerito con la stessa coppia di enzimi di restrizione, utilizzando il T4 DNA Ligase Kit (Roche). Il vettore generato pJazz35S::CalHSP70\_3'His (Figura 8) è stato utilizzato per trasformare cellule TOP10 competenti.

L'efficienza della trasformazione delle cellule TOP10 con il plasmide pJazz35S::CalHSP70\_3'His è risultata molto elevata, tuttavia, l'incorporazione del plasmide da parte delle cellule trasformate, è stata verificata amplificando alcune delle colonie ottenute con i primers P11 e P3 (Tabella 4), specifici per il gene HSP70 che permettono l'amplificazione di una regione di 1030 bp.

Come si può osservare in Figura 15, dove è riportato il risultato dell'analisi elettroforetica dei prodotti di PCR, tutte le colonie analizzate, tranne una, sono risultate positive.

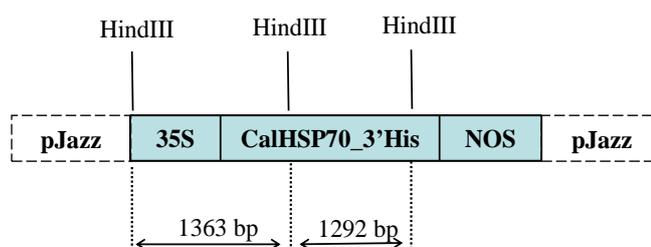
Come controlli positivi (C1, C2, C3; Figura 15) della PCR sono stati amplificati i DNA plasmidici pTOPO35S::HSP70 provenienti da tre diverse preparazioni, e come atteso tutti e tre i campioni amplificati hanno mostrato la banda delle dimensioni attese (Figura 15).



**Figura 15** Analisi elettroforetica dei frammenti genici ottenuti dall'amplificazione delle colonie di *E. coli*, trasformate con il plasmide pJazz35S::CalHSP70\_3'His, con la coppia di primers P11 e P3 (Tabella 4). La dimensione del frammento amplificato (1030 bp) è stata determinata utilizzando il marcatore di peso molecolare 100 bp DNA ladder (NEB).

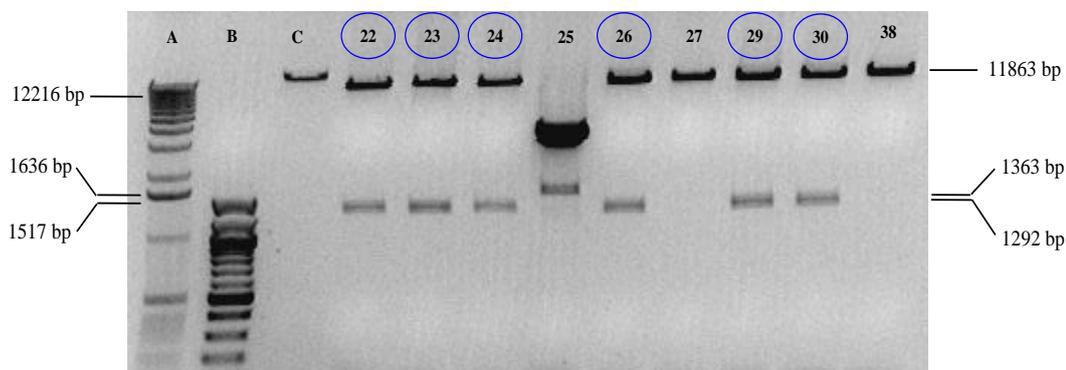
Per confermare il risultato ottenuto dalla PCR e verificare il corretto orientamento del costrutto genico di interesse, il DNA plasmidico estratto da 9 delle colonie positive è stato sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima HindIII.

Nel plasmide pJazz35S::CalHSP70\_3'His sono presenti tre siti di restrizione dell'enzima HindIII: il primo all'inizio della sequenza del promotore 35S, il secondo ed il terzo nel gene CalHSP70\_3'His, rispettivamente a 502 e 1794 bp dall'inizio della sequenza codificante il gene (Figura 16).



**Figura 16** Localizzazione dei siti di restrizione dell'enzima HindIII nel plasmide pJazz35S::CalHSP70\_3'His. I frammenti genici prodotti dalla digestione e le relative dimensioni sono indicati dalle frecce.

I frammenti attesi dalla digestione, di dimensione pari a 1363 bp, 1292 bp e 11863 bp, sono stati separati mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio concentrato all'1% (Figura 17).



**Figura 17** Analisi elettroforetica su gel di agarosio concentrato all'1% dei frammenti attesi dalla digestione del DNA plasmidico pJazz35S::CalHSP70\_3'His con l'enzima HindIII. In blu sono evidenziati i cloni che presentano il corretto pattern di digestione. Le dimensioni dei frammenti sono state determinate utilizzando come marcatori di peso molecolare il 1kb Plus DNA ladder (A; Invitrogen) ed il 100 bp DNA ladder (B; NEB).

Dal risultato dell'analisi elettroforetica dei frammenti ottenuti dalla digestione enzimatica (Figura 17), è emerso che sei degli otto cloni analizzati hanno mostrato il corretto pattern di digestione (Figura 17). Quattro di questi cloni sono stati scelti e sottoposti a sequenziamento automatico per verificarne la sequenza nucleotidica.

Per ciascun clone sono state condotte quattro reazioni di sequenza utilizzando i primers: P8 (Tabella 4) complementare ad una regione nucleotidica interna del gene HSP70, i primers P9 e P10 (Tabella 4) complementari, rispettivamente, alle regioni del vettore pJazz fiancheggiati il promotore 35S ed il terminatore NOS, ed il primer P12 (Tabella 4) complementare alla sequenza del promotore 35S.

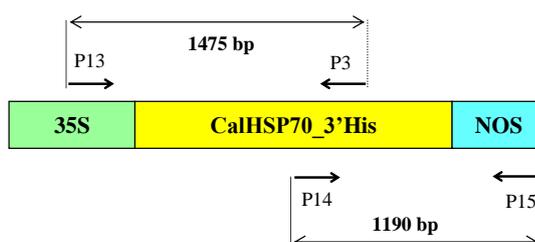
Il sequenziamento effettuato con i primers sopra elencati ha permesso di verificare la presenza e l'integrità della cassetta 35S::CalHSP70\_3'His::NOS del plasmide pJazzCalHSP70\_3'His nei cloni analizzati.

Per poter permettere l'espressione costitutiva del gene CalHSP70\_3'His in piante di *N. tabacum* il plasmide di espressione per pianta generato, pJazzCalHSP70\_3'His, è stato trasferito in Agrobatterio. La trasformazione delle cellule di Agrobatterio con il plasmide d'interesse è stata effettuata mediante elettroporazione ed è stata caratterizzata da elevata efficienza di trasformazione.

Per verificare l'integrazione del plasmide pJazz35S::CalHsp70\_3'His nelle cellule di Agrobatterio cresciute su terreno selettivo contenente rifampicina (25mg/l), streptomicina (500 mg/l) e kanamicina (50 mg/L), sono state condotte due PCR.

La prima PCR è stata effettuata con la coppia di primers P13 e P3 (Tabella 4; Figura 18), la seconda con i primers P14 e P15 (Tabella 4; Figura 18).

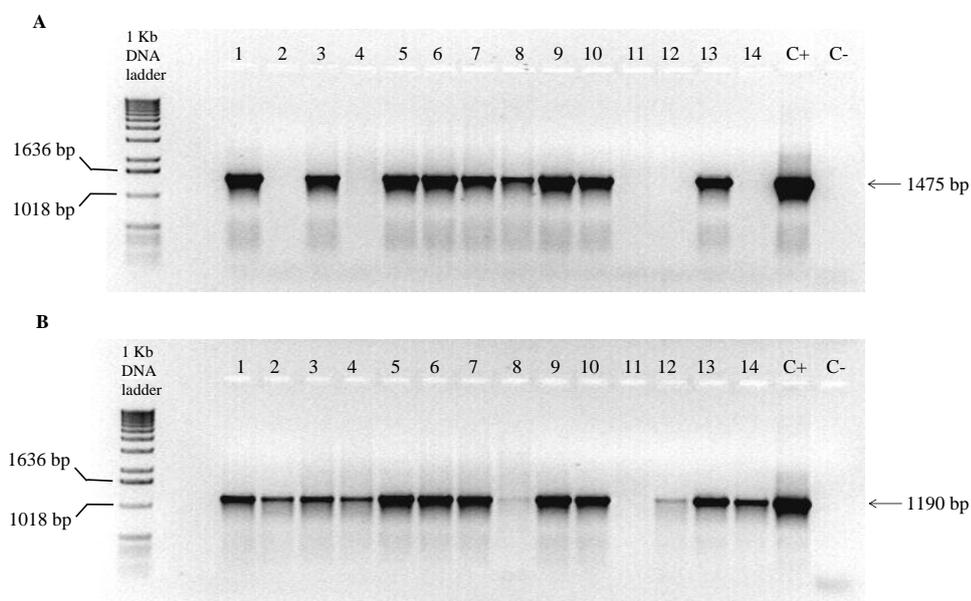
In Figura 18 è riportato lo schema dell'amplificazione con le due coppie di primers sopra riportate, la cui scelta è stata dettata dalla necessità di verificare l'integrità del costruito genico nel plasmide pJazz35S::CalHSP70\_3'His.



**Figura 18** Schema dell'amplificazione del costrutto 35S::CalHSP70\_3'His con le due coppie di primers P13/P3 e P14/P15 (indicati dalle frecce). In figura sono indicati anche i frammenti attesi dalle due PCR e le relative lunghezze in bp.

In particolare per lo screening dei trasformanti sono stati amplificati i DNA plasmidici estratti da 14 dei cloni di Agrobacterio ottenuti dalla trasformazione (Figura 19). Dalla prima amplificazione condotta con la coppia di primers P13/P3 era atteso un frammento di dimensioni pari a 1475 bp, mentre dalla seconda amplificazione, condotta con la coppia di primers P14/P15, era atteso un frammento di dimensioni minori pari a 1190 bp (Figura 19).

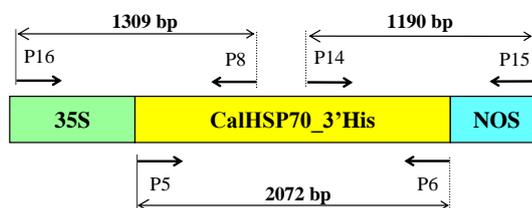
L'analisi elettroforetica dei prodotti di PCR (Figura 19) ha permesso di verificare che nove dei campioni analizzati sono risultati positivi ad entrambe le reazioni. La positività dei cloni di Agrobacterio in entrambe le PCR è stata valutata inserendo tra i campioni amplificati anche un controllo positivo C+ (Figura 19), costituito dal DNA plasmidico pJazz35S::CalHSP70\_3'His. Come atteso nessuno dei due controlli negativi (C-) amplificati ha mostrato la presenza di bande (Figura 19).



**Figura 19** Analisi elettroforetica su gel di agarosio concentrato all'1% dei frammenti attesi dalle reazioni di amplificazione del DNA plasmidico pJazz35S::CalHSP70\_3'His condotte con le coppie di primers P15/P13 (A) e P16/P17 (B) (Tabella 4). Le dimensioni dei frammenti attesi sono indicate dalla frecce e sono state determinate utilizzando come marcatore di peso molecolare il 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Una volta verificata la positività dei cloni di Agrobatterio, uno tra questi, in particolare il numero 9, è stato scelto per la trasformazione di espianti fogliari di *N. tabacum*. Le piantine rigenerate da calli sono state selezionate su terreno selettivo contenente kanamicina (100 mg/l) e carbenicillina (250 mg/l).

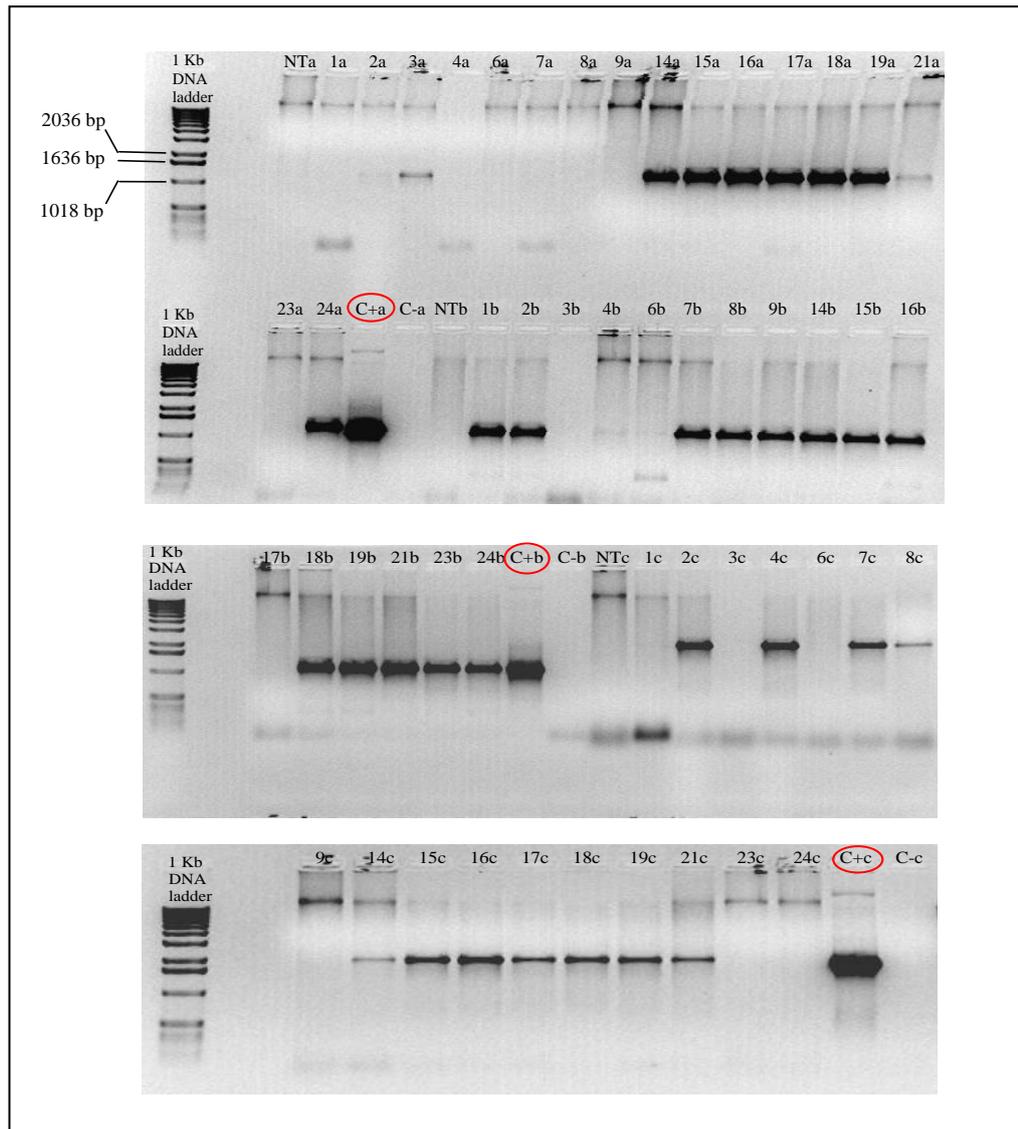
Per verificare la presenza del transgene nelle piante di *N. tabacum* ottenute in seguito alla trasformazione mediata da Agrobatterio, sono state condotte tre PCR con tre diverse coppie di primers. Dall'amplificazione con la coppia di primers P16/P8 (Tabella 4) era atteso un frammento di 1309 bp, con la coppia di primers P14/P15 (Tabella 4) un frammento di 1190 bp, mentre con la coppia P5/P6 (Tabella 4) uno di 2072 bp (Figura 20).



**Figura 20** Schema dell'amplificazione del costrutto 35S::CalHSP70\_3'His con le tre coppie di primers P16/P8, P14/P15 e P5/P6 (Tabella 4). In figura sono indicati anche i frammenti attesi dalle tre PCR e le relative lunghezze in bp.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte oltre che sul DNA estratto dalle piante di tabacco trasformate, anche sul DNA estratto da una pianta controllo non trasformata (NT; Figura 21), che come atteso non ha mostrato la presenza di bande di

amplificazione. Inoltre, per confermare la positività dei campioni analizzati, è stato amplificato anche un controllo positivo (C+) corrispondente al DNA plasmidico pJazz35S::CalHSP\_3'His (Figura 21).

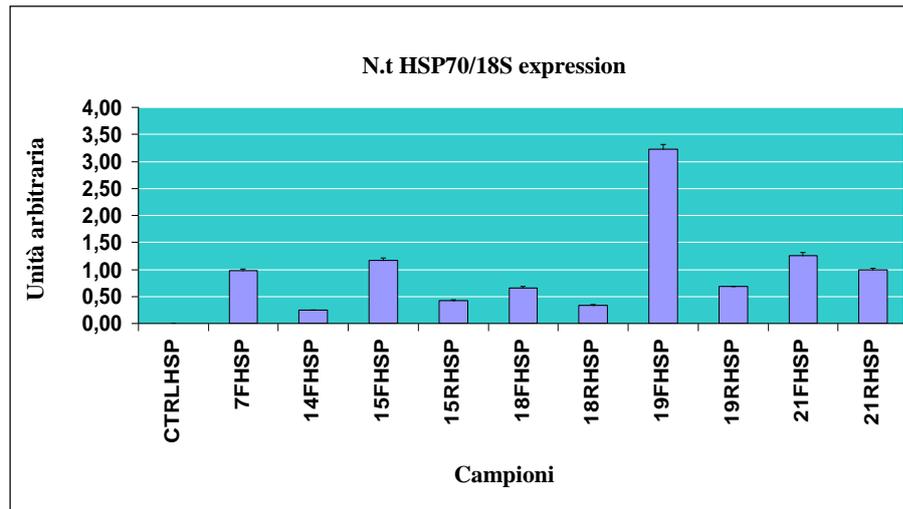


**Figura 21** Analisi elettroforetica dei prodotti di PCR ottenuti amplificando il DNA estratto da alcune delle piante di tabacco trasformate mediante Agrobatterio e piante non trasformate (NT), con le coppie di primers P16/P8 (a), P14/P15 (b) e P5/P6 (c) (Tabella 4). I controlli positivi e negativi delle PCR sono indicati con C+ e C-, rispettivamente. In rosso sono evidenziati i controlli positivi di ciascuna PCR. La dimensione dei frammenti è stata determinata utilizzando il marcatore di peso molecolare 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Dai risultati dell'analisi elettroforetica dei prodotti amplificati è emerso che circa la metà delle piante analizzate sono risultate positive a tutte e tre le PCR effettuate. Come atteso nessuno dei controlli negativi e delle piante non trasformate hanno mostrato la presenza di bande di amplificazione, mentre le bande attese sono state confermate nei controlli positivi (Figura 21).

Per verificare la presenza del trascritto relativo al gene che codifica per l'*His-tag* HSP70 sono state scelte alcune delle piante di tabacco trasformate con il plasmide pJazzCalHSP70\_3'His e su queste è stata condotta un'analisi di qRT-PCR.

L'espressione del gene HSP70 è stata valutata sia a livello fogliare che a livello radicale ed i risultati normalizzati con il gene controllo 18S (Figura 22). In particolare l'analisi di qRT-PCR è stata condotta su 6 piante trasformate (7, 14, 15, 18, 19 e 21) ed un controllo non trasformato (CTRL). Su 4 delle sei piante transgeniche è stata verificata l'espressione del gene sia a livello fogliare (15F, 18F, 19F e 21F) che a livello radicale (15R, 18R, 19R e 21R). Come atteso non è stata evidenziata la presenza di trascritti del gene HSP70 nella pianta controllo non trasformata, mentre diversi livelli di RNA messaggero (mRNA) sono stati riscontrati in tutte le piante trasformate, in entrambi i tessuti analizzati (Figura 22). In particolare i più alti livelli di mRNA per le HSP70 sono stati rilevati a livello del tessuto fogliare nella pianta 19. A livello radicale tutte le piante analizzate hanno mostrato la presenza dei trascritti dei geni HSP70, anche se a livelli più bassi rispetto a quelli rilevati nelle foglie. Soltanto per una delle piante analizzate, la numero 21, i livelli di mRNA dei geni HSP70 nei due tessuti sono risultati quasi comparabili (Figura 22).



**Figura 22** Quantificazione mediante qRT-PCR dei livelli di espressione del gene CalHSP70\_3'His (normalizzati con il gene controllo 18S) in 7 piante di *N. tabacum* (N.t). Con la lettera F sono indicati i campioni di cDNA sintetizzati dall'RNA estratto dalle foglie mentre con R sono indicati i campioni di cDNA sintetizzati dall'RNA estratto dalle radici.

#### 4.3 Produzione della proteina ricombinante *His-tag* HSP70 in *S. cerevisiae*

Come già ampiamente riportato nella parte introduttiva di questa tesi molti sono i vantaggi ottenuti dall'impiego del lievito come sistema di espressione per proteine eterologhe. È per tale motivo che parallelamente all'overespressione del gene HSP70 nel sistema vegetale *N. tabacum* si è scelto di esprimere il gene di interesse di questo lavoro di tesi in *S. cerevisiae*.

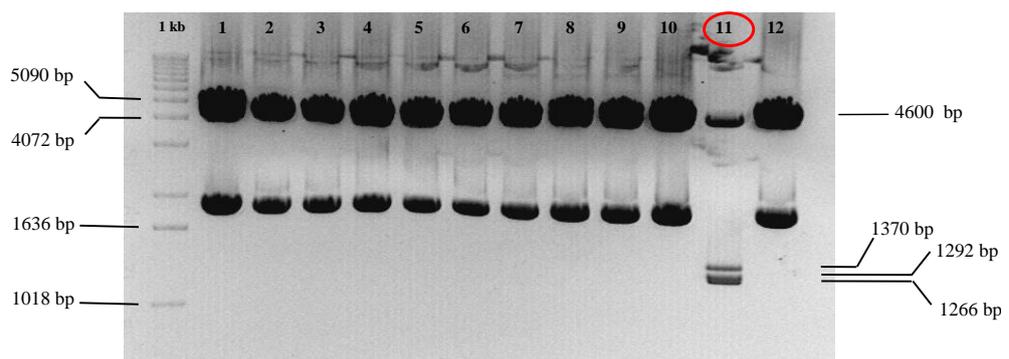
Per poter esprimere la proteina di interesse *His-tag* HSP70 in *S. cerevisiae* è stato necessario clonare il gene HSP70 legato alla sequenza *His-tag* nel vettore commerciale pESC-Trp (Stratagene). Il pESC-Trp è un vettore ibrido, creato per l'espressione e l'analisi funzionale di geni eucariotici in lievito, che contiene anche una porzione di origine batterica costituita da un'origine di replicazione per *E. coli*

per permettere il clonaggio in questo sistema, insieme ad un marker di selezione per lo screening dei trasformanti.

#### 4.3.1 Trasformazione delle cellule TOP10 competenti con il vettore pESC-TrpA4Y3His e analisi dei trasformanti

La verifica dell'acquisizione del plasmide pESC-TrpA4Y3His è stata effettuata su 12 colonie di *E. coli* trasformate, digerendo il DNA plasmidico con l'enzima HindIII (NEB). Dalla digestione con HindIII erano attesi quattro frammenti di dimensioni pari a 4600 bp, 1370 bp, 1292 bp e 1266 bp (Figura 23).

La separazione mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%, dei frammenti ottenuti dalla digestione, ha evidenziato che solo una delle colonie analizzate, la numero 11, ha mostrato il pattern di digestione atteso e, quindi, l'acquisizione del plasmide pESC-TrpA4Y3His (Figura 23).



**Figura 23** Analisi elettroforetica dei prodotti ottenuti dalla digestione con l'enzima HindIII del DNA plasmidico estratto da 12 delle colonie di *E. coli* ottenute dalla trasformazione con il plasmide pESC-TrpA4Y3His. In rosso è evidenziata l'unica colonia (11) tra quelle analizzate, che presenta il corretto pattern di digestione. Le dimensioni dei frammenti ottenuti è stata determinata utilizzando il marcatore di peso molecolare 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Per confermare questo dato e verificare il corretto orientamento del gene A4Y3His sono state condotte due reazioni PCR. La prima reazione di amplificazione (a; Figura 24) è stata effettuata utilizzando come *forward* il primer P17 (Tabella 4), complementare alla sequenza del promotore GAL10 del vettore pESC-Trp, e come *reverse* il primer P3 (Tabella 4), complementare alla sequenza del gene HSP70, che permettono l'amplificazione di un frammento di 1279 bp (Figura 24).

Nella seconda reazione (b; Figura 24) sono stati utilizzati due primers specifici per il gene HSP70, ossia i primers P11 e P3 (Tabella 4), che consentono l'amplificazione di un frammento di dimensioni pari a 1100 bp (Figura 24). Entrambe le PCR sono state condotte con la Taq DNA polimerasi fornita dalla Invitrogen con un programma di amplificazione differente da quello adottato per tutte le altre amplificazioni effettuate in questo lavoro di tesi.

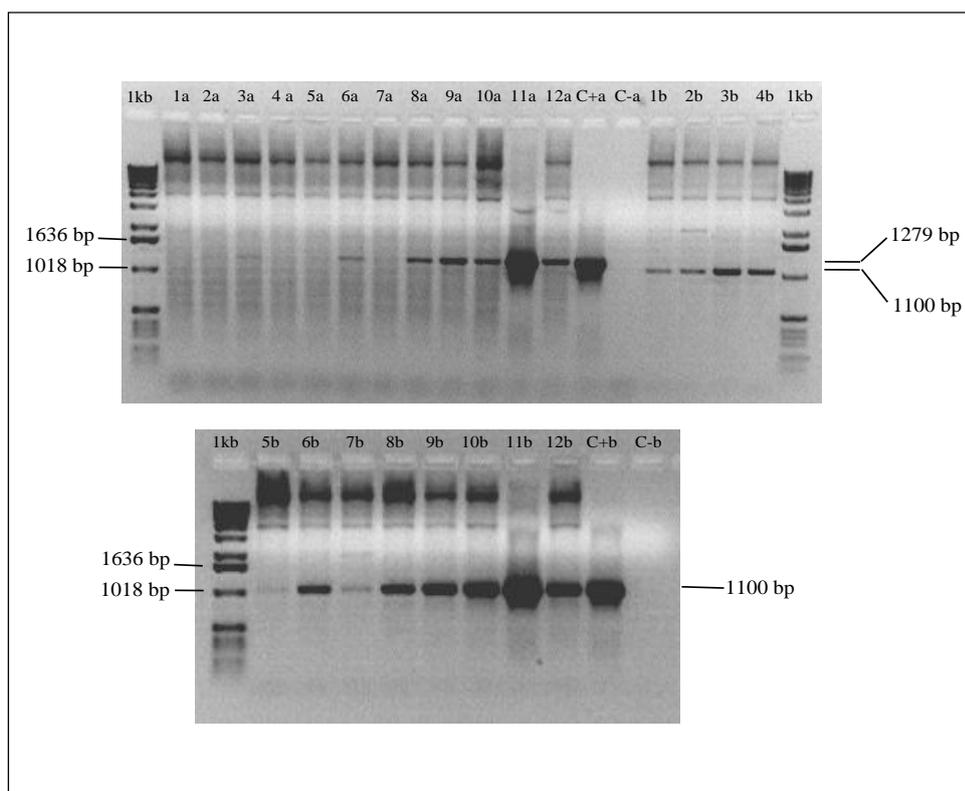
Il programma suggerito dalla ditta produttrice del vettore pESC-Trp (Stratagene) è stato impostato come segue:

94 °C	4 min	} 1 ciclo
50 °C	2 min	
72 °C	2 min	
94 °C	1 min	} 30 cicli
56 °C	2 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Oltre ai cloni di *E. coli* trasformati con il plasmide pESC-TrpA4Y3His è stato amplificato anche un controllo positivo (C+a e C+b; Figura 24) equivalente al DNA

plasmidico del clone pESC-TrpHSP70. Entrambi i controlli negativi (C-; Figura 24), come atteso, hanno mostrato l'assenza di bande di amplificazione.

I risultati ottenuti hanno confermato la positività del clone numero 11 sul quale è stata infine determinata la sequenza nucleotidica utilizzando diversi primers complementari alla sequenza del gene A4Y3His come P7, P8, P11, P3, ed il primer P17 (Tabella 4) complementare alla sequenza del promotore GAL10, che ha permesso di controllare la sequenza di giunzione tra il promotore ed il gene A4Y3His nel vettore pESC-TrpA4Y3His.



**Figura 24** Analisi elettroforetica dei prodotti ottenuti dalle due PCR condotte sul DNA plasmidico estratto dalle 12 colonie di *E. coli* trasformate, per verificare la presenza del vettore pESC-TrpA4Y3His. I campioni amplificati con la coppia di primers P17 e P3 sono indicati con la lettera a mentre quelli ottenuti dalla PCR con i primers P11 e P3 sono indicati con la lettera b. I controlli positivi e negativi sono indicati come C+ e C-, rispettivamente. Sulla destra della figura sono indicate le dimensioni dei frammenti attesi dalle due PCR, confermate utilizzando il marcatore di peso molecolare 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Il sequenziamento ha permesso di confermare la correttezza della sequenza relativa al plasmide pESC-TrpA4Y3His del clone 11 di *E. coli* che è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *S. cerevisiae*.

#### **4.3.2 Trasformazione di *S. cerevisiae* e selezione dei trasformanti**

Le cellule di *S. cerevisiae* sono state trasformate mediante *heat shock* ed i trasformanti sono stati selezionati sul terreno SD. Questo terreno contiene tutti gli aminoacidi essenziali per la crescita delle cellule tranne il triptofano. L'assenza di questo aminoacido permetterà solo la crescita delle cellule di lievito che hanno acquisito il plasmide pECS-TrpA4Y3His ed il plasmide pESC-Trp. Infatti, la presenza nel plasmide pESC-Trp del gene marker Trp, che codifica per il triptofano, conferirà alle cellule trasformate la capacità di sintetizzare l'aminoacido, essenziale per la loro crescita, una volta piastrate su un terreno che ne è privo come l'SD.

Molte sono state le colonie di lievito ottenute sia dalla trasformazione con il vettore pESC-TrpA4Y3His sia con il vettore pESC-Trp. alcune delle colonie di lievito sono state scelte per verificare la produzione delle proteina ricombinante His-tag HSP70 indotta dal galattosio.

#### **4.3.3 Crescita dei cloni di *S. cerevisiae* trasformati e verifica dell'induzione dell'espressione dei geni HSP70 nelle cellule trasformate**

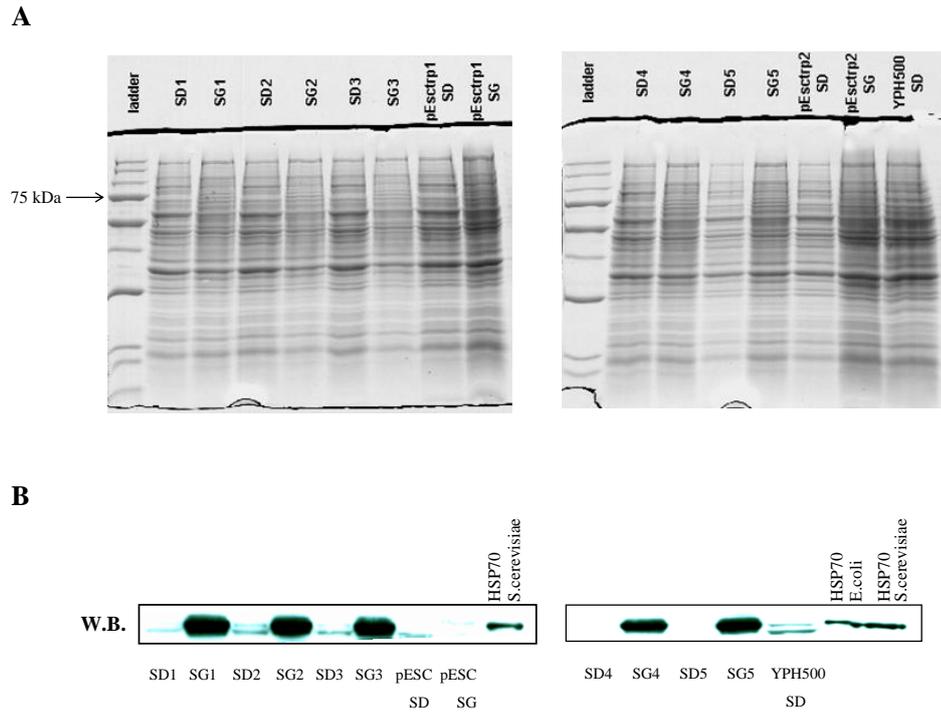
Delle colonie di lievito trasformate, 5 e 3, rispettivamente, con il plasmide pESC-TrpA4Y3His e pESC-Trp sono state fatte crescere in SD e quando la crescita delle cellule era nella fase ottimale queste colture sono stati inoculati in SG e incubati per 2 giorni a 30 °C. Le proteine sono state estratte dalle cellule di lievito mediante

l'utilizzo di "glass-beads" aggiunte del loading buffer, sono state denaturate e caricate su gel. In particolare sono stati caricate le proteine estratte da 5 delle colonie di lievito trasformate con il plasmide pESC-TrpA4Y3His, cresciute in SD (SD1-SD5) e SG (SG1-SG5), da 1 colonia di lievito contenente il plasmide pESC-Trp (pESC-Trp1 in SD e pESC-Trp1 in SG) e da una colonia di lievito YPH500 non trasformata cresciuta in SD (Figura 25).

Come atteso, i risultati ottenuti dall'analisi Western hanno evidenziato un accumulo delle proteine HSP70 nei cloni di lievito trasformati con il plasmide pESC-TrpA4Y3His e cresciuti in SG (SG1-SG5) rispetto ai cloni trasformati che sono cresciuti in SD (SD1-SD5).

La presenza del galattosio nel terreno di crescita SG determina, infatti, l'attivazione del promotore inducibile GAL10 e di conseguenza l'induzione dell'espressione del gene HSP70 che è stato clonato a valle del promotore.

In alcuni dei cloni di lievito trasformati cresciuti in SD e nelle cellule YPH500 non trasformate è stata evidenziata in seguito all'analisi Western, una banda molto esile la cui presenza, potrebbe essere spiegata dal legame dell'anticorpo primario anti-HSP70 con la proteina endogena del lievito.



**Figura 25** (A) SDS-PAGE delle proteine totali estratte da 5 dei cloni di *S.cerevisiae* trasformati con il plasmide pESC-TrpA4Y3His (SD1-SD5; SG1-SG5), 2 dei cloni trasformati con il plasmide pESC-Trp (pESC-Trp1,2 SD e pESC-Trp1,2 SG) e da cellule YPH500 non trasformate (YPH500 SD) Su entrambi i gel è stato caricato un marcatore di peso molecolare (Precision Plus Protein Standards; Bio-Rad). Nella parte B della figura sono riportati i risultati ottenuti dell'analisi di western blot condotta sui lisati proteici estratti dai 5 cloni di lievito pESC-TrpHSP70His analizzati con SDS-PAGE, da 1 clone trasformato con il solo plasmide pESC-Trp e dalle cellule non trasformate. Come controlli positivi sono stati utilizzati le proteine HSP70 estratte da *E. coli* e da *S. cerevisiae*.

Confermata la produzione della proteina HSP70 nei cloni di lievito trasformati con il plasmide pESC-TrpA4Y3His, uno tra questi è stato scelto per la produzione su media scala della proteina ricombinante *His-tag* HSP70 mediante l'utilizzo di un fermentatore LiFlus GX (BIOTRON).

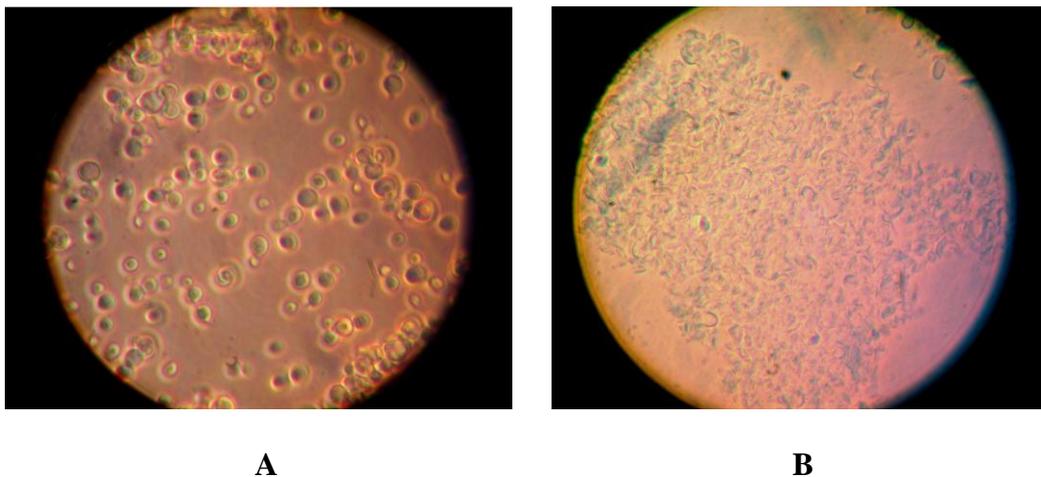
#### 4.3.4 Produzione di HSP70 ricombinante in lievito

La produzione di *His-tag* HSP70 da parte del clone 5 di lievito è stata ottenuta su media scala partendo da una coltura di cellule di circa 4 litri, mediante l'utilizzo del fermentatore LiFlus GX (BIOTRON).

L'estrazione delle proteine totali dalle cellule di lievito provenienti da questa coltura è stata condotta presso il CNR-ISPAs di Lecce mediante l'utilizzo della French Press Cell Disrupter (Thermo Electron Corporation), con complessivamente 5 passaggi ad una pressione di 20000 psi (Pound per Square Inches), che si sono rivelati sufficienti per ottenere un'efficiente rottura delle cellule.

Per verificare l'entità della rottura delle cellule la sospensione in uscita dalla French Press dopo ogni passaggio è stata controllata al microscopio ottico.

In Figura 26 sono riportate le immagini relative alle cellule di lievito osservate prima e dopo i 5 passaggi consecutivi nella French Press.



**Figura 26** Immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule di lievito analizzate prima (A) e dopo (B) i 5 passaggi consecutivi nella French Press.

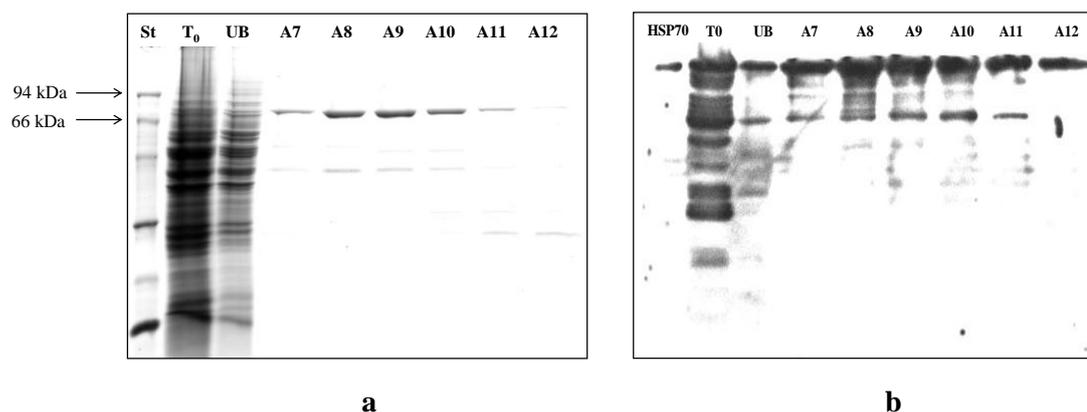
Come si evince dalle immagini ottenute dall'analisi con il microscopio ottico, nella sospensione in uscita dalla French Press (dopo il quinto passaggio) sono stati osservati esclusivamente ammassi di detriti cellulari e pochissime cellule intere (Figura 26), che è stato possibile eliminare mediante ultracentrifugazione a 28000 rpm per 1 h (KONTRON Centrikon T-2080). Il surnatante recuperato dall'ultracentrifugazione del lisato cellulare, contenente il pool di proteine totali è stato quindi congelato a -20°C per essere successivamente utilizzato in sistemi di purificazione cromatografici per ottenere la proteina ricombinante HSP70.

#### **4.3.5 Purificazione della proteina ricombinante HSP70**

La purificazione della proteina HSP70 ricombinante prodotta in lievito è stata ottenuta dal pool di proteine totali mediante cromatografia di affinità. La purificazione è stata effettuata utilizzando la colonna cromatografica HisPrep FF16/10 (Ge-Healthcare) contenente Ni-Sepharose 6 Fast flow, ideale per la purificazione di proteine ricombinanti fuse con un tag di istidine. La colonna cromatografica è stata collegata al sistema FPLC AKTA (Amersham-Biosciences).

Il campione di proteine totali estratto dalle cellule di lievito (10 ml) è stato equilibrato con il "binding buffer" (NaPO<sub>4</sub> 20 mM pH 7.4, NaCl 500mM, Imidazolo 40mM) e caricato sulla colonna cromatografica. Dopo alcuni lavaggi con il "binding buffer", in modo da azzerare il valore di assorbanza, la proteina *His-tag* HSP70 è stata eluita dalla colonna mediante l'aggiunta del "binding buffer" a concentrazione crescente di imidazolo (40 Mm-400 mM). Sono state recuperate le diverse frazioni, ciascuna da 4 ml, e sulle frazioni in uscita dalla colonna che presentavano un picco di assorbanza è stata condotta un'analisi di SDS-PAGE e Western Blot (Figura 27). Oltre alle frazioni di proteine eluite dalla colonna cromatografia sono stati caricati

sui gel di poliacrilammide, sia per l'analisi SDS-PAGE che per il Western Blot, anche il campione grezzo non purificato (T<sub>0</sub>) ed il campione non legato alla colonna indicato con UB (Figura 27).



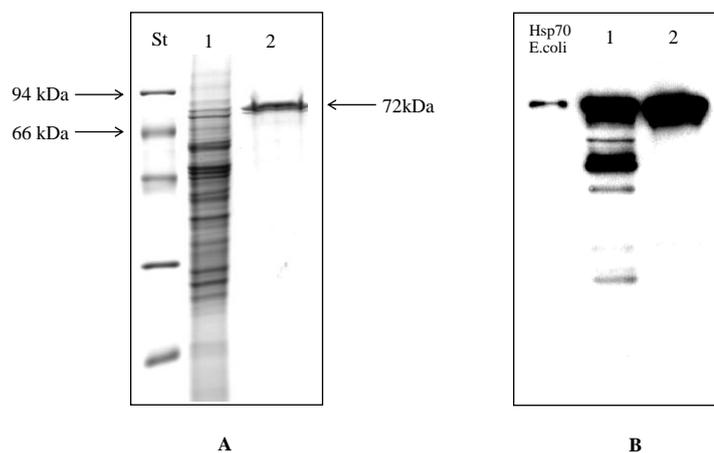
**Figura 27** (a) SDS-PAGE delle frazioni (A7-A12) ottenute dalla purificazione mediante cromatografia ad affinità effettuata utilizzando la colonna HisPrep FF16/10 (Ge-Healthcare) del lisato proteico estratto dalle cellule di lievito trasformate con il plasmide pESC-TrpHSP70His. Sul gel sono stati caricati anche i campioni T<sub>0</sub>, corrispondente al campione grezzo non purificato, e UB corrispondente al campione non legato alla matrice della colonna cromatografica. Come indicatore di peso molecolare è stato utilizzato il Low Molecular Weight Standards (Bio-Rad). (b) Analisi western blot dei campioni analizzati mediante SDS-PAGE. Come controllo positivo del western blot è stata utilizzata la proteina HSP70 prodotta in *E. coli*.

In seguito all'analisi SDS-PAGE e Western Blot delle varie frazioni recuperate dalla purificazione con cromatografia di affinità, delle proteine totali estratte dalle cellule di lievito trasformate con il plasmide pESC-TrpA4Y3His è emerso che la banda corrispondente alla HSP70 è presente in tutte le frazioni eluite dalla colonna.

Dai risultati ottenuti è emerso che questa banda non è stata l'unica ad essere rilevata e, quindi indicativa di una non perfetta purificazione della HSP70 (Figura 27).

Il grado di purezza della proteina è stato incrementato sottoponendo queste frazioni ad alcuni passaggi su una colonna cromatografica a scambio ionico costituita da una

matrice che presenta come gruppo funzionale l'ammonio quaternario (Q-TOSOH; TOSOH BIOSCIENCE) (Figura 28).



**Figura 28** SDS-PAGE del pool proteico estratto da *S. cerevisiae* mediante French Press (1) e della proteina purificata mediante cromatografia a scambio ionico (2). Come indicatore di peso molecolare è stato utilizzato il “Molecular Weight Standards” (St; Bio-Rad) (A). Western Blot dei campioni 1 e 2 analizzati mediante SDS-PAGE; come controllo positivo dell’analisi western è stata utilizzata la proteina HSP70 estratta da *E.coli* (B).

Il passaggio su colonna cromatografica a scambio ionico delle frazioni recuperate da una prima fase di purificazione mediante cromatografia per affinità, ha permesso di ottenere una proteina HSP70 con un grado di purezza quasi vicino al 100% (Figura 28).

## 5 CONCLUSIONI

Gli obiettivi di questo lavoro di tesi consistevano nell'ottenere l'over-espressione costitutiva dei geni HSP70 e la produzione su media scala della proteina HSP70, utilizzando tecnologie ricombinanti, rispettivamente, in *N. tabacum* e *S. cerevisiae*.

Dai risultati ottenuti in pianta è emerso che i geni HSP70 sono trascritti costitutivamente in *N. tabacum* e che l'espressione è avvenuta sia a livello fogliare che a livello radicale nelle piante transgeniche analizzate. I tessuti provenienti dalle piante trasformate che hanno confermato la presenza dei trascritti HSP70 potranno essere utilizzati in esperimenti di immunolocalizzazione con l'impiego di anticorpi anti-His per verificare se la proteina *His-tag* HSP70 è accumulata a livello fogliare ma soprattutto a livello radicale. Le piante che mostreranno risultato positivo potranno essere trasferite in un sistema idroponico per poter accumulare la proteina HSP70 negli essudati radicali, e semplificare quindi il recupero ed i successivi processi di purificazione.

Ottimi risultati sono stati anche ottenuti nella produzione e purificazione della *His-tag* HSP70 dalle cellule di lievito. La preparazione della proteina ricombinante potrà essere completata mediante il trattamento con la proteasi enterochinasi che consentirà la rimozione dell'*His-tag* e quindi di ottenere la proteina HSP70 priva di aminoacidi extra.

La proteina HSP70 purificata è attualmente oggetto di esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* utilizzando, rispettivamente, topi transgenici e cellule dendritiche umane per valutarne la capacità immunostimolante e la capacità di indurre la maturazione di cellule dendritiche.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- ❖ Asea A. 2007. Mechanisms of HSP72 release. *J. Biosciences* 32: 579-584.
- ❖ Asea A., Kabingu E., Stevenson M.A, Calderwood S.K. 2000. HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones* 5 (5) 425-431.
- ❖ Barta A., Sommerbruger K., Thompson D., Hartmuth K., Matzke M. A., Matzke A. J. M. 1986. The expression of a nopaline synthase- human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* 6: 347-357.
- ❖ Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S., Patersen F., Gleba Y. and Raskin I. 1999. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnology* 17: 466-469.
- ❖ Burgers P. M. and Percival K. J. 1987. Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Anal. Biochem.* 163: 391-397.
- ❖ Chu B., Zhong R., Soncin F., Stevenson M.A. And Calderwood S.K. 1998. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37°C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  and protein kinases C $\alpha$  and C $\xi$ . *J. Biol. Chem.* 273: 18640-18646.
- ❖ Daniell H., Streatfield J.S. and Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *TRENDS in Plant Science* 6: 219-226.
- ❖ Drake P.M., Chargelegue D.M., Vine N.D., van Dolleweerd C.J., Obregon P. and Ma J.K. 2003. Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Mol. Biol.* 52: 233-241.

- ❖ Ellen A.A. et al., 2002. Chaperoning signalling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J. Cell. Sci.* 115: 2809-2816.
- ❖ Ewalt K.L, Hendrick J.P, Hourli W.A, Hartl F.U. 1997. In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90: 491-500.
- ❖ Fischer R., Drossard J., Emans N., Commandeur U., Hellwig S. 1999. Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plant. *Biotechnol Appl Biochem* 30: 101-108.
- ❖ Friedberg J.N. and Walden D.B. 1999. The expression and localization of HSP 18 mRNA in *Zea mays* L. callus. *Maize Gen. Coop. Newsletter*.
- ❖ Frydman J. 2001 Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Ann Rev Biochem* 70: 603-647.
- ❖ Gehrman M., Radons J., Molls M. and Multhoff G. 2008. The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells. *Cell Stress and Chaperones* 13: 1-10.
- ❖ Gerngross T.U. 2004. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeast and filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 22 (11): 1409-1414.
- ❖ Gietz R.D. and Woods R.A. 2002. Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG. *Meth. Enzymol.* 350: 87-96.
- ❖ Goloubinoff P., Mogk A, Zvi A.P, Tomoyasu T., Bukau B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13732-13737.
- ❖ Greyson R.I, Yang Z, Bouchard R.A, Frappier J.R.H, Atkinson B.G, Banasikowska E and Walden D.B 1996. Maize seedlings show cell-specific

responses to heat shock as revealed by expression of RNA and protein. *Dev Genet* 18: 244-253.

- ❖ Habich C, Baumgart K, Kolb H, Bukart V. 2002. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol* 168: 569-576.
- ❖ Hantschel M., Pfister K., Jordan A et al., 2000. HSP70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress Chaperones* 5: 438-442.
- ❖ Hartl F.U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580.
- ❖ Hartl F.U. and Hayer-Hartl M. 2002 Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- ❖ Hemmingsen S.M. Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, et al. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334.
- ❖ Imai J., Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K. 2003. The molecular chaperone HSP90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J* 22: 3557-3567.
- ❖ Jaattela M. 1999. Heat Shock Proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 31: 261-271.
- ❖ Kiang J.G and Tsokos G.C 1998. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology. *Pharmacol Ther* 80 (2): 183-201.
- ❖ Kim S.A., Yoon J.H, Lee S.H and Ahn S.G. 2005. Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress. *J Biol Chem* 280: 12653-12657.

- ❖ Komarnytsky S., Borisjuk N., Yakoby N., Garvey A. and Raskin I. 2006. Cosecretion of Protease Inhibitor Stabilizes Antibodies Produced by Plant Roots. *Plant Physiology* 141: 1185-1193.
- ❖ Krause S.W., Gastpar R., Andreesen R., Gross C., Ullrich H., Thonigs G., Pfister K., Multhoff G. 2004. Treatments of Colon and Lung Cancer Patients with ex Vivo Heat Shock Protein 70-Peptide-Activated, Autologous Natural Killer Cells: A Clinical Phase I Trial. *Clinical Cancer Research* 10: 3699-3707.
- ❖ Krishna P. and Gloor G. 2001. The HSP90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell Stress Chaperones* 6: 238-246.
- ❖ Kumaraguru U.C.A., Gouffon J., Ivey R.A 3rd, Rouse B.T, Bruce B.D. 2003. Antigenic peptides complexed to phylogenically diverse Hsp70s induce differential immune responses. *Cell Stress Chaperones* 8 (2): 134-143.
- ❖ Ma J.K, Barros E., Bock R., Christou P., Dale P.J, Dix P.J, Fischer R *et al.* 2006. Molecular farming for new drugs and vaccines. *Embo Rep.* 6: 592-599.
- ❖ Mayer M.P. and Bukau B. 2005. HSP70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Science* 62: 670-684.
- ❖ Morimoto R.I. 2002. Dynamic remodelling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell* 110: 281-284.
- ❖ Morshauser R.C, Wang H, Flynn G.C, Zuiderweg E.R.P. 1995 The peptide-binding domain of the chaperone protein hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry* 34: 6261-6266.
- ❖ Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M. et al., 1995. A stress-inducible 72-kDa heat shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* 61: 272-279.

- ❖ Multhoff G., Pfister K., Gehrmann M., et al. 2001. A 14-mer Hsp70 peptide stimulates NK cell activity. *Cell Stress Chaperones* 6: 337-344.
- ❖ Pelham HRB 1982 A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* HSP 70 heat shock gene. *Cell* 30: 517-528.
- ❖ Pirkkala L., Nykanen P. and Sistonen L. 2001. Roles of heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB Journal* 15: 1118-1131.
- ❖ Porro D., Sauer M., Branduardi P. and Mattanovich D 2005. Recombinant Protein Production in Yeasts. *Molecular Biotechnology* 31: 245-259.
- ❖ Queitsch C., Hong S.W, Vierling E., Lindquist S. 2000 Heat stress protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492.
- ❖ Ranford C.J, Coates A.R.M, Henderson B. 2000. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Exp Rev Mol Med* 15: 1-17.
- ❖ Ranson N.A, White H.E, Saibil HR. 1998. Chaperonins. *Biochem J* 333: 233-242
- ❖ Richter L.J., Thanavala Y., Arntzen C.J. and Mason H.S. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol* 18: 1167-1171.
- ❖ Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
- ❖ Robert J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 27: 449-464.

- ❖ Roshchina V.V. and Roshchina V.D. 1993. The excretory function of higher plants. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- ❖ Rutherford S.L. and Lindquist S. 1998 HSP90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336-342.
- ❖ Sijmons P.C. Dekler B. M., Schrammeijer B., Verwoerd T. C., Van Dezelzen P. J. and Hoekema A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology* 8: 217-221.
- ❖ Srivastava P. 2002 Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunology* 20: 395-425.
- ❖ Srivastava P. K. 2008. New Job for Ancient Chaperones. *Scientific American* July 2008
- ❖ Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. 2002 Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochem Biophys Acta* 1577: 1-9.
- ❖ Tissieres A, Mitchell H.K, Tracy U 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398.
- ❖ Tobian A. A. R., Canaday D. H. and Arding C.V. 2004. Bacterial Heat Shock Proteins Enhance Class II MCH Antigen Processing and Presentation of Chaperoned Peptides to CD4<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology* 173: 5130-5137.
- ❖ Tsan M. F. and Gao B. 2004. Cytokine function of heat shock protein. *Am J Physiol* 286:C739-C744.

- ❖ Wang T.F, Chang J.H, Wang C. 1993. Identification of the peptide binding domain of hsc70-18kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J Biol Chem* 268: 26049-26051.
- ❖ Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A 2004 Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS Plant Science* 9: 244-252.
- ❖ Waters E.R., Lee G.J. and Vierling E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* 47: 325-338.
- ❖ Welch W.J. and Suhan J.P. 1986. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J. Cell. Biol.* 103: 2035-2052.
- ❖ Young J.C, Moarefi I, Hartl FU. 2001. HSP90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154: 267-273.

## **RINGRAZIO**

Per la sua disponibilità la mia tutor, la prof.ssa Carla Quagliariello.

La mia “guida scientifica” la dott.ssa Rina Iannacone per la fiducia, i preziosi insegnamenti e consigli scientifici e per la sua grande disponibilità concessami durante questi anni di permanenza presso la Metapontum Agrobios.

Giancarla per la sua disponibilità, per la collaborazione ed il supporto nell’attività sperimentale nonché per il grande affetto e l’amicizia manifestata.

La dott.ssa Lucia Semeraro ed il dott. Donato Melfi per la collaborazione e la disponibilità.

Il dott. Giovanni Mita per la collaborazione durante gli esperimenti condotti presso il CNR-ISPA di Lecce.

La dott.ssa Lucia Stigliani per la grande disponibilità e l’affetto dimostratomi.

La dott.ssa Teresa Mango per la sua immensa disponibilità, l’affetto e per essermi sempre stata vicina “supportandomi, sopportandomi e trasportandomi”.

Pina, Rosalba, Olimpia e Ivana per l’affetto e l’amicizia che mi hanno dimostrato in questi anni.

Vincenzo che mi è sempre stato vicino, mi consiglia e mi sopporta con grande pazienza.



---

**Relazione finale del Collegio dei docenti  
sull'attività svolta dal Dott.ssa Nadia ARMENTANO**

L'attività sperimentale è stata svolta presso il Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare del Metapontum Agrobios sotto la guida della Dr.ssa Rina Iannacone, come tutor esterno, ed è stata dedicata allo studio dell'espressione delle proteine HSP70 in piante sottoposte a stress termici ed in organismi ricombinanti e alla loro produzione e successiva purificazione.

Le proteine HSP70 costituiscono una famiglia proteica estremamente conservata nei diversi regni e la loro espressione è fortemente influenzata da condizioni ambientali sfavorevoli. Hanno diverse funzioni biologiche tra le quali possiamo ricordare l'attività chaperonica e protettiva verso le altre proteine. È stato dimostrato che le proteine HSP70 di origine umana sono in grado di stimolare la risposta immunitaria di diversi organismi e possono essere utilizzate per curare alcune patologie tumorali e infettive. Considerando similarità di sequenza molto elevata tra le proteine HSP70 vegetali e umane è lecito ipotizzare che le HSP70 vegetali possono avere la stessa funzione di quelle umane per la cura di alcune patologie.

Il progetto di ricerca in cui è inserita l'attività sperimentale svolta dalla dott.ssa Armentano ha lo scopo di verificare la possibile azione adiuvante e immunostimolante delle HSP70 vegetali. L'attività di ricerca specifica della dottoranda ha riguardato inizialmente lo screening di diverse varietà di erba medica per verificare il livello di inducibilità delle proteine HSP70 in condizioni diverse di temperatura e di tempo di esposizione. Lo studio ha riguardato sia il livello di espressione del gene che il livello di accumulo della proteina. La dott.ssa Armentano ha avuto un ruolo prevalente nella programmazione dell'esperimento e nella realizzazione dello stesso con successiva analisi dei risultati. I risultati ottenuti sono stati presentati in forma di poster a convegni nazionali e internazionali e sono oggetto di pubblicazioni in preparazione che saranno sottoposti a riviste internazionali. Lo studio effettuato su 7 varietà di erba medica ha permesso di individuare le varietà che rispondono in maniera più accentuata agli stimoli termici e che accumulano nei loro tessuti elevati livelli di proteine HSP70 e che quindi potranno essere utilizzate come materiale vegetale per l'induzione e l'estrazione successiva di proteine HSP70.

Successivamente la dott.ssa Armentano si è occupata dell'isolamento e del successivo clonaggio del gene codificante per la forma inducibile della proteina HSP70 da cDNA di *Arabidopsis thaliana* sottoposta a stress termico. Il gene è stato clonato in vettori per l'espressione in batteri allo scopo di ottenere la proteina HSP70 da purificare e utilizzare per la produzione di anticorpi policlonali e in vettori per l'espressione in pianta da utilizzare per l'ottenimento di piante transgeniche che over-esprimono la proteina HSP70. Quest'ultima attività ha previsto l'utilizzo di promotori costitutivi (CaMV35S) per l'espressione del transgene in tutti i tessuti vegetali e l'utilizzo di un *signal peptide* che direziona il prodotto genico verso il reticolo endoplasmico e successivamente verso gli spazi intercellulari. L'utilizzo di questo approccio permette la secrezione della proteina ricombinante all'esterno dei tessuti radicali (per es. nella soluzione nutritiva in coltivazioni idroponiche). Sono state ottenute numerose piante transgeniche (tabacco, *Arabidopsis*, erba medica) in cui sia l'inserimento che l'espressione del transgene sono stati accertati sperimentalmente. I risultati relativi alla capacità effettiva delle piante transgeniche di rizo-secernere la proteina sono ancora in

fase di valutazione. A tale scopo è stato ottenuto un ulteriore costrutto genico in cui nella porzione carbossiterminale della proteina HSP70 è stata fusa la sequenza codificante per il Tag di Istidina. Le piante transgeniche che contengono questo costrutto saranno utilizzate per studiare in dettaglio la localizzazione della proteina HSP70 ricombinante mediante ibridazioni *in situ* con anticorpi anti-istidina. Questi esperimenti sono tuttora in corso.

Nell'ultimo periodo del tirocinio la dott.sa Armentano si è occupata del clonaggio del gene HSP70 di *Arabidopsis* in vettori per l'espressione in lievito. Alla sequenza codificante del gene sono state aggiunte sequenze codificanti per il tag di istidina necessario per la purificazione della proteina e sequenze specifiche per il cleavage del tag di istidina per poter ottenere la proteina HSP70 da utilizzare nei trial clinici. La proteina purificata attraverso cromatografia è in fase di valutazione per la sua capacità immunostimolante *in vivo* e per la sua capacità di favorire la maturazione di cellule dendritiche in esperimenti *ex-vivo*.

L'attività sperimentale svolta nel triennio ha previsto l'uso di molteplici tecniche di biologia molecolare e cellulare e di biochimica tra le quali estrazione di acidi nucleici (DNA e RNA) da diversi organismi (batteri, lieviti, piante), PCR, Southern blot, Northern blot, Real time PCR, isolamento geni e clonaggio (in vettori di espressione per batteri, lieviti e piante), sequenziamento, estrazione e quantizzazione di proteine (Metodo Bradford, Lowry) da batteri ricombinanti, analisi delle proteine (SDS-PAGE, Western Blot), trasformazione genetica di erba medica, purificazione di proteine attraverso tecniche cromatografiche.

Dal punto di vista tecnico la dott.sa Armentano ha acquisito una completa autonomia che le consente di affrontare con la stessa sicurezza sia tematiche tradizionali che tematiche estremamente innovative e di passare facilmente da attività di biologia molecolare ad attività di biologia cellulare o biochimiche svolgendo anche un costante lavoro di aggiornamento bibliografico. Da sottolineare, inoltre, l'entusiasmo con cui affronta l'attività scientifica. È attenta e scrupolosa nell'attività di laboratorio dimostrando un'ottima familiarità con le tecniche utilizzate. Affronta la pianificazione e l'esecuzione dell'attività scientifica con entusiasmo e competenza individuando i punti critici dell'attività sperimentale e proponendo soluzioni. La dott.sa Armentano ha dimostrato in questi anni una crescita continua della preparazione scientifica e della capacità di approfondire le tematiche affrontate.

Le attività seguite dalla dott.sa Armentano nel corso dei tre anni di dottorato di ricerca sono inserite in un progetto più ampio che vede il coinvolgimento di un gruppo di ricerca composto da circa 8 ricercatori. Ha stabilito degli ottimi rapporti sia con gli altri componenti del gruppo di ricerca sia, più in generale, con tutti i ricercatori e personale tecnico che ha consentito in questi 3 anni di dottorato un confronto continuo con gli altri ricercatori portando ad uno scambio di diverse specializzazioni e background e, quindi, ad un arricchimento reciproco.

Sulla base della relazione orale della Dottoranda e del parere fornito dal tutor interno, Prof.ssa Carla Quagliariello, il Collegio dei docenti esprime pieno apprezzamento per i risultati conseguiti nel triennio dalla Dott.ssa Armentano.

A nome del Collegio dei Docenti  
Il coordinatore del Corso di Dottorato  
  
Prof. Aldo Musacchio