

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

***Dottorato di Ricerca in
Biologia Animale (XXIII ciclo)
Settore BIO/10***

***Espressione di sistemi di
trasporto umani di
membrana plasmatica
in E.coli***

TUTOR

Dr.ssa Lorena Pochini

DOTTORANDA

Dr.ssa Linda Amelio

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof.ssa Maria Carmela Cerra

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

ABSTRACT	4
ABBREVIAZIONI	6
1 Introduzione	8
1.1 Premessa	9
1.2 Le proteine di trasporto di membrana	10
1.3 Classificazione dei sistemi di trasporto (TC)	11
1.4 Relazione fra sistemi di trasporto di membrana e patologie umane	18
1.5 Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana	19
1.6 Espressione eterologa di sistemi di trasporto di membrana	22
1.7 Espressione di sistemi di trasporto di membrana plasmatica in batteri . 23	
1.8 Cellule ospiti per l'over-espressione	25
1.9 I promotori	26
1.10 L'espressione basata sul T7	27
1.11 Ottimizzazione dell'espressione	28
1.12 Carico metabolico	29
1.13 Inclusion bodies	30
1.14 Localizzazione cellulare	31
1.15 Espressione di proteine di membrana	32
1.16 Cristallizzazione	32
2 Materiali e metodi	35
2.1 Materiali	36
2.1.1 Brodo LB	36
2.1.2 Brodo YT 2X	36

2.1.3 TAE 50X.....	36
2.1.4 TE.....	37
2.1.5 IPTG	37
2.2 Procedure Sperimentali.	37
2.2.1 Elettroforesi su gel di agarosio	37
2.2.2 Purificazione dei frammenti di DNA da gel d'agarosio	38
2.2.3 Purificazione dei frammenti di DNA dopo digestione con enzimi di restrizione	39
2.2.4 Determinazione ed analisi di sequenze nucleotidiche secondo il metodo di Sanger modificato	40
2.2.5 Clonaggio del cDNA codificante per hOCTN1.....	41
2.2.6 Clonaggio della proteina hOCTN2	42
2.2.7 Digestione del cDNA di OCTN1 con BamHI.....	43
2.2.8 Digestione del pET-28a(+) con BamHI.	43
2.2.9 Digestione del cDNA di OCTN1 con Not I	44
2.2.10 Digestione del pET-28a(+) con Not I	44
2.2.11 Digestione del cDNA di OCTN1	45
2.2.12 Digestione del pH6EX3.....	45
2.2.13 Digestione del cDNA di OCTN2	46
2.2.14 Digestione del pET-41a(+).....	46
2.2.15 Digestione del cDNA di OCTN2	47
2.2.16 Digestione del vettore pET 21a(+).....	48
2.2.17 Trattamento del vettore con Fosfatasi Alcalina.....	49
2.2.18 Ligation.....	50
2.2.19 Cellule competenti.....	51
2.2.20 Trasformazione	51

2.2.21 Estrazione del DNA mediante il kit QIAprep Spin Miniprep.....	52
2.2.22 Trasformazione di cellule <i>E.coli</i> Rosetta DE3 con i plasmidi ricombinante.....	52
2.2.23 Espressione della proteina ricombinante hOCTN1.....	53
2.2.24 Espressione della proteina ricombinante hOCTN2-GST.....	54
2.2.25 Espressione della proteina ricombinante hOCTN2(R2K).....	55
2.3 Metodologie Biochimiche.....	56
2.3.1 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide in SDS.....	56
2.3.2 Western blotting ed immunodecorazione.....	57
2.3.3 Purificazione della proteina ricombinante hOCTN1.....	59
2.3.4 Purificazione della proteina ricombinante hOCTN2-GST.....	60
2.3.5 Purificazione della proteina ricombinante hOCTN2(R2K).....	60
3 Risultati.....	61
3.1 Over-espressione in <i>E.coli</i> del trasportatore hOCTN1.....	62
3.2 Solubilizzazione e purificazione del trasportatore over-espresso hOCTN1.....	65
3.3 Over-espressione in <i>E.coli</i> del costrutto GST-hOCTN2.....	70
3.4 Purificazione della proteina over-espressa GST-hOCTN2.....	72
3.5 Trattamento con la trombina e separazione di hOCTN2.....	73
3.6 Over-espressione e purificazione di hOCTN2(R2K).....	74
4 Conclusioni.....	77
5 Bibliografia.....	83
6 Pubblicazioni.....	92

ABSTRACT

In this work we studied the bacterial over-expression of two human transporters belonging the Organi Cation Trasportr Novel (OCTN) protein family.

This family includes the mammalian plasma membrane transporters OCTN1, OCTN2 and OCTN3, which share more than 66 % identity with each other. Defects of OCTN1 and OCTN2 are associated with the Crohn disease and the primary carnitine deficiency, respectively. The molecular and functional studies of these transport systems are hampered by the difficulties in bacterial over-expression and solubilization. Thus, the transporters have been functionally characterized in cell systems like oocytes expressing the protein at low level (Lahjouji et al 2001; Tamai et al 1997) or in proteoliposomes reconstituted with the protein extracted from kidney cells (Pochini et al 2004). On the one hand the OCTN2 has been well characterized. On the other hand many discrepancies about the function of OCTN1 have been reported (Lahjouji et al 2001; Tamai et al 1997; Yabuuchi et al 1999). OCTN2 catalyzes a sodium-dependent antiport of carnitine with itself or carnitine derivatives. It was found that some drugs, such as omeprazole, can interact with the transporter (Pochini et al 2009). However, so far, no examples of strategies of large scale over-expression and/or purification of these proteins have been reported and, hence, no structural data are available. Here, the first successful procedures for the large scale over-expression and purification of the transporters are described. The hOCTN1 cDNA, previous obtained from primary human fibroblasts, was cloned in different plasmids, and the best over-expression was obtained with the pH6EX3 in RosettaGami2(DE3)pLysS strain. The expressed protein results as a 6-His tagged protein. Also the hOCTN2 cDNA was cloned in several plasmids but the recombinant protein was obtained only using pET41 in E.coli

Rosetta(DE3)pLysS. By this strategy, the OCTN2 was expressed as GST-6His tagged protein. The over-expressed OCTN1 and OCTN2 had an apparent molecular mass of 58 kDa and 87 kDa, respectively, calculated on the basis of SDS-page, and were both collected in the insoluble fraction. For purification strategy, the two over-expressed transporters were washed with a buffer containing sarkosyl and urea and applied on different Ni²⁺-chelating chromatography columns. The protein OCTN1 was eluted with a buffer containing 50 mM imidazole and 0.1 % Triton X-100, in quantity of 3 mg per litre of cell culture, and then incubated with -mercaptoethanol, to strongly reduce the disulphide bonds; by this way, a different migration on SDS-page to exact molecular weight was observed. The protein OCTN2, previous to be applied on a chromatography column, was treated with DTE and then eluted in the same buffer used for OCTN1 but at different pH. About 0.2 mg of protein per liter of cell culture were obtained. OCTN2 was then, incubated with thrombin 0.1U/l at 25°C and after 4 hours we observed the separation of hOCTN2 and GST fusion tag on SDS-page.

ABBREVIAZIONI

Arg: Arginina

ATP: Adenosina Trifosfato

BSA: albumina di siero bovino

cDNA: DNA complementare

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

CIAP: Fosfatasi alcalina di intestino di vitello

D.O.: densità ottica

DAB: Diamminobenzidina

DDM: n-Dodecyl β -D-maltoside

ddNTP: 2', 3' -dideossinucleotide 5' - trifosfato

DNA: Acido deossinucleico

dNTP: Deossinucleotide trifosfato

DTT: ditionitritolo

E. Coli: Escherichia Coli

EDTA: acido etilendiamminotetracetico

IPTG: isopropil- β -D-tiogalattopiranoside

Lys: Lisina

Lys: Lisogeno

OCTN: Nuovo trasportatore di cationi organici

PCR: reazione di polimerizzazione a catena

rRNA: Acido Ribonucleico Ribosomiale

SDS: dodecilsolfato di sodio

SDS Page: Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

T7RNAP: RNA Polimerasi derivante dal fago □ T7

TAE: Tris, Acido acetico, EDTA

TE: Tris, EDTA

TEMED: Tetrametiletildiammina

TRIS: triidrossimetilamminometano

1. Introduzione

1.1 Premessa.

La cellula è l'unità fondamentale di tutti gli organismi viventi. Ogni cellula può essere definita come un'entità chiusa ed autosufficiente, in grado di assumere nutrienti e svolgere funzioni specializzate. Sia nelle cellule più semplici (procarioti), che in quelle più complesse (eucarioti), esiste una delimitazione dello spazio che separa l'ambiente esterno, la membrana plasmatica in cui è possibile far avvenire processi biochimici. Nella cellula procariota (pro: prima e kàryon: nucleo), la membrana separa l'ambiente esterno da quello interno in cui sono contenute le macromolecole e il materiale informativo. Nella cellula eucariotica invece, è presente non solo la membrana plasmatica, ma anche una compartimentalizzazione degli spazi interni che permette di separare il materiale informativo (nucleo), dalla sede di metabolismi specializzati per la produzione di energia (mitocondri) e dalla sede di costruzione di proteine complesse (reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi). La membrana plasmatica impedisce dunque la penetrazione di materiale indesiderato all'interno della cellula che andrebbe ad alterare l'omeostasi interna. È ovvio che, la compartimentalizzazione cellulare ha aumentato, nel corso dell'evoluzione, la complessità del sistema, rendendo sempre più importante la comunicazione tra l'interno e l'esterno e tra i compartimenti stessi. Per questo motivo si sono evoluti sistemi di trasporto di sostanze organiche e inorganiche che permettono la comunicazione tra i vari compartimenti intracellulari e l'esterno.

1.2 Le proteine di trasporto di membrana

Il passaggio di molecole specifiche a livello cellulare, è possibile grazie alla presenza di sistemi di trasporto, costituiti da proteine integrali di membrana, presenti in tutte le membrane biologiche. Questi sistemi di trasporto, hanno il compito di rendere selettivamente permeabile la membrana, o, in alcuni casi permettono la comunicazione tra due ambienti cellulari, o modulano la velocità di ingresso e di uscita di vari metaboliti. Questo permette lo svolgimento di particolari reazioni metaboliche, il cui fattore limitante è rappresentato dai livelli di substrato all'interno del compartimento, sede della reazione. Sono note diverse forme di regolazione dei trasportatori. Un esempio è dato dai trasportatori di sostanze nutrienti espressi sulla membrana luminale delle cellule intestinali e delle cellule dei tubuli renali. Queste proteine sono, per questo motivo, direttamente esposte ad un ambiente caratterizzato da grandi fluttuazioni dei livelli di nutrienti che entrano nel lume. Alcuni di questi trasportatori sono regolati negativamente (down regulation) dagli stessi substrati introdotti con l'alimentazione (trasportatori di nutrienti quali vitamine, minerali, sali biliari), altri (sistema di cotrasporto Na⁺/glucosio, sistema di trasporto di peptidici, sistema di trasporto di acidi monocarbossilici) regolati positivamente (up regulation). Probabilmente questo tipo di regolazione ha la funzione di mantenere un adeguato assorbimento di nutrienti essenziali e di minimizzare gli effetti di nutrienti con potenziale tossicità (Diamond 1987).

L'interesse per lo studio dei sistemi di trasporto di membrana è aumentato esponenzialmente nell'ultimo decennio per tre ragioni principali: lo sviluppo di tecniche più avanzate nella sperimentazione sul trasporto di membrana; il

completamento di vari progetti genoma, che ha rivelato l'esistenza di un numero di sistemi di trasporto molto più grande di quello che si riteneva sulla base degli studi funzionali precedenti; la correlazione tra il difetto funzionale di sistemi di trasporto e malattie genetiche mono o multifattoriali.

1.3 Classificazione dei sistemi di trasporto (TC)

Quasi tutti i processi di trasporto attraverso la membrana sono mediati da proteine integrali di membrana in grado, talvolta, di funzionare in associazione a recettori extracitoplasmatici, o a proteine citoplasmatiche. Sistemi di trasporto, trasportatori, sistemi di permeasi, permeasi, carrier, traslocasi, sono tutti termini equivalenti che vengono, in generale, utilizzati per indicare proteine o complessi proteici che catalizzano trasporto attraverso una membrana biologica. Un sistema di trasporto catalizza una reazione vettoriale, a prescindere se catalizza o meno anche una reazione chimica o di trasferimento di elettroni, che guida il processo vettoriale o che dipende da esso, come accade nel caso dell'ATP sintetasi. Pertanto, tutti i sistemi di trasporto sono proteine catalitiche o complessi di proteine analoghi ad enzimi o a complessi enzimatici. Il trasporto può avvenire secondo uno di tre processi distinti ma correlati. Primo, e più semplice, è la diffusione facilitata o mediata da proteina, un processo che non è accoppiato all'energia metabolica e che, quindi, non può generare gradienti di concentrazione del substrato trasportato attraverso la membrana. Nei sistemi biologici sono stati riconosciuti due principali modelli di trasporto facilitato, quello di canale e quello di carrier. Nella diffusione facilitata tipo canale, il soluto passa da un lato all'altro della membrana attraverso un canale, o poro, costituito da porzioni idrofiliche di residui amminoacidici (per substrati idrofilici), o da porzioni idrofobiche (per substrati idrofobici), o anfipatiche (per substrati anfipatici). Le strutture di

diverse proteine canale sono state determinate utilizzando tecniche di cristallografia ai raggi X. Nella diffusione facilitata mediata da carrier si supponeva che qualche parte del trasportatore attraversasse la membrana insieme al substrato. Questa teoria è stata rivista in seguito a recenti studi di tipo strutturale e funzionale sui sistemi di trasporto. I trasportatori, solitamente, mostrano velocità di trasporto di diversi ordini di grandezza più basse rispetto a quelle dei canali. Inoltre, al contrario della maggior parte dei canali, i trasportatori mostrano specificità, e spesso stereospecificità, di substrato. Sebbene sia i canali che i trasportatori possono andare incontro a saturazione, questa è una caratteristica più comune per i trasportatori. Se alla traslocazione del soluto attraverso la membrana è accoppiato consumo di energia, allora un sistema che catalizza la diffusione facilitata può diventare un trasportatore attivo. Tale sistema è considerato come trasportatore attivo primario se, al processo, è accoppiata una fonte di energia primaria (cioè, una reazione chimica, l'assorbimento di luce, o il flusso di elettroni); viene considerato come trasportatore attivo secondario se, al processo, è accoppiata una fonte di energia secondaria, generata a spese di una fonte di energia primaria, cioè un gradiente elettrochimico di ioni, per esempio protoni o ioni sodio. I trasportatori attivi secondari possono funzionare per uniport, symport, antiport. I primi, anche noti come trasportatori di singole specie, o trasportatori di diffusione facilitata, catalizzano il trasporto di una singola specie molecolare, e il trasporto avviene indipendentemente dal movimento di altre specie molecolari. I symporter, anche chiamati cotrasportatori, catalizzano il trasporto di due o più specie molecolari nella stessa direzione. Il fatto che una singola mutazione puntiforme in un symporter possa convertire il trasportatore in un uniporter (Krupka 1994) enfatizza la distinzione superficiale fra questi due tipi di trasportatori. I trasportatori per antiport, anche chiamati controtrasportatori,

trasportatori per scambio o scambiatori, catalizzano il trasporto di una (o più) specie molecolari in scambio con un'altra. I processi di antiport possono essere suddivisi in due categorie: antiport di molecole simili e antiport di molecole del tutto diverse. Molti trasportatori per uniport e per symport catalizzano anche l'antiport soluto:soluto, talvolta a velocità che sono sostanzialmente superiori a quelle raggiunte con uniport o symport. Tra questi trasportatori alcuni catalizzano l'antiport soluto:soluto ad una velocità che supera quelle dell'uniport e del symport di tre o cinque ordini di grandezza, e l'uniport attraverso questi trasportatori ha minime o nessuna influenza fisiologica (Reithmeier 1993). Si dice che tali sistemi siano trasportatori per antiport o scambiatori obbligati. Il controtrasporto accelerato soluto:soluto è stato a lungo considerato come una caratteristica distintiva dei trasportatori. I primi studiosi di cinetica del trasporto conclusero che la sua dimostrazione escludesse la possibilità che un trasportatore funzioni attraverso un meccanismo tipo canale e suggeriva che, fra trasportatori e canali, esistono netti confini (Mawe et al 1965; Stein 1967). Successive osservazioni, sull'eventualità che certi trasportatori possano apparentemente essere convertiti in canali, in seguito a trattamento chimico (Dierks et al 1990 a, b; Brutovetsky 1994, 1996) o ad imposizione di grandi potenziali di membrana (Wallmeier et al 1992; Schwarz et al 1994), hanno condotto molti studiosi del trasporto a considerare questi confini indistinti. In realtà questi esempi rappresentano casi speciali e tendono a rinfatizzare l'importanza della distinzione dei canali dai trasportatori. Pochi trasportatori modificano i loro substrati durante il trasporto. Il sistema meglio caratterizzato è quello della fosfotransferasi batterica (PTS) che fosforila i suoi substrati utilizzando il fosfoenolpiruvato come donatore di gruppi fosfato. Gli zuccheri trasportati da questo sistema vengono pertanto rilasciati nel citosol in forma di zuccheri fosforilati. Qualsiasi processo in

cui il substrato viene modificato durante il trasporto è definito “traslocazione di gruppo”. Per quanto originariamente sia stato proposto in diverse forme da Peter Mitchell come meccanismo generale, in realtà si tratta di un evento molto limitato in natura. I trasportatori sono raggruppati (Saier 1999) sulla base di quattro criteri, ognuno dei quali corrisponde ad una delle quattro cifre che compongono il numero TC di un particolare trasportatore. Pertanto, un numero TC specifico per un trasportatore ha quattro componenti, come segue: W.X.Y.Z., dove W corrisponde al tipo di trasportatore e alla fonte di energia utilizzata per guidare il trasporto (se ve ne è una), X specifica la famiglia (o subfamiglia) di trasportatori, Y rappresenta il gruppo o subfamiglia filogenetica all’interno di una famiglia (o la famiglia in una superfamiglia) cui appartiene un particolare trasportatore, e Z delinea il substrato (i) trasportato oltre alla polarità del trasporto (cis o trans). A due proteine di trasporto qualsiasi appartenenti alla stessa subfamiglia di permeasi, che trasportano il medesimo substrato con uguale meccanismo, viene dato lo stesso numero TC, senza considerare se siano ortologhe (cioè, se sono prodotte da organismi distinti per mezzo della speciazione) o paraloghe (cioè, prodotte all’interno di uno stesso organismo per mezzo della duplicazione genica). La modalità della regolazione non è correlata alla filogenicità e, probabilmente, fu associata ai trasportatori in una fase tardiva del processo di evoluzione. La regolazione non è quindi utilizzata come parametro per la classificazione. Ad omologhi sequenziati di funzione ignota non viene normalmente assegnato un numero TC; fra questi sono inclusi anche trasportatori caratterizzati funzionalmente per i quali non sono disponibili dati di sequenza. Dovrebbe essere noto che ogni categoria di trasportatori è contraddistinta da un numero TC ad una cifra (W), ogni famiglia (o superfamiglia) da un numero TC a due cifre (W.X), ogni gruppo o subfamiglia filogenetica da un numero TC a tre cifre (W.X.Y.) e

ogni tipo di permeasi da un numero TC a quattro cifre (W.X.Y.Z). Attualmente si conoscono tredici categorie principali di trasportatori:

1. Trasportatori tipo canale. Le proteine appartenenti a questa categoria sono canali transmembrana di solito costituiti da α eliche che si estendono attraverso la membrana. I sistemi di trasporto di questo tipo catalizzano la diffusione facilitata (attraverso un processo indipendente dall'energia), consentendo il passaggio di substrato attraverso un poro transmembrana, o canale, senza evidenza di un meccanismo mediato da carrier. Le proteine canale tipo porina, presente nella membrana mitocondriale esterna, sono escluse da questa categoria e sono state collocate nella loro categoria (categoria 9). Poiché è stata risolta la struttura tridimensionale di molti peptidi e proteine che formano canali, la base strutturale della formazione del canale è ben nota.

2. Trasportatori tipo carrier o permeasi. Rientrano in questa categoria le permeasi che trasportano molecole per uniport (in cui una singola molecola viene trasportata secondo gradiente di concentrazione o elettrochimico se è carica), symport (due o più specie cotrasportate, di cui una controgradiente di concentrazione e l'altra secondo gradiente fornendo l'energia necessaria al trasporto della prima), ed antiport (due o più molecole trasportate contemporaneamente in direzione opposta, l'una contro gradiente di concentrazione, l'altra secondo gradiente in modo da avere l'energia necessaria al trasporto della prima). Dati strutturali tridimensionali sono disponibili soltanto per pochi di questi trasportatori; tra questi ci sono la lac permeasi (Abramson et al 2003), il trasportatore del glicerolo 3-P (Huang et al 2003), la traslocasi degli adenin nucleotidi mitocondriale (Pebay-Peyroula et al 2003).

3. Sistemi di trasporto attivo guidato dall'idrolisi (solitamente nell'ATP) del legame del pirofosfato. Sono inclusi in questa categoria i trasportatori che idrolizzano il legame terminale del pirofosfato nell'ATP, in un altro nucleoside trifosfato, o nel pirofosfato stesso per guidare l'ingresso attivo e/o l'estrusione di un soluto o di più soluti. La proteina di trasporto può o meno essere fosforilata in maniera transitoria, ma il substrato non è fosforilato.
4. Sistemi di trasporto PEP dipendenti. Sono inclusi in questa categoria alcuni sistemi di fosfotransferasi di zuccheri. Il prodotto della reazione è uno zucchero fosforilato citoplasmatico, derivante da uno zucchero extracellulare.
5. Sistemi di trasporto attivo dipendente da acidi carbossilici, guidato dalla decarbossilazione. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto batterici che guidano l'ingresso del soluto (ad es. ioni sodio) o l'estrusione attraverso la decarbossilazione di un substrato citoplasmatico.
6. Sistemi di trasporto attivo guidato da ossidoriduzioni (pompe). Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che guidano il trasporto di un soluto (ad es. uno ione) energizzato dal flusso di elettroni provenienti da un substrato o proteina ridotta, ad un substrato o proteina ossidata. Dati strutturali tridimensionali, disponibili per pochi di questi complessi enzimatici, hanno consentito la comprensione della struttura di queste pompe di protoni e di ioni sodio.
7. Sistemi di trasporto attivo guidato dalla luce. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che utilizzano l'energia della luce per guidare il trasporto di un soluto (ad es. uno ione).
8. Sistemi di trasporto attivo guidato meccanicamente. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che guidano direttamente il movimento di una cellula, organello, o altra struttura fisica, consentendo il flusso di ioni (o di altri soluti) attraverso la membrana secondo i loro gradienti elettrochimici.

9. Facilitatori tipo canale della membrana esterna (porine). Le proteine di questa categoria sono costituite da foglietti β transmembrana che formano barili β attraverso i quali passano i soluti. Sono stati trovati nelle membrane esterne di batteri gram-negativi, mitocondri e plastidi eucariotici. Le porine rappresentano uno specifico tipo strutturale di proteina canale e, a causa del largo numero di famiglie tipo porina, essi sono stati assegnati ad un gruppo della classificazione TC distinto dalle altre proteine canale.

10. Sistemi di trasporto attivo guidato da metiltransferasi. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che utilizzano il trasferimento di metili per guidare il trasporto. Una sola proteina è stata ben caratterizzata, la metiltetraidrometanopterina, che trasporta il sodio.

11. Le proteine di trasporto ausiliarie. Sono incluse in questa categoria le proteine che funzionano con, o sono complessate a, proteine di trasporto note. Un esempio è dato dalle proteine di fusione di membrana che facilitano il trasporto, attraverso le due membrane dell'involucro cellulare dei batteri gram-negativi, in un singolo stadio guidato dalla fonte di energia (ATP) utilizzata da un trasportatore di membrana citoplasmatica. Le proteine regolatrici, o accoppiate ad energia, che non partecipano effettivamente al trasporto, rappresentano altri possibili esempi. In alcuni casi proteine ausiliarie sono considerate parte del sistema di trasporto con cui funzionano.

12. I trasportatori di classificazione ignota. Sono permeasi che fanno parte di famiglie con modalità di trasporto o di meccanismo di accoppiamento all'energia ignoto; ma almeno un membro di ognuna di queste famiglie, funziona come trasportatore. Queste famiglie saranno classificate altrove quando il processo di trasporto e il meccanismo accoppiato all'energia saranno caratterizzati.

13. Probabili trasportatori fra i quali nessun membro appartenente alla famiglia è stato dimostrato essere un trasportatore. Probabili famiglie di proteine di trasporto sono raggruppate in questa classe e saranno classificate altrove quando la funzione del trasporto di un membro verrà dimostrata, o saranno eliminate dal sistema di classificazione TC se la funzione di trasporto proposta non sarà provata. Queste famiglie includono un membro o membri per i quali è stata ipotizzata una funzione di trasporto, ma la dimostrazione di tale funzione non è ancora definitiva. Alcune di queste famiglie sono grandi superfamiglie con centinaia di membri attualmente sequenziati, ad es. la superfamiglia maggiore di facilitatori (MFS); TC No 2.1 (Pao et al 1998) e la superfamiglia ATP binding cassette (ABC); TC No 3.1 (Saurin et al 1999). Altre sono piccole famiglie con soltanto uno o due membri attualmente sequenziati.

1.4 Relazione fra sistemi di trasporto di membrana e patologie umane

La dimostrazione dell'essenzialità dei sistemi di trasporto per la vita della cellula, e quindi di un intero organismo, è data in maniera inequivocabile dall'identificazione di patologie genetiche o acquisite, spesso gravi o addirittura incompatibili con la vita, causate da deficienze della funzione di sistemi di trasporto. Ad esempio, a livello intestinale sono stati identificati quattro sistemi di trasporto degli amminoacidi, ciascuno dotato di un'ampia specificità di substrato. Questi sistemi sono presenti anche a livello dei tubuli renali, dove sono adibiti al riassorbimento degli amminoacidi. Una mutazione che interessi il gene che codifica per un trasportatore, intestinale e renale, degli amminoacidi causa patologie piuttosto serie che vanno sotto il nome di amminoacidurie renali ed intestinali. Si conoscono dieci difetti nel trasporto degli amminoacidi: cinque di

essi (Cistinuria, Malattia di Hartnup, Imminoglicinuria, Dibasicoaminoaciduria, Dicarbossilicoamminoaciduria) mostrano difetti legati al trasporto di amminoacidi strutturalmente correlati e implicano l'esistenza di trasportatori specifici per gruppi di substrati; i restanti cinque (Ipercistinuria, Lisinuria, Istidinuria, Malassorbimento di metionina, Malassorbimento di triptofano) interessano il trasporto di un singolo amminoacido e implicano l'esistenza di sistemi di trasporto substrato-specifici (Palacin et al. 2005). Un altro esempio di patologie gravi, legate ai sistemi di trasporto, è dato da alterazioni del canale del Cl^- regolato dall'AMP ciclico, una mutazione del gene che codifica per questa proteina (CFTR) è responsabile dell'insorgenza della fibrosi cistica. Questi canali per il Cl^- sono presenti nelle membrane plasmatiche apicali delle cellule epiteliali di polmoni, ghiandole sudoripare, pancreas ed altri tessuti. Un aumento della concentrazione di cAMP stimola il trasporto di ioni Cl^- da parte di queste cellule negli individui normali, ma non negli individui affetti da fibrosi cistica che hanno una proteina CFTR difettosa. Altri esempi di patologie causate da deficienze di sistemi di trasporto sono alcune miopatie determinate da alterazioni dei geni che codificano per il trasportatore mitocondriale di carnitina (Huizing et al 1997) e per quello di membrana plasmatica OCTN2 (Wang et al 1999).

1.5 Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana

Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana si è sviluppato successivamente rispetto allo studio delle proteine solubili (buona parte degli enzimi). La ragione di ciò è connessa alla difficoltà di maneggiare un sistema di trasporto che, al contrario degli enzimi, è una proteina integrale di membrana. E' infatti necessario affrontare due tipi di problemi: il primo è correlato alla presenza nella struttura della proteina di trasporto di domini idrofobici, che rappresentano la porzione

della proteina inserita nella membrana e limitano la solubilità della proteina in acqua; il secondo è rappresentato dalla necessità di creare due compartimenti fra cui seguire il trasporto catalizzato dalla proteina. I primi studi sui sistemi di trasporto sono stati eseguiti in sistemi di membrane native, come le cellule intatte oppure gli organelli subcellulari isolati, come i mitocondri. In questi casi i due compartimenti sono rappresentati dall'ambiente nativo intracellulare, o interno all'organello, e dall'ambiente esterno artificiale. In questo tipo di sperimentazione, il trasporto viene misurato mediante l'utilizzo di molecole marcate con radioisotopi o altri sistemi che permettono di evidenziare, con elevata sensibilità, il passaggio di molecole fra i due lati della membrana, un esempio è dato dalle sonde fluorescenti (Di Virgilio et al 1989). Il principale svantaggio di questo tipo di approccio sperimentale è dato dalle interferenze determinate dalla presenza di enzimi nei compartimenti interni, i quali possono modificare le molecole trasportate, nonché dalla presenza, sulle stesse membrane, di altri sistemi di trasporto e dalla possibilità di controllare le condizioni sperimentali soltanto nell'ambiente esterno (cis) ma non in quello interno (trans). Questo tipo di studi si è evoluto più recentemente grazie a tecniche di biologia molecolare che permettono l'espressione selettiva di una proteina di trasporto eterologa all'interno di particolari cellule, come per esempio gli oociti. La proteina espressa, se raggiunge la membrana, darà un segnale di trasporto caratteristico e riconoscibile rispetto alle cellule che non la esprimono. Questa tecnica permette di studiare una specifica proteina di cui è noto il gene, tuttavia, presenta le limitazioni tipiche dei sistemi cellulari intatti. Una tecnica più recente per lo studio di sistemi di trasporto di membrana è la ricostituzione in membrane artificiali. La ricostituzione consiste nell'inserimento di proteine di trasporto in sistemi di membrana artificiali costituiti da bilayer fosfolipidici. I sistemi di membrana più largamente utilizzati a questo

scopo sono i liposomi, vescicole sferiche il cui diametro varia fra 50 e 250 nm a seconda delle tecniche usate per la preparazione. Le proteine di trasporto vengono inserite nel bilayer fosfolipidico, formando i proteoliposomi, con varie strategie che prevedono, ad esempio, l'eliminazione del detergente utilizzato per la solubilizzazione della proteina dalle membrane cellulari, oppure il Freeze-Thaw-Sonication, congelamento rapido, scongelamento lento e sonicazione (Kramer et al 1986; Palmieri et al 1995). Fra le tecniche basate sulla rimozione del detergente ricordiamo la diluizione, la dialisi, l'adsorbimento su particolari resine idrofobiche. Il trasporto viene, quindi, seguito nei proteoliposomi, analogamente a quanto detto per i sistemi cellulari, utilizzando molecole marcate con radioisotopi o sonde fluorescenti. Nei proteoliposomi è possibile studiare il trasporto in assenza di interferenze che, nel mitocondrio intatto o nelle cellule, sono causate dalla presenza di altri sistemi di trasporto, da enzimi che metabolizzano, o in generale, modificano i substrati, e da interazioni tra i sistemi di trasporto ed altre proteine. I vantaggi che il sistema ricostituito presenta sono numerosi. Ad esempio, utilizzando il metodo della ricostituzione, si ha la possibilità di controllare le condizioni sperimentali nel compartimento interno dei proteoliposomi, ciò consente di determinare l'affinità della porzione intraliposomiale della proteina per il substrato; è possibile inoltre studiare l'effetto di varie molecole su entrambi i lati dei proteoliposomi oltre che studiare il tempo di raggiungimento dell'equilibrio da parte delle molecole radioattive. Il basso rapporto proteina/lipidi (una o poche proteine per liposoma), permette una migliore risoluzione della cinetica del trasporto. Attraverso l'utilizzo di questa tecnica è anche possibile modificare la composizione lipidica della membrana dei liposomi che in molti casi influenza l'attività di trasporto delle proteine (Sharom 1997). La ricostituzione nei liposomi è una tecnica che può essere utilizzata sia

per lo studio delle proprietà funzionali di proteine di trasporto estratte dalla propria membrana nativa, sia per lo studio di proteine over-esprese, ad esempio nei batteri (Indiveri et al 1998) o nei lieviti (Kasahara et al 1996).

1.6 Espressione eterologa di sistemi di trasporto di membrana

Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana è limitato dalla necessità di ottenere membrane native in cui studiare il trasporto o di estrarre le proteine dalle membrane native per ricostituire in sistemi artificiali. Tali procedure richiedono il sacrificio di animali da laboratorio e tecniche elaborate per la purificazione delle membrane native e soprattutto per l'estrazione delle proteine da esse. Il limite principale di queste procedure si evidenzia particolarmente nel caso in cui si vogliono studiare proteine poco rappresentate nelle cellule native. In questo caso le tecniche di estrazione richiedono grandi quantità di materiale di partenza (animali) e non sempre consentono di ottenere proteine sufficientemente attive o in quantità adatte alle successive procedure di ricostituzione. La limitazione nella quantità di proteina è particolarmente svantaggiosa nei casi in cui si vogliono intraprendere studi di tipo strutturale; in questi casi è necessario disporre di grandi quantità di proteine allo stato omogeneo di purificazione. . Questi problemi possono essere risolti ricorrendo all'espressione delle proteine in sistemi cellulari eterologhi. L'espressione eterologa in batteri consente di ottenere quantità di proteine molto più grandi rispetto all'espressione in sistemi cellulari eucariotici come oociti e lieviti. Per le proteine di trasporto di membrana plasmatica, oltre ad alcuni esempi di espressione in sistemi eucariotici, vi sono soltanto pochissimi esempi di espressione eterologa in batteri. Nel caso dei sistemi eucariotici sono stati ottenuti livelli di espressione non controllati ed appena sufficienti per

studiare il trasporto nelle stesse cellule che realizzano il trasferimento delle proteine espresse in membrana plasmatica (Hruz et al 2000; Rogers et al 2003; Hosoyamada et al 2004). In questi casi il trasporto dovuto alle proteine espresse viene quantificato per sottrazione rispetto a quello misurato in cellule di controllo che non esprimono le specifiche proteine. Tali metodi non sono esenti da errori dovuti ad interferenze da parte di altri trasportatori o ad eventuali modifiche nel pattern proteico dei trasportatori endogeni di membrana che potrebbe essere alterato dall'induzione dell'espressione eterologa.

1.7 Espressione di sistemi di trasporto di membrana plasmatica in batteri

Per tutti questi motivi è importante realizzare sistemi di espressione eterologa di proteine di trasporto eucariotiche, in batteri. Sistemi di questo tipo sono stati realizzati per l'espressione di proteine di trasporto mitocondriali. Invece vi sono pochissimi esempi di espressione di sistemi eucariotici di membrana plasmatica in batteri. Un esempio è l'over-espressione del co-trasportatore umano Na⁺/glucosio (hSGLT1) in *E. coli* (Quick et al 2003). L'importanza dell'argomento si evince dal fatto che questo risultato è stato pubblicato su una rivista di notevole portata scientifica.

Per ottenere l'espressione delle proteine, il sistema cellulare d'elezione è rappresentato da *E. coli*, in cui è possibile ottenere grandi quantità di proteina. In alcuni casi, soprattutto per l'espressione di proteine eterologhe di membrana, questo potrebbe dare dei problemi causati dalla tossicità delle proteine eterologhe per il batterio e dal fatto che le proteine di membrana non sono solubili e quindi si accumulano in corpi di inclusione nei batteri. Inoltre, poiché *E. coli* non è in grado di glicosilare le proteine che produce potrebbe esserci un problema di tipo

funzionale legato alla mancanza della parte glicosidica delle proteine di membrana plasmatica eterologhe. Ma, com'è noto dalla letteratura, la N-glicosilazione per molte proteine non è indispensabile per l'attività in genere, influenza esclusivamente la migrazione verso la membrana plasmatica (Diop et al 2005; Straumann et al 2005; Tanaka et al 2004; Hayashi et al 2005). In pochissimi casi, la parte glicosidica è importante anche per l'attività; comunque, in questi casi, l'attività di trasporto non viene totalmente annullata dalla mancanza della parte glicosidica, ma soltanto ridotta (Asano et al 1991; Nunez et al 1994; Cai et al 2005; Li et al 2004).

Pertanto, nel caso in cui si vogliano esprimere proteine per le quali non si conosce il ruolo dei residui glucidici, è preferibile utilizzare come primo approccio *E. coli* che fornisce rispetto ai sistemi cellulari eucariotici quantità di proteina sensibilmente superiori e, solo nel caso in cui la proteina over-espressa non sia attiva, realizzare l'espressione in organismi superiori.

Questo approccio consente di condurre studi di mutagenesi sito diretta, in quanto permette l'espressione di proteine il cui cDNA è stato variato per ottenere mutazioni di amminoacidi e permetterebbe di valutare l'importanza e la funzione di specifici residui amminoacidici nel processo di trasporto o la loro collocazione nella struttura tridimensionale della proteina.

A causa della loro localizzazione sulla superficie delle cellule, le proteine di membrana giocano un ruolo cruciale in diverse patologie e costituiscono più della metà di tutti i target farmacologici conosciuti (Hopkins et al. 2002). Le proteine di membrana non sono molto concentrate a livello tissutale, rispetto alle proteine totali, quindi la loro estrazione non permette di avere quantità necessarie per gli studi strutturali. Per questo motivo, molte proteine sono state overesprese in *Escherichia coli*, utilizzando un tipo di espressione basata sull'utilizzo dell'RNA

del fago T7. Tuttavia la resa dell'espressione è generalmente molto bassa e spesso vengono a crearsi all'interno del batterio, i corpi di inclusione (inclusion bodies), che costituiscono un problema. Inoltre, l'overespressione di proteine estranee può provocare tossicità nella cellula ospite, causandone anche la morte.

1.8 Cellule ospiti per l'over-espressione.

L'overespressione di proteine può essere ottenuta in diversi sistemi e in diversi ospiti. L'espressione batterica, in particolare in *E.coli*, permette di avere una crescita cellulare molto rapida e permette di ottenere grandi quantità di prodotto over-espresso. Anche l'overespressione in alcuni lieviti come *Saccharomyces cerevisiae* o in *Pichia pastoris* è relativamente facile da ottenere ma, la spessa parete cellulare di questi organismi, rende la lisi cellulare più difficile. Tuttavia, essendo questi organismi eucarioti, è possibile ottenere modificazioni post-trasduzionali, anche se non corrispondenti alle modificazioni dei mammiferi. D'altro canto, utilizzare cellule di mammifero per l'overespressione è molto costoso e inoltre i protocolli sperimentali sono più complessi. Recentemente, sono stati messi a punto protocolli di espressione cell-free (Jermutus et al. 1998), che prevedono l'utilizzo di lisati cellulari contenenti tutti i precursori della sintesi proteica batterica. Tuttavia questa tecnica è stata utilizzata soltanto in pochi casi.

Tra tutti gli organismi elencati, *E.coli* è quello che meglio si presta per l'overespressione di proteine ricombinanti e per studi di genomica strutturale (Graslund et al. 2008). Solitamente, le proteine ricombinanti vengono espresse utilizzando vettori di espressione aventi origine di replicazione derivante da ColE1. L'espressione dei plasmidi e il loro mantenimento sono resi stabili dall'uso di marker per la resistenza agli antibiotici (Baneyx et al. 1999).

I ceppi batterici maggiormente utilizzati per l'overespressione di proteine, derivano dal ceppo BL21. Circa dieci anni fa sono stati isolati due nuovi ceppi cellulari chiamati C41(DE3) e C43(DE3) o anche Ceppi di Walker. Questi sono stati isolati per la loro capacità di far fronte alla tossicità dell'overespressione (Miroux et al. 1996) e permettono inoltre, una migliore espressione di proteine di membrana, dando un'alta stabilità ai plasmidi. Rispetto alle comuni BL21, i ceppi di Walker possono indurre una proliferazione della membrana interna in modo tale da poter contenere le grandi quantità di proteine che vengono overesprese (Dumon-Seignovert et al. 2004).

1.9 I promotori.

In *E.coli* i promotori sono localizzati 10-100 paia di basi a monte rispetto al sito di legame dei ribosomi e solitamente sono sotto il controllo di proteine di regolazione i cui geni sono contenuti nel cromosoma batterico o nel plasmide stesso. I promotori di *E.coli*, sono costituiti da due regioni: una composta da due sequenze esanucleotidiche di 35 paia di basi e una composta da 10 paia di basi a monte del sito di inizio della trascrizione. Le due regioni sono separate tra loro da 16-18 nucleotidi e possono essere integrati da altri elementi che aumentano la trascrizione (Makrides et al. 1996). A valle del promotore, all' interno del sito di legame del ribosoma c'è un'ulteriore sequenza detta Sequenza di Shine-Dalgarno, complementare all'estremità 3' dell'rRNA 16S. Questa sequenza è posta 4-14 paia di basi a monte rispetto al codone di inizio della traduzione (Ringquist et al. 1992). Un promotore utile per l'overespressione deve essere forte e regolabile, deve avere un livello di espressione basale molto basso e deve essere facilmente inducibile. Un'espressione basale può compromettere la crescita, la stabilità del plasmide e la produzione della proteina stessa. Inoltre l'induzione può essere sia

chimica, mediante l'aggiunta di sostanze, o termica, variando la temperatura di coltura (Makrides et al. 1996). Per l'overespressione delle proteine sono stati utilizzati molti tipi di promotori. I più comuni sono quelli che derivano da operoni che utilizzano gli zuccheri, come quelli del lattosio, arabinosio e ramnosio. Tutti questi promotori sono soggetti a repressione da cataboliti, pertanto la trascrizione può essere repressa mediante l'aggiunta di glucosio. L'assenza di questo zucchero, determina l'aumento dei livelli di cAMP che legato ai repressori, attiva la trascrizione e stabilizza il complesso della RNA-polimerasi (Kolb et al. 1993). Nel caso del promotore lac il legame dell'allolattosio o dell'analogo non idrolizzabile IPTG al repressore, produce cambi conformazionali nel repressore che ne determinano il rilascio (Lewis et al. 1996). Il promotore araBAD, invece, è inducibile attraverso l'arabinosio e viene utilizzato per avere una regolazione in presenza di glucosio (Guzman et al. 1995). Tuttavia il promotore araBAD non è molto forte e l'utilizzo dell'arabinosio può dare un fenotipo di espressione "tutto o nulla" (Siegele et al. 1997).

1.10 L'espressione basata sul T7.

L'espressione basata sulla RNA polimerasi T7 è l'approccio maggiormente utilizzato per la produzione di proteine ricombinanti. La T7RNAP riconosce una sequenza del promotore molto lunga che normalmente non si verifica in *E.coli* (Studier et al. 1986). Le proteine ricombinanti sono di solito espresse mediante i vettori pET, in cui il cDNA è posizionato a valle del promotore T7lac e la trascrizione è possibile mediante l'aggiunta di IPTG (Dubendorff et al. 1991). Nel ceppo cellulare *E.coli* BL21(DE3) la T7RNAP è espressa dal λ -lisogeno DE3 e la sua espressione è sotto il controllo del promotore IPTG-inducibile (Jack et al. 1996; Wycuff et al. 2000). Utilizzando questo promotore, si può andare incontro

alla perdita del promotore stesso e della proteina ricombinante, soprattutto nel caso in cui la proteina risulta essere tossica per il batterio (Moffatt et al. 1987). In questo caso, la co-espressione del T7Lys viene usata per consentire la trasformazione delle cellule ospiti con il vettore codificante per la proteina tossica in esame (Studier et al. 1991).

1.11 Ottimizzazione dell'espressione.

È noto che una diminuzione della temperatura di espressione ha effetti benefici sull'espressione di proteine ricombinanti, sul folding, sulla solubilità e sulla produzione delle proteine di membrana. A temperature comprese fra 15° e 30°C, infatti, il batterio compensa l'abbassamento della temperatura esterna inducendo pathways metabolici diversi rispetto a quelli attivi in condizioni normali; ciò determina un cambiamento nei costituenti cellulari, come ad esempio il rapporto tra acidi grassi saturi e acidi grassi non saturi nella membrana plasmatica, con conseguente aumento della fluidità della membrana stessa (Zhang et al. 2008).

L'overespressione può essere anche modulata variando la composizione del mezzo di coltura, utilizzando brodi molto ricchi, come il Terrific, che permette una crescita batterica ad alte densità. Tuttavia non è detto che un aumento della densità della coltura determini un aumento della produzione della proteina. Questo può essere ottenuto, in alcuni casi, introducendo all'interno del mezzo di coltura, un ligando della proteina espressa (Weiss et al. 2002). Alcuni studi di overespressione, sono stati condotti utilizzando il metodo dell'autoinduzione, che permette di effettuare una graduale induzione dell'espressione proteica, in modo tale che la cellula batterica possa adattarsi alle nuove esigenze metaboliche (Studier et al. 2005).

1.12 Carico metabolico.

Il mantenimento di un gran numero di copie del plasmide, determina all'interno della cellula ospite, un grande stress (Hoffmann et al. 2004). L'overespressione di proteine target mediante il promotore T7 crea un notevole aumento del carico metabolico all'interno della cellula. È noto, infatti che la T7RNAP trascrive il DNA 8 volte più velocemente rispetto all'RNA polimerasi di *E.coli* (Iost et al 1992). Per carico metabolico si intende la differenza tra il tasso di crescita tra cellule "esprimenti" e cellule "non esprimenti", ed è definito come la quantità di risorse della cellula ospite per il mantenimento e l'espressione del DNA e delle proteine straniere (Bentley et al. 1990). La sintesi proteica è un processo che richiede molta energia e, per ottenere questo aumento di energia, la cellula ospite regola il proprio catabolismo e anabolismo, incrementando la glicolisi e il ciclo degli acidi tricarbossilici, regolando l'espressione e l'attività degli enzimi coinvolti in queste vie metaboliche (Weber et al. 2002; Hoffmann et al. 2002). Questo incremento delle vie che portano alla produzione di energia, sono accoppiate alla diminuzione dei precursori per la formazione della biomassa (Weber et al. 2002). In condizioni normali, le componenti per la produzione di proteine, come per esempio i ribosomi, vengono prodotti a seconda delle necessità della cellula. Durante l'overespressione, invece, questo equilibrio viene perturbato e le componenti non sono sufficienti (Hoffmann et al. 2002). La produzione di proteine ricombinanti, determina una diminuzione degli amminoacidi e un'induzione di una rapida risposta della cellula ospite, mediante una riprogrammazione dell'espressione dei geni, inducendo una diminuzione dell'espressione dei geni utili per la sintesi proteica (Chang et al. 2002). Un altro problema relativo all'espressione di proteine ricombinanti mediante il promotore

T7 è dato dalla sincronizzazione della trascrizione e traduzione. La T7RNAP non accoppia questi due processi e ciò determina un accumulo di RNA liberi che possono essere facilmente degradati (Iost et al 1995). Questo può essere ovviato utilizzando dei mutanti di polimerasi che trascrivono tre volte più lentamente, ma che permettono di ottenere una maggiore resa della proteina ricombinante (Makarova et al. 1995).

1.13 Inclusion bodies.

L'overespressione di proteine determina una diminuzione dei meccanismi di folding all'interno della cellula ospite. Ciò può determinare un accumulo di proteine nascenti sotto forma di corpi di inclusione e un'induzione della sintesi di proteine heat-shock. In particolare, le proteine eucariotiche sono inclini ad un non corretto folding poiché possiedono delle strutture terziarie e quaternarie complesse e richiedono la formazione di ponti disolfuro e altre modificazioni post-trasduzionali per arrivare alla loro conformazione nativa, biologicamente attiva (Baneyx et al 2004). La formazione di corpi di inclusione è correlata con alcune caratteristiche della proteina nascente, quali la carica elettrica media e i residui amminoacidici di cui essa è composta (Wilkinson et al. 1991). I corpi di inclusione possono accumularsi sia nel citoplasma che nel periplasma e sono composti da 80-95% di proteina aggregata, contaminati da proteine di membrana esterna, componenti dei ribosomi, fosfolipidi e acidi nucleici (Valax et al. 1993), oltre che in minima parte da proteine chaperone come DnaK e GroEL (Allen et al. 1992, Carrio et al. 2002, Carrio et al. 2005). I corpi di inclusione sono strutture porose che appaiono amorfe se osservate al microscopio elettronico. Recentemente è stato visto che i corpi di inclusione hanno proprietà simili alla proteina amiloide con un alto numero di organizzazioni intermolecolari a foglietto

β (Carrio et al. 2005). I corpi di inclusione sono molto resistenti alla proteolisi e contengono materiale relativamente puro; questo tipo di formazione viene sfruttata nel caso in cui si voglia esprimere proteine tossiche per la cellula ospite, instabili o che si ripiegano facilmente (Baneyx et al. 2004). È stato osservato che i corpi di inclusione, possono contenere anche proteine correttamente foldate nella loro conformazione nativa e biologicamente attive (Ventura et al. 2006). È possibile prevenire la formazione dei corpi di inclusione utilizzando promotori meno forti, basse concentrazioni di induttori o basse temperature di espressione (Baneyx et al. 2004). Un altro stratagemma per minimizzare la formazione di tali corpi è quello di ingegnerizzare le proteine target o far crescere le cellule in presenza di osmoliti come il sorbitolo e la betaina, alterando il pH del mezzo di coltura e utilizzando dei partner di fusione (Makrides et al. 1996). Per quanto riguarda invece, il folding delle proteine neo-sintetizzate, è possibile tentare una co-espressione con chaperone come GroEL e DnaK, come dimostrato da Wang e colleghi (Chen et al. 2003).

1.14 Localizzazione cellulare.

Le proteine overesprese in batteri possono essere dirette in cinque compartimenti cellulari: il citoplasma, la membrana interna, il periplasma, la parete cellulare e nel mezzo di coltura. L'overespressione all'interno del citoplasma non è adatta a tutte le proteine ricombinanti. Infatti, alcune proteine eucariotiche, necessitano della formazione di ponti disolfuro, che non possono essere formati nell'ambiente riducente del citoplasma batterico. Questo problema può essere superato utilizzando ceppi batterici mutanti per la tioredoxina reduttasi (trxB) che creano un ambiente più ossidante all'interno del citoplasma (Derma net al. 1993) oppure veicolando la proteina nel periplasma, dove la formazione dei ponti disolfuro è

maggiormente favorita. Le proteine ricombinanti possono essere veicolate anche nel mezzo di coltura; ciò permette una purificazione molto semplice e inoltre una volta secrete, queste sono meno soggette alla proteolisi. Lo svantaggio di questa tecnica è dato dalla forte diluizione che la proteina subisce (Makrides et al. 1996).

1.15 Espressione di proteine di membrana.

Attualmente ci sono solo pochi esempi di overespressione di proteine di membrana in batteri (Kiefer et al. 2003; Bane et al. 2007). La difficoltà nell'overespressione di proteine di membrana, riguarda le caratteristiche della loro sequenza amminoacidica. Si possono, infatti, incontrare molte difficoltà legate ad esempio, alla grandezza della proteina, all'idrofobicità e al numero delle eliche presenti nella struttura e all'utilizzo di specifici codoni eucariotici da parte del batterio (Daley et al. 2005). Per superare quest'ultimo problema vengono utilizzate due strategie: l'ottimizzazione dei codoni della proteina target oppure l'utilizzo di ceppi cellulari che coesprimono tRNA rari per il batterio.

1.16 Cristallizzazione.

Le proteine, come molte molecole, possono formare cristalli subendo una lenta precipitazione da una soluzione acquosa e disponendosi con un preciso orientamento. Il reticolo di cristalli che si forma è tenuto insieme da interazioni non covalenti (Rhodes, 1993); ciò è importante in quanto in questo modo è possibile ottenere, mediante diffrazione dei raggi X, la struttura tridimensionale della proteina. Nel 1934, Bernal e Hodgkin scoprirono che, proteine solvate davano una risposta di diffrazione migliore rispetto alle proteine essiccate. Venne, così, ottenuta la prima struttura tridimensionale di una proteina globulare, la pepsina, utilizzando una metodica che prevedeva un sistema idratato (Tulinsky,

1999). Quando nel 1971 venne fondata la Protein Data Bank, solo sette cristalli di proteine erano presenti (Berman, et al., 2000), in quanto questa tecnica presentava molti limiti esecutivi. Da allora, il numero delle strutture delle proteine scoperte è cresciuto esponenzialmente, e attualmente sono contenute oltre 65000 strutture.

Con la cristallizzazione si ottiene un cristallo ben ordinato privo di contaminazioni e grande abbastanza per fornire un modello di diffrazione quando viene colpito dai raggi X. Tuttavia, la cristallizzazione di una proteina è di per sé difficile, a causa della natura fragile dei cristalli stessi. Le proteine hanno una superficie irregolare che può portare alla formazione di un largo canale durante la fase di cristallizzazione, pertanto, i legami non covalenti che tengono la proteina adesa alla matrice vengono stabilizzati da diversi strati di molecole solventi. (Rhodes, 1993). Inoltre superata la fragilità intrinseca dei cristalli, la produzione di questi dipende da una serie di fattori ambientali. Ogni singola proteina, infatti, necessita la messa a punto di uno specifico protocollo di cristallizzazione. Tra i fattori che possono compromettere la buona riuscita della cristallizzazione, oltre alla purezza della proteina stessa, che di solito deve essere pari o superiore al 97%, anche il pH gioca un ruolo importante, in quanto a diversi valori di pH la proteina può assumere orientamenti diversi. Altri parametri importanti sono la concentrazione della proteina in esame, la temperatura, le condizioni di precipitazione e i composti che promuovono la precipitazione quali solfato di ammonio e polietilenglicole. (Branden et al 1999; Rhodes 1993).

Uno dei metodi più usati nella cristallizzazione prevede la diffusione del vapore in cui una goccia contenente la proteina purificata, il tampone e l'agente che permette la precipitazione viene immessa in un recipiente contenente gli stessi tamponi ma a concentrazioni elevate di agenti che favoriscono la precipitazione.

In questo modo, l'acqua contenuta nella goccia evapora, e la proteina viene a trovarsi in una soluzione ad alta concentrazione di agenti precipitanti (Rhodes, 1993; McRee, 1993). Poiché uno degli svantaggi della cristallizzazione è la messa a punto del protocollo specifico per ogni proteina, attualmente sono presenti in commercio numerosi kit contenenti sistemi preassemblati che permettono di ottenere una cristallizzazione efficace. Inoltre è possibile utilizzare sistemi informatizzati, che permettono di azzerare i tempi di esecuzione del processo lavorando in modo efficiente e preciso.

In questo modo è possibile fare numerosi tentativi di cristallizzazione a basso costo ed in tempi molto più veloci.

2. Materiali e

Metodi

2.1 Matreiali

2.1.1 Brodo LB

5 grammi di estratto di lievito.

10 grammi di triptone.

5 grammi di NaCl.

Le sostanze vengono sciolte in circa 950 ml di H₂O distillata, portate a pH compreso tra 7.4 e 7.5 con una soluzione di NaOH (1M) e infine ad un volume finale di 1 litro.

2.1.2 Brodo YT 2X

10 grammi di estratto di lievito.

16 grammi di triptone.

5 grammi di NaCl.

Le sostanze vengono sciolte in circa 950 ml di H₂O distillata, portate a pH compreso tra 7.4 e 7.5 con una soluzione di NaOH (1M) e infine ad un volume finale di 1 litro.

2.1.3 TAE 50X

242 grammi di Tris.

18.6 grammi di EDTA sciolti in H₂O distillata, portati a pH 8 e ad un volume finale di 200ml.

60 ml di Acido Acetico Glaciale.

La soluzione viene portata ad un volume finale di 1 litro e a pH 8 con Acido Acetico.

2.1.4 TE.

Tris 10mM

EDTA 1 mM

Il pH finale della soluzione deve essere compreso tra 7.5 e 8.

2.1.5 IPTG

L' IPTG (isopropil- β -D-tiogalattopiranoside) viene utilizzato ad una concentrazione che varia da 0.1 mM a 1 mM.

2.2 Procedure Sperimentali.

2.2.1 Elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti amplificati con le reazioni di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. La concentrazione dell'agarosio è stata opportunamente scelta in base alla lunghezza dei frammenti di DNA sintetizzati (0.8-1.5%).

Per la preparazione del gel e come tampone per la corsa elettroforetica, è stata impiegata una soluzione di TAE 1X.

Per evidenziare le molecole di DNA è stato aggiunto Etidio Bromuro alla concentrazione finale di 0.5 μ g/ml. L' Etidio Bromuro si intercala tra le coppie di basi del DNA rendendolo fluorescente se esposto alla luce ultravioletta. Sul gel di

agarosio viene caricata anche una miscela di frammenti di DNA aventi lunghezze e concentrazioni note (markers): confrontando la loro posizione sul gel, al termine della corsa elettroforetica, con quella dei frammenti prodotti mediante PCR, è possibile conoscere la grandezza di questi ultimi, generalmente espressa in bp (paia di basi).

2.2.2 Purificazione dei frammenti di DNA da gel d'agarosio

I frammenti di DNA separati mediante elettroforesi su gel di agarosio, sono stati purificati tramite il "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" della Promega.

Questo sistema è basato sulla capacità del DNA di legarsi a una membrana di silice in presenza di sali caotropici.

Dopo la corsa elettroforetica in TAE buffer, è stata tagliata una fetta di gel, contenente il frammento da purificare, è stata pesata e sono stati aggiunti, 10 µl di "Membrane Binding Solution"* (in dotazione del Kit) per ogni 10 mg di frammento di agarosio.

La miscela è stata incubata a 65°C per 10 minuti: il riscaldamento permette la completa fusione dell'agarosio. Successivamente la miscela è stata trasferita su una colonna costituita da una membrana di silice. Dopo l'incubazione di 1 minuto a temperatura ambiente, durante il quale il DNA aderisce alla resina la miscela è stata centrifugata per 1 minuto a 16000 x g e successivamente è stata lavata due volte con una soluzione contenente etanolo. Infine, per permettere il distacco del DNA dalla resina, sono stati aggiunti 30 µl di acqua.

La "Membrane Binding Solution" contiene:

Guanidinio isotiocianato 4.5 M;

Acetato di potassio 0.5 M.

2.2.3 Purificazione dei frammenti di DNA dopo digestione con enzimi di restrizione

Il cDNA di OCTN1 e il vettore pET-28a(+) digeriti con gli enzimi di restrizione BamHI e NotI sono stati purificati con il kit “*Jetquick Spin Column Technique*” della Genomed.

Questo sistema è basato sulla capacità del DNA di legarsi a una membrana di silice in presenza di sali caotropici.

Sono stati aggiunti 400 µl di soluzione H1 (in dotazione col kit) per ogni 100 µl di prodotto di digestione e, la miscela è stata trasferita su una colonna costituita da una membrana di silice su cui aderirà il DNA durante il minuto di incubazione. A questo punto si centrifuga per 1 minuto a 16000 x g e si procede a un lavaggio con la soluzione H2 contenente etanolo. Si centrifuga due volte per eliminare i residui di etanolo e si eluisce con 30 µl di acqua il cDNA di OCTN1 e con 20 µl di acqua il vettore pET-28a(+) per permettere il distacco del DNA dalla resina.

La soluzione H1 contiene:

guanidinio idrocloruro;

EDTA;

Tris/HCl;

isopropanolo.

La soluzione H2 contiene:

Etanolo;

NaCl;

EDTA;

Tris/HCl.

2.2.4 Determinazione ed analisi di sequenze nucleotidiche secondo il metodo di Sanger modificato

Con il metodo di Sanger modificato il filamento di DNA da sequenziare, detto filamento stampo, viene copiato utilizzando una DNA-polimerasi che agisce incorporando, nella catena di DNA in allungamento, deossinucleotidi trifosfati (dNTPs).

La sintesi del nuovo filamento di DNA comincia a partire da un primer oligonucleotidico che riconosce in maniera specifica una determinata sequenza di basi sullo stampo. La presenza in piccola quantità di un 2', 3' -dideossinucleotide 5'- trifosfato (ddNTP) nella miscela dei quattro nucleotidi porterà alla sua casuale incorporazione nella catena di DNA in allungamento.

Una volta incorporato nella catena, il ddNTP porterà alla terminazione l'estensione in quanto il filamento neosintetizzato risulterà privo dell'ossidrile in 3' del dideossinucleotide, necessario alla formazione del legame fosfodiesterico con il successivo nucleotide. Inoltre, i dideossinucleotidi utilizzati per il sequenziamento dei campioni di DNA, sono marcati con fluorescenza.

Per ogni reazione è stata calcolata la concentrazione ottimale di DNA ed è stato seguito il seguente protocollo:

0.2-1 µg DNA;

3.2 picomoli primer;

4 µl *big dye solution* *;

H₂O fino ad un volume finale di 20 µl.

Big dye solution * è una miscela di reazione costituita da :

Enzima Taq polimerasi ;

miscela di nucleotidi fluorescenti del “Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit ” della Applied Biosystem.

Sono stati eseguiti 25 cicli nelle seguenti condizioni:

Denaturation	96°C	10 secondi
Annealing	50°C	5 secondi
Extension	72°C	4 minuti

2.2.5 Clonaggio del cDNA codificante per hOCTN1

L'RNA totale è stato isolato da fibroblasti umani in coltura e in seguito retrotrascritto. Il cDNA codificante per hOCTN1 ha una grandezza di circa 1656 bp ed è stato amplificato usando i primer forward e reverse sotto riportati:

5'-ATGCGGGACTACGACGAGGTGATCG-3'

5'-TCAGAATGCAGTTATTAGAACCTTG-3'

In seguito il cDNA è stato amplificato con altri primers

5'-GCGGATCCCATGCGGGACTACGACGA-3'

5'-AAATAAGAATGCGGCCGCTCAGAATGCAGTTATT-3'

contenente i siti di restrizione riconosciuti dagli enzimi BamHI e NotI, utilizzati per clonare il cDNA all'interno del vettore di espressione pH6EX3.

2.2.6 Clonaggio della proteina hOCTN2

L'RNA totale è stato isolato da fibroblasti umani in coltura e in seguito retrotrascritto. Il cDNA codificante per hOCTN2 ha una grandezza di circa 1674 bp ed è stato amplificato usando i primer forward e reverse sotto riportati:

5'- ATGCGGGACTACGACGAGGTGACCG-3'

5'- TTAGAAGGCTGTGCTTTTAAGGATT-3'

La correttezza della sequenza è stata verificando utilizzando il sequenziatore automatico ABI 310 Applied Biosystem.

In seguito il cDNA è stato amplificato con altri primers:

5'- GCGGATCCATGCGGGACTACGACGAG-3'

5'-CCCAAGCTTTTAGAAGGCTGTGCTTTT-3'

contenenti i siti di restrizione riconosciuti da BamHI e Hind III.

Il cDNA è stato clonato nel vettore di espressione pET41a(+) all'interno dei medesimi siti. Il vettore ricombinante chiamato pET41a(+)-hOCTN2 codifica per una proteina di fusione corrispondente al trasportatore hOCTN2 con tre sequenz poste all'estremità N-terminale codificanti per la proteina GST, una sequenza di 6 istidine e una sequenza S-tag.

Successivamente, il cDNA corrispondente alla proteina hOCTN2 è stato clonato nel vettore di espressione pET21a(+) nei siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione NdeI XhoI, rimuovendo precedentemente il sito NdeI nella posizione 1159 mediante mutagenesi sito diretta. Sono stati utilizzati i seguenti primers:

5'- TTGAAGTCCCAGCATACGTGTTGGCCT-3'

5'- AGGCCAACACGTATGCTGGGACTTCAA-3'

che non comportano nessun cambiamento amminoacidico.

In seguito il cDNA è stato amplificato utilizzando i primers:

5'-GGGAATTCCATATGAAAGACTACGACGAGGTG-3'

5'-CCGCTCGAGGAAGGCTGTGCTTTTAAGGAT-3'

contenenti i siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione.

2.2.7 Digestione del cDNA di OCTN1 con BamHI.

1 µg di cDNA

2 µl di Buffer di digestione BamHI

16 µl di H₂O

1 µl di BamHI (10 u/µl)

2.2.8 Digestione del pET-28a(+) con BamHI.

1 µl di pET-28a(+)

2µl di Buffer di digestione di BamHI

16µl di H₂O

1µl di BamHI

Il *buffer di digestione di Bam HI* 1X contiene:

Tris/HCl 10 mM a pH 8;

MgCl₂ 5 mM;

KCl 100 mM;

2-mercaptoetanol 1mM;

Triton X-100 0.02%;

0.1 mg/ml di BSA (albumina di siero bovino).

Successivamente la miscela di reazione è stata sottoposta alla temperatura di 70°C per 30' allo scopo di inattivare gli enzimi di restrizione.

2.2.9 Digestione del cDNA di OCTN1 con Not I

Dopo la digestione con l' enzima Bam HI è stato purificato e digerito con l'enzima Not I.

1µg di cDNA

2µl di buffer O

16µl di H₂O

1 µl di Not I (10u/µl)

2.2.10 Digestione del pET-28a(+) con Not I

1 µl di pET-28a(+)

2µl di Buffer O

16µl di H₂O

1µl di Not I (10u/µl)

Il *buffer O* utilizzato per la digestione con Not I è composto da:

Tris-HCl 50mM (pH 7,5)

MgCl₂ 10mM

NaCl 100mM

BSA 0.1 mg/ml

2.2.11 Digestione del cDNA di OCTN1 .

Il cDNA purificato è stato bi-digerito seguendo il seguente protocollo:

0.6 µg di DNA purificato;

3 µl di buffer di digestione Tango 2X

2 µl di acqua;

1 µl di Eco RI (10u/µl);

1 µl di XhoI (10u/µl);

per 5 ore e 30 minuti a 37°C;

2.2.12 Digestione del pH6EX3.

1 µl di pH6EX3

3 µl di buffer di digestione Tango 2X

2 µl di acqua;

1 µl di Eco RI (10u/µl);

1 µl di XhoI (10u/µl);

Il buffer di digestione Tango 2X contiene:

Tris Acetato 66 mM a pH 7.9;

Magnesio Acetato 20 mM;

Potassio Acetato 132 mM;

0.2 mg/ml di BSA (albumina di siero bovino).

2.2.13 Digestione del cDNA di OCTN2.

Il cDNA purificato è stato bi-digerito seguendo il seguente protocollo:

0.6 µg di DNA purificato;

3 µl di buffer di digestione di Bam HI* 10x;

2 µl di acqua;

1 µl di Bam HI (10u/µl);

1 µl di Hind III (20u/µl);

per 5 ore e 30 minuti a 37°C;

2.2.14 Digestione del pET-41a(+)

Per digerire il vettore è stato seguito il seguente protocollo:

1 µg di DNA di pET-41a(+);

2 µl di buffer di digestione di Bam HI* 10x;

15 µl di acqua;

1 µl di Bam HI;

1 µl di Hind III;

5 ore e 30 minuti a 37°C;

*Il buffer di digestione di Bam HI 1X contiene:

Tris/HCl 10 mM a pH 8;

MgCl₂ 5 mM;

KCl 100 mM;

2-mercaptoetanol 1mM;
Triton X-100 0.02%;
0.1 mg/ml di BSA (albumina di siero bovino).

2.2.15 Digestione del cDNA di OCTN2.

Il cDNA purificato è stato digerito seguendo il seguente protocollo:

0.5 µg di DNA purificato;
2 µl di buffer di digestione di NEB4;
1 µl di Nde I (10u/µl);
5.5 µl di H₂O;
Per 5 ore a 37°C;

Dopo purificazione, il cDNA è stato poi mono-digerito secondo il seguente protocollo:

0.45 µg di DNA purificato;
2 µl di buffer di digestione R;
1 µl di Xho I(10u/µl);
6.5 µl di H₂O;
Per 5 ore a 37°C

Il buffer di digestione NEB4 contiene

Acetato di potassio 50 mM

Tris-acetato 20 mM

Magnesio acetato 10 mM

Ditiotreitolo 1 mM

pH 7.9

Il buffer di digestione R contiene:

Tris/HCl 10 mM pH 8.5

MgCl₂ 10 mM

KCl 100 mM

BSA 0.1 mg/ml

2.2.16 Digestione del vettore pET 21a(+)

Il vettore di espressione è stato digerito seguendo il seguente protocollo:

1 µg di DNA pET 21a(+);

2 µl di buffer di digestione di NEB4;

1 µl di Nde I (10u/µl);

6 µl di H₂O;

Per 5 ore a 37°C;

Dopo purificazione, il cDNA è stato poi mono-digerito secondo il seguente protocollo:

1 µg di DNA pET 21 a(+) purificato;

2 µl di buffer di digestione R;

1 µl di Xho I(10u/µl);

6 µl di H₂O;

Per 5 ore a 37°C

Il buffer di digestione NEB4 contiene

Acetato di potassio 50 mM

Tris-acetato 20 mM

Magnesio acetato 10 mM

Ditiotreitolo 1 mM

pH 7.9

Il buffer di digestione R contiene:

Tris/HCl 10 mM pH 8.5

MgCl₂ 10 mM

KCl 100 mM

BSA 0.1 mg/ml

2.2.17 Trattamento del vettore con Fosfatasi Alcalina

Il vettore è sottoposto, dopo digestione, al trattamento con la fosfatasi per catalizzare nel DNA l'idrolisi dei residui 5'-fosfato.

Per fare il trattamento con la "Calf Intestine Alkaline Phosphatase" della Fermentas è stato seguito il seguente protocollo:

20 µl di DNA di vettore digerito

3 µl di buffer CIAP*;

6 µl di H₂O;

1 µl di CIAP.

La miscela di reazione si lascia incubare a 37°C per 30' e si blocca lasciandola a 85°C per 15'.

*Il *buffer CIAP* contiene:

Tris-HCl 0.1 M a pH 7.5;

MgCl₂ 0.1 M.

2.2.18 Ligation

Con questa tecnica è possibile inserire il frammento di DNA digerito nel vettore di espressione grazie alle estremità coesive create dalla digestione con gli stessi enzimi di restrizione. Per facilitare la reazione di ligation è necessario che il rapporto tra vettore e frammento da clonare al suo interno sia 1:3, 1:4. Il vettore e il frammento vengono incubati per cinque minuti a temperatura ambiente:

150 ng di DNA digerito

50 ng di plasmide digerito e trattato con fosfatasi alcalina;

7.3 µl di H₂O;

1 µl di *T₄ ligasi* (0,2 U);

10 µl di buffer per la ligation*.

*Il *buffer* per la ligation contiene:

Tris HCl 50 mM ;

MgCl₂ 10 mM;

DTT (ditiotreitolo) 10 mM;

ATP 1 mM;

BSA 25 µg/ml.

Al termine dell'incubazione cellule di *E. Coli* TG1, precedentemente rese competenti, vengono trasformate con la miscela di ligation.

2.2.19 Cellule competenti

Abbiamo reso competenti le cellule di *E. Coli* del ceppo TG1 utilizzando una variazione del metodo di Cohen (Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, 1972). La procedura è efficace per la maggior parte dei ceppi di *E. Coli*.

E' stata prelevata una singola colonia da una piastra contenente colonie cresciute per 16-20 ore a 37°C e trasferita in 50 ml di brodo LB. La coltura viene incubata per tre ore a 37°C sotto vigorosa agitazione (300 cicli/minuto in un incubatore orbitante). Per un'efficiente trasformazione è essenziale che il numero di cellule vive non ecceda 10^8 cellule per ml. La crescita cellulare è stata monitorata misurando la D.O. a 600 nm, e a un valore compreso tra 0.4 – 0.6 le cellule sono state trasferite in un tubo di polipropilene sterile da 50 ml e conservate in ghiaccio per 30 minuti.

In seguito sono state sedimentate mediante centrifugazione a 3600 x g per 10 minuti a 4°C. Il sovrinatante è stato decantato ed il pellet risospeso in 5 ml di CaCl₂ 50 mM e conservato in ghiaccio per 30'. Le cellule sono poi state nuovamente sedimentate mediante centrifugazione e riprese in 2 ml di CaCl₂ 50 mM freddo.

2.2.20 Trasformazione

La trasformazione è un processo in cui vengono inseriti dei plasmidi all'interno di cellule batteriche, precedentemente rese competenti, allo scopo di far produrre loro un'elevata quantità del DNA inserito. Normalmente il volume di DNA inserito non deve superare il 5% di quello delle cellule. 5 µl (ca. 50 ng) della miscela di ligation sono stati incubati in ghiaccio per 30' con 100 µl di cellule competenti, quindi sottoposti ad uno shock termico per 90 secondi a 42°C. Successivamente alla miscela di reazione sono stati aggiunti 100 µl di brodo LB ed il tutto è stato incubato a 37°C per 1 ora. Le cellule che ospitano il plasmide sono state infine selezionate su piastre contenenti LB, agar 1.5% e ampicillina 100 mg/ml.

2.2.21 Estrazione del DNA mediante il kit QIAprep

Spin Miniprep

La coltura, contenente la colonia cresciuta per 12-16 ore a 37°C in 5 ml di brodo LB, viene centrifugata e il pellet è risospeso con 250 µl di buffer P1 (contenente RNasi A). A questo vengono aggiunti 250 µl di buffer P2, contenente idrossido di sodio (NaOH) che denatura il DNA cromosomico, invertendo per 4-6 volte fin quando la soluzione non diviene limpida.

Si aggiungono successivamente 350 µl di buffer N3 che contiene acido acetico e guanidinio idrocloruro; immediatamente si inverte per 4-6 volte fin quando la

soluzione non diventa viscosa. Dopo centrifugazione per 10' a 16000 x g, si forma un pellet bianco e compatto; il sovrinatante si trasferisce su una QIAprep Spin Column e si centrifuga nuovamente a 16000 x g per 60''.

Si procede col lavaggio della QIAprep Spin Column utilizzando 500 µl di buffer PB (contenente isopropanolo e guanidinio idrocloruro), si centrifuga per 60'' e si aggiungono 750 µl di buffer PE, che contiene etanolo. Si centrifuga nuovamente a 16000 x g per 60'' e, successivamente, per 1' per eliminare tutto il buffer di lavaggio.

Si pone la QIAprep Column in una eppendorf da 1.5 ml e, per eluire il DNA, si aggiungono 50 µl di buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) o di H₂O direttamente al centro della colonnina. Dopo 1' a temperatura ambiente, si centrifuga per 1'.

2.2.22 Trasformazione di cellule E.coli Rosetta DE3 con i plasmidi ricombinante

Le cellule di *E. coli* ceppo *Rosetta DE3pLysS* e le cellule di *E. coli* ceppo *RosettaGami2 DE3pLysS* sono state rese competenti con CaCl₂ 50mM, e in seguito trasformate con il plasmide contenente il cDNA precedentemente sequenziato.

2.2.23 Espressione della proteina ricombinante hOCTN1

Il plasmide risultante pET28a(+)-hOCTN1, codifica per una proteina di fusione corrispondente alla proteina umana OCTN1 con una ulteriore sequenza posta

all'estremità N-terminale della proteina di interesse:
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS.

Per ottenere l'espressione di hOCTN1 il ceppo cellulare *E.coli* Rosetta(DE3) pLysS è stato trasformato con il costrutto pET28a(+)-hOCTN1, mediante il metodo del cloruro di calcio. Per selezionare le colonie trasformate sono state utilizzate piastre di LB agar contenenti 100 µg/mL di ampicillina e 34 µg/mL di cloramfenicolo. Le cellule contenenti il plasmide sono state in seguito inoculate in 100 ml di brodo LB contenenti 100 µg/mL di ampicillina e 34 µg/mL di cloramfenicolo e fatte crescere per tutta la notte a 37°C in un incubatore rotante. Successivamente 50 mL di coltura cellulare sono stati diluiti in 0.5 L di brodo LB fresco contenente gli antibiotici e, a metà della fase logaritmica della crescita batterica, è stata indotta la sintesi della proteina ricombinante mediante l'aggiunta di IPTG 0.4 mM.

Nel caso in cui è stato utilizzato il ceppo cellulare *E.coli* RosettaGami2 (DE3) pLysS, sia nelle piastre che nelle colture è stato aggiunta tetraciclina alla concentrazione di 12.5 µg/mL.

2.2.24 Espressione della proteina ricombinante

hOCTN2-GST

Per ottenere l'espressione di hOCTN2-GST il ceppo cellulare *E.coli* Rosetta(DE3) pLysS è stato trasformato con il costrutto pET41a(+)-hOCTN2, mediante il metodo del cloruro di calcio.

Per selezionare le colonie trasformate sono state utilizzate piastre di LB agar contenenti 30 µg/mL di kanamicina e 34 µg/mL di cloramfenicolo. Le cellule contenenti il plasmide sono state in seguito inoculate in 100 ml di brodo 2X TY

contenenti 30 µg/mL di kanamicina e 34 µg/mL di cloramfenicolo e fatte crescere per tutta la notte a 37°C in un incubatore rotante. Successivamente 50 mL di coltura cellulare sono stati diluiti in 0.5 L di brodo 2X TY fresco contenente gli antibiotici e, a metà della fase logaritmica della crescita batterica, è stata indotta la sintesi della proteina ricombinante mediante l'aggiunta di IPTG 0.4 mM e la temperatura è stata portata 28°C.

2.2.25 Espressione della proteina ricombinante

hOCTN2(R2K)

Per ottenere l'espressione di hOCTN1 il ceppo cellulare *E.coli* Rosetta(DE3) pLysS è stato trasformato con il costrutto pET21a(+)-hOCTN2, mediante il metodo del cloruro di calcio. Per selezionare le colonie trasformate sono state utilizzate piastre di LB agar contenenti 100 µg/mL di ampicillina e 34 µg/mL di cloramfenicolo. Le cellule contenenti il plasmide sono state in seguito inoculate in 100 ml di brodo 2x TY contenenti 100 µg/mL di ampicillina e 34 µg/mL di cloramfenicolo e fatte crescere per tutta la notte a 37°C in un incubatore rotante. Successivamente 50 mL di coltura cellulare sono stati diluiti in 0.5 L di brodo 2X TY fresco contenente gli antibiotici e, a metà della fase logaritmica della crescita batterica, è stata indotta la sintesi della proteina ricombinante mediante l'aggiunta di IPTG 0.1 mM e la temperatura è stata portata 28°C.

2.3 Metodologie Biochimiche.

2.3.1 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide in SDS

La separazione delle proteine è effettuata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (dodecilsolfato di sodio).

E' usato un sistema di mini gel le cui dimensioni sono 8 x 10 cm e lo spessore è 0.75mm.

La soluzione per la preparazione del gel di separazione è costituita da:

- 3 ml di acrilammide/bisacrilammide (acrilammide 30% e bisacrilammide 0.2%);
- ml di Tris (triidrossimetilamminoetano)/HCl 1.8 M a pH 8.8;
- ml di H₂O;
- 0.05 ml di SDS al 10%.

La soluzione per la preparazione del gel di concentrazione è costituita da:

- 0.2 ml di acrilammide/bisacrilammide (acrilammide 30% e bisacrilammide 0.2%);
- 0.12 ml di Tris/HCl 0.6 M a pH 6.8;
- 0.85 ml di H₂O;
- 0.012 ml di SDS al 10%.

TEMED (tetrametiletilendiammina) (5 μ l per il gel di separazione e 3 μ l per il gel di concentrazione) ed ammonio persolfato al 10% (35 μ l per il gel di separazione e 25 μ l per il gel di concentrazione) sono utilizzati come catalizzatori nella reazione di polimerizzazione.

I campioni proteici sono solubilizzati con un tampone contenente Tris 10 mM, SDS 3.5%, glicerolo al 10%, β -mercaptoetanololo o 1.4-ditioeritritolo 100 mM e blu di bromofenolo allo 0.01% a pH 6.8.

Il tampone di corsa contiene Tris 25 mM, glicina 1.4%, SDS allo 0.1% a pH 8.3.

La colorazione dei gel di poliacrilammide viene effettuata con il metodo del blu di Coomassie.

2.3.2 Western blotting ed immunodecorazione

Questa tecnica consente di trasferire le proteine separate su gel di poliacrilammide in dodecilsolfato di sodio, ad una membrana di nitrocellulosa e successivamente evidenziare la proteina di interesse utilizzando come sonda anticorpi diretti contro la proteina stessa. Il primo passaggio consiste nel trasferire le proteine separate sul gel, su un foglio di nitrocellulosa. Per fare questo il gel viene posto nel buffer di trasferimento e, dopo 15 minuti di incubazione, si immergono nel medesimo buffer, la membrana di nitrocellulosa e la carta da filtro. Trascorsi 15 minuti, si assembla un sandwich, costituito da carta da filtro, membrana di nitrocellulosa, gel, carta da filtro e si pone nell'elettroblotting per 20 minuti a 15 V. Successivamente la membrana è posta per un'ora in un buffer di incubazione, dove vengono aggiunti 2 ml di albumina al 3% e l'anticorpo primario, che si lega alla proteina contro cui è diretto. Si procede, quindi, a 3-4 lavaggi di 10 minuti con il tampone di lavaggio per eliminare l'anticorpo che non si è legato.

Effettuati i lavaggi, la membrana di nitrocellulosa si pone, per un'ora, nel tampone di incubazione, contenente 2 ml di albumina all'1%, in cui viene aggiunto l'anticorpo secondario che riconosce il frammento Fc dell'anticorpo primario e porta legata la perossidasi. Successivamente si effettuano altri 3-4 lavaggi con il tampone di lavaggio. Nell'ultimo passaggio si pone la membrana nella soluzione di sviluppo: la perossidasi, coniugata all'anticorpo secondario, reagisce con il perossido d'idrogeno (H_2O_2), presente in soluzione, liberando O_2 , che provoca l'ossidazione del DAB (diaminobenzidina), il quale, ossidato, produce un precipitato rosso scuro in corrispondenza delle bande di interesse.

La reazione viene bloccata con l'aggiunta di acqua distillata.

Tampone di trasferimento (900 ml di H_2O + 100 ml di metanolo) :

Glicina 1.44%;

Tris 0.3%;

SDS 0.01 %.

Tampone di lavaggio (1L) :

Tris 50 mM;

NaCl 150 mM;

Questa soluzione viene portata a pH 7 con l'aggiunta di HCl 6 N.

Tampone di incubazione :

50 ml di tampone di lavaggio;

TWEEN 20 0.5%.

Soluzione di sviluppo :

20 ml Tris 50 mM pH 7.5;

DAB punta di spatola;

20µl H₂O₂ 40 %.

2.3.3 Purificazione della proteina ricombinante

hOCTN1

La frazione insolubile del lisato cellulare indotto, è stata lavata due volte con un tampone contenente 50 mM di Tris/HCl pH 7.5, 3% di Triton X100 e centrifugata per 10 minuti a 12000 x g a 4°C; il pellet è stato risospeso con 100 mM Tris/HCl pH 8 e centrifugato per 10 minuti a 12000 x g a 4°C. il pellet risultante è stato risospeso con un tampone contenente 3M urea, 0.8% di sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 e centrifugato a 12000 x g a 4°C. Il sovratanante (1ml) è stato caricato su una colonna precedentemente riempita con resina His-select Ni-chelating affinity gel (0.5 cm di diametro, 3 cm di altezza), pre-equilibrata con un tampone contenente 0.1 % sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. L'eluizione è stata ottenuta in seguito all'aggiunta di 25 mL di tampone contenente 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 e in seguito 6 ml dello stesso tampone contenente 10 mM imidazolo e poi 6 ml dello stesso tampone contenente 50 mM imidazolo. Sono state raccolte 48 frazioni cromatografiche e la proteina purificata è stata rilevata nelle frazioni 43-45.

In seguito è stata messa a punto una cromatografia simile a quella precedente, utilizzando nei tamponi anziché il Triton X100, il Dodecilmaltoside (DDM), detergente consigliato per gli studi cristallografici.

2.3.4 Purificazione della proteina ricombinante

hOCTN2-GST

La frazione insolubile del lisato cellulare indotto, è stata incubata per 15 minuti con una soluzione di DTE 100 mM e in seguito solubilizzata con un tampone

contenente 3M urea, 0.8% di sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.4 e centrifugato a 12000 x g a 4°C. Il sovrinatante (1ml) è stato caricato su una colonna precedentemente riempita con resina Profinity IMAC Ni-charged (0.5 cm di diametro, 2.5 cm di altezza), pre-equilibrata con un tampone contenente 0.1 % sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.4. L'eluizione è stata ottenuta in seguito all'aggiunta di 3 mL di tampone contenente 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.4 e in seguito 3 ml dello stesso tampone contenente 50 mM imidazolo. Sono state raccolte 12 frazioni cromatografiche e la proteina purificata è stata rilevata nella frazione 10.

2.3.5 Purificazione della proteina ricombinante

hOCTN2(R2K)

La frazione insolubile del lisato cellulare indotto, è stata incubata per 15 minuti con una soluzione di DTE 100 mM e in seguito solubilizzata con un tampone contenente 3M urea, 0.8% di sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 e centrifugato a 12000 x g a 4°C. Il sovrinatante (1ml) è stato caricato su una colonna precedentemente riempita con resina His-select Ni-chelating affinity gel (0.5 cm di diametro, 2.5 cm di altezza), pre-equilibrata con un tampone contenente 0.1 % sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. L'eluizione è stata ottenuta in seguito all'aggiunta di 3 mL di tampone contenente 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 e in seguito 3 ml dello stesso tampone contenente 50 mM imidazolo. Sono state raccolte 15 frazioni cromatografiche e la proteina purificata è stata rilevata nella frazione 14.

3. Risultati

3.1 Over-espressione in E.coli del trasportatore hOCTN1.

Il cDNA, relativo alla proteina hOCTN1 di 1656bp, è stato amplificato dall' RNA di fibroblasti cutanei umani utilizzando primer costruiti secondo la sequenza di hOCTN1 contenuta in banca dati. Il cDNA ottenuto è visibile su gel di agarosio come una banda avente un peso molecolare di circa 1700 bp, valore molto vicino al peso molecolare teorico. In seguito al sequenziamento del cDNA non sono state riscontrate mutazioni del gene. Il cDNA corrispondente ad hOCTN1 è stato amplificato con primer forward e reverse contenenti i siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione Bam HI e Not I, al fine di permettere l'inserimento nel vettore di espressione pET-28a(+) (Lian et al 2008). Il vettore di espressione risultante Pet-28a(+)-hOCTN1, codificante per una proteina di fusione contenente una sequenza di 6 istidine, è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* ceppo Rosetta (DE3) pLysS. L'espressione in queste cellule è stata ottimizzata variando sia il tempo di espressione sia la temperatura di coltura. Il lisato cellulare, ottenuto nelle varie condizioni, è stato suddiviso in frazione solubile e frazione insolubile mediante centrifugazione. La frazione insolubile, corrispondente ai corpi di inclusione, è stata analizzata mediante SDS Page. La presenza su gel di una banda non omogenea, relativa alla proteina di interesse, ci ha spinti a cambiare le condizioni sperimentali. Il cDNA corrispondente a hOCTN1, pertanto, è stato clonato nel vettore di espressione pH6EX3 il quale permette l'inserimento, all'estremità N-terminale della proteina di interesse, di una coda di 6 istidine. Il cDNA è stato amplificato utilizzando i primer forward e reverse contenenti i siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione Eco RI e Xho I. Il plasmide di espressione risultante pH6EX3-hOCTN1, codificante per la proteina hOCTN1 alla quale è

stata fusa una coda di 21 amminoacidi, è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* RosetteGami2 (DE3) pLysS. Il tempo e la temperatura di induzione sono stati variati, anche in questo caso, per aumentare la resa della proteina espressa. La frazione insolubile del lisato cellulare, corrispondente ai corpi di inclusione, è stata analizzata attraverso SDS Page. Come è mostrato in figura 1, nel lisato cellulare indotto è presente una banda proteica che non viene riscontrata all'interno del lisato cellulare non indotto. È stato osservato, inoltre, che la migliore temperatura di espressione è 28°C. Utilizzando i markers molecolari presenti su gel, è stata calcolata la massa molecolare della proteina hOCTN1, che risulta essere 58 KDa, leggermente inferiore rispetto alla massa molecolare teorica calcolata sulla base della sequenza amminoacidica contenuta in banca dati, che è pari a 64.505 KDa. Sono state testate diverse concentrazioni di induttore, variando l'IPTG da 0.1 a 1 mM, al fine di ottimizzare la resa della proteina over-espressa. L'espressione migliore è stata ottenuta utilizzando come concentrazione finale di IPTG pari a 0.4 mM.

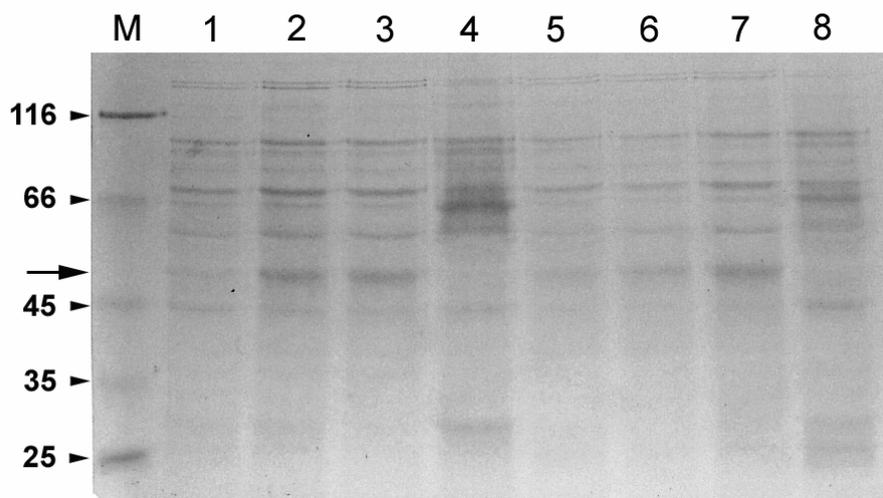


Figura 1: Espressione del costrutto ricombinante pH6EX3-OCTN1 in *E.coli* Rosetta (DE3). Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari: β -galattosidasi (116kDa), ovoalbumina (66kDa), lattato deidrogenasi (35kDa), endonucleasi di restrizione Bsp 98I (25 kDa); linee 1,2 e 3, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare (30 μ g), dopo 2,4 e 6 ore di induzione rispettivamente ottenuti a 37°C; linea 4, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare non indotto (30 μ g) ottenuto a 37°C; linee 5, 6 e 7 pellet della frazione insolubile del lisato cellulare (30 μ g), dopo 2,4 e 6 ore di induzione rispettivamente ottenuti a 28°C; linea 8, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare non indotto (30 μ g) ottenuto a 28°C. la proteina overespressa è indicata dalla freccia.

Successivamente, per incrementare la resa della proteina, sono state trasformate cellule di *E.coli* RosettaGami2 (DE3) con il costrutto pH6EX3-hOCTN1. La resa proteica di questo ultimo ceppo cellulare, come mostrato in figura 2, è più alta rispetto al primo. La migliore espressione, anche in questo caso, è stata ottenuta alla temperatura di 28°C ed aumenta con il passare del tempo. Il miglior tempo di espressione si ha dopo sei ore dall'aggiunta dell'IPTG. Mediante densitometria è stato calcolato che la proteina di interesse rappresenta circa il 40% delle proteine totali. La massa molecolare del trasportatore over-espresso, calcolata in base all'SDS Page, risulta essere più bassa rispetto a quella teorica, calcolata sulla base della sequenza amminoacidica.

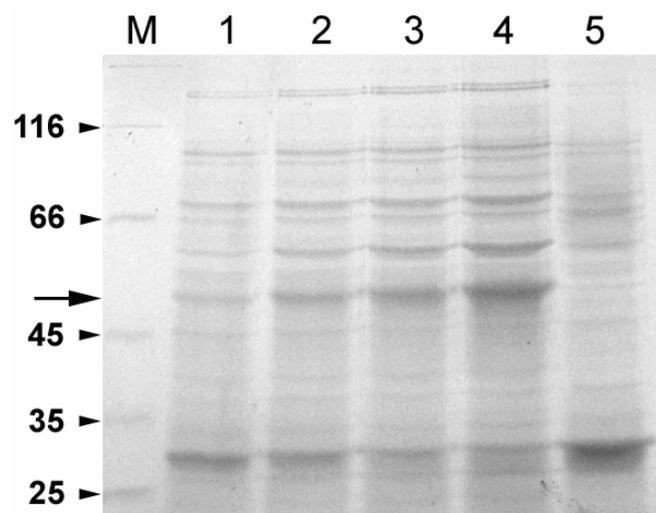


Figura 2. Espressione del costrutto pH6EX3-hOCTN1 in *E.coli* RosettaGami2(DE3). Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linee 1, 2, 3 e 4 pellet della frazione insolubile del riusato cellulare indotto (30-50 µg) dopo 1, 2, 4 e 6 ore dopo l'induzione della sintesi proteica rispettivamente, ottenute a 28°C; linea 5, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare non indotto (50 µg) ottenuto a 28°C. La proteina over-espressa è indicata da una freccia.

3.2 Solubilizzazione e purificazione del trasportatore over-espresso hOCTN1.

Nello studio delle proteine di membrana uno dei problemi da affrontare riguarda la loro scarsa solubilità in soluzioni acquose. La solubilità di hOCTN1, espresso in batteri, è stata testata utilizzando detergenti con diverse proprietà. La frazione insolubile del lisato cellulare indotto è stata trattata con detergenti quali: Triton X-100, C₁₂E₈, dodecilmaltoside, deossicolato, Sarkosyl, e SDS. Tutti i detergenti sopra elencati sono stati utilizzati ad una concentrazione del 3% (Figura 3).

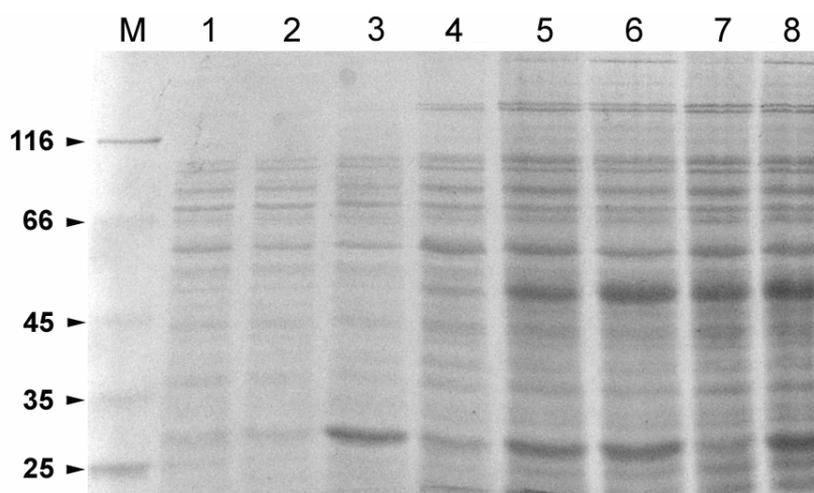


Figura 3 Solubilizzazione del trasportatore over-espresso hOCTN1.). Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1-8 proteina (20-50 µg) corrispondente alla linea 4 della figura 2, solubilizzata con Triton X-100, C₁₂E₈, n-dodecil-β-D-maltoside, deossicolato, Sarkosyl, SDS al 3%, SDS allo 0.5%, Sarkosyl,

La sospensione, ottenuta dopo il trattamento con ogni detergente, è stata centrifugata ed in seguito analizzata mediante SDS Page. La figura 3 mostra che, tra tutti i detergenti utilizzati, solo il Sarkosyl e l' SDS solubilizzano il trasportatore. Tali detergenti sono stati utilizzati, anche, a concentrazioni più basse ed in seguito a ciò è stato visto che il Sarkosyl allo 0.8% e l' SDS allo 0.5% solubilizzavano la proteina. Una purificazione parziale della proteina è stata ottenuta trattando con Triton X100 al 3% la frazione insolubile del lisato cellulare

indotto. La sospensione è stata centrifugata ed il pellet trattato con deossicolato al 3%. Ciò ha portato ad un arricchimento nella frazione proteica del trasportatore hOCTN1, rispetto alle proteine totali, come mostrato nella linea 2 di figura 4. La purificazione totale del trasportatore si è avuta mediante cromatografia per affinità utilizzando una resina contenente Nichel. La frazione insolubile, contenente la proteina di interesse arricchita, è stata trattata con un tampone contenente Urea 3M e Sarkosyl allo 0.8%. La proteina così solubilizzata è stata caricata su una colonna cromatografia contenente la resina al Nichel. Per rimuovere tutte le proteine di origine batterica è stato effettuato un lavaggio con un tampone contenente Tris/Cl 20 mM pH 8, Triton X-100 0.1 %, NaCl 200 mM. La proteina hOCTN1 è stata, quindi, eluita con un tampone contenente Imidazolo 50 mM. Come mostrato in figura 4(A) la proteina purificata risulta essere una banda singola su gel di poliacrilammide.

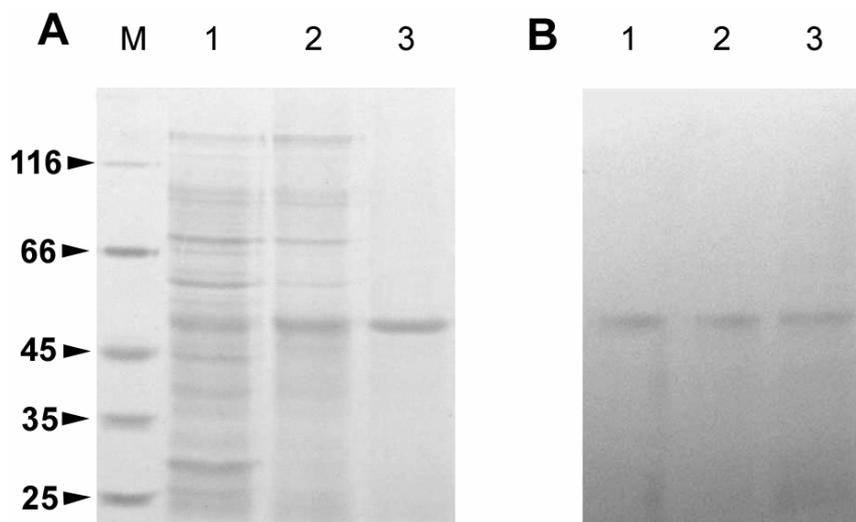


Figura 4 Purificazione del trasportatore over-espresso hOCTN1. Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. (A) Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1, proteina solubilizzata (40 μ g) corrispondente alla proteina della linea 4 della figura 2; linea 2, proteina della linea 1 dopo lavaggio con Triton X-100 al 3% e deossicolato al 3% (25 μ g); linea 3, frazione numero 44 derivante dalla cromatografia di affinità dopo precipitazione in acetone (15 μ g). (B) Immunodecorazione DAB utilizzando un anticorpo anti-His (1:1000) su membrana PVDF dopo western blotting dello stesso gel (A).

I tamponi, utilizzati nei diversi passaggi della purificazione, contengono 2-mercaptoetanolo alla concentrazione di 50 mM. La presenza di questo agente

riducente è giustificata dalla precedente osservazione della non corretta migrazione su gel di poliacrilammide del trasportatore over-espresso. Ciò è probabilmente dovuto alla presenza, all'interno della sequenza amminoacidica, di residui di cisteina nello stato ossidato.

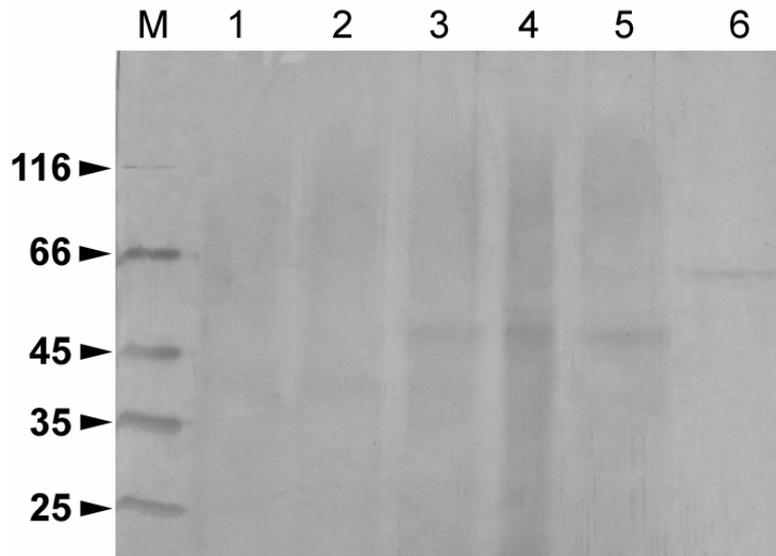


Figura 5. Influenza del 2-mercaptoetanolo sulla corsa elettroforetica della proteina hOCTN1 purificata. Il sample buffer non contiene DTE. La proteina purificata hOCTN1 (10 μ g) è stato caricato su gel in assenza (linea 1), e in presenza di mercaptoetanolo 1 mM (linea 2) 10 mM (linea 3) 50 mM (linea 4) 100 mM (linea 5) e 1M (linea 6). Il gel è stato colorato come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritto in figura 1.

Come mostrato in figura 5, in presenza di basse concentrazioni di 2-mercaptoetanolo la massa molecolare di hOCTN1 purificato è di circa 40 kDa. La colorazione della proteina, inoltre, è molto debole in presenza di basse concentrazioni di mercaptoetanolo o in totale assenza; ciò è dovuto al fatto che, probabilmente in seguito alla formazione di ponti disolfuro, si vengono a creare aggregati molecolari molto grandi che non entrano all'interno delle maglie del gel di poliacrilammide. In presenza di 2-mercaptoetanolo la massa molecolare apparente di hOCTN1 è uguale a quella osservata nelle figure 1, 2 e 3. Utilizzando alte concentrazioni di 2-mercaptoetanolo, invece, la massa molecolare del trasportatore risulta essere circa 61.7 kDa, valore leggermente più basso rispetto alla massa molecolare teorica della proteina. Questo suggerisce che, in condizioni

riducenti deboli, la proteina può formare ponti disolfuro che influenzano la mobilità elettroforetica, nonostante la presenza dell' SDS (Figura 6).

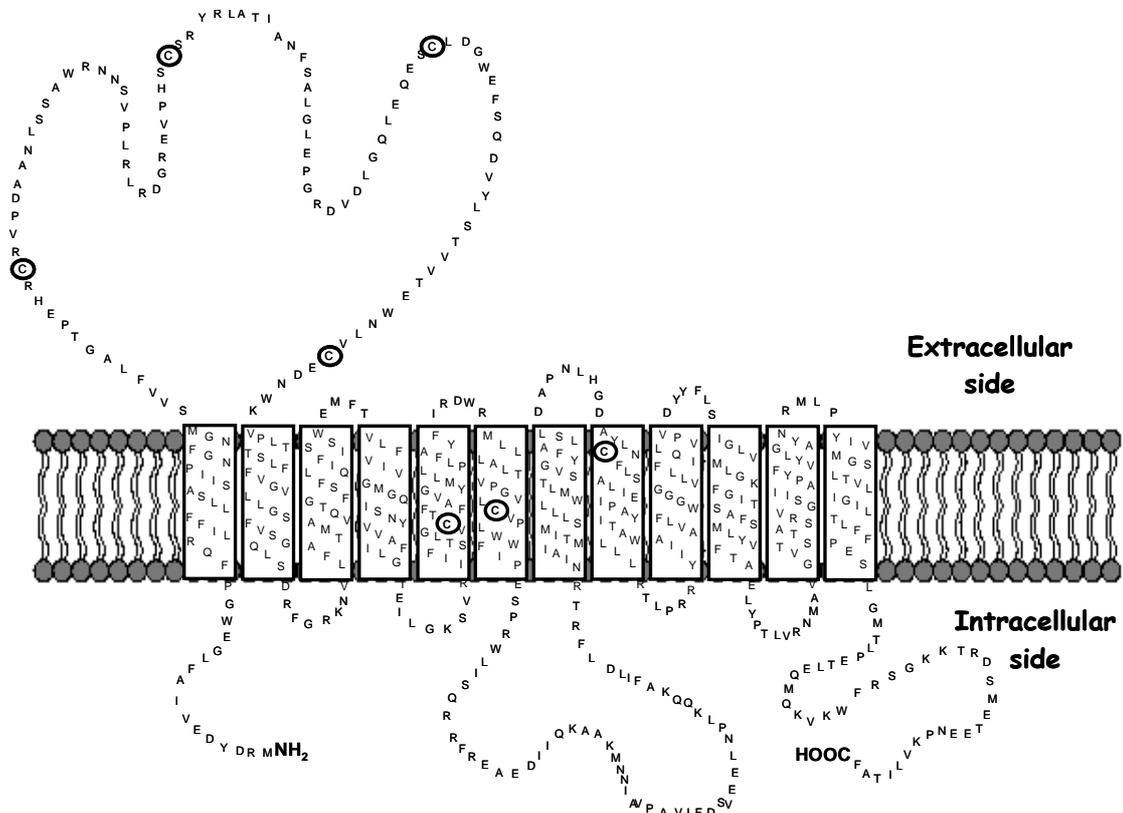


Figura 6 Modello topologico di OCTN1, con 12 eliche transmembrana. Il modello è stato costruito usando il software di predizione TM-PRED (output format: min 21, max 23) e modificato considerando criteri stabiliti per la costruzione di modelli di proteine transmembrana. (Lee 2003). Le cisteine sono indicate dai cerchi.

Per confermare che la proteina purificata è il trasportatore hOCTN1, è stato utilizzata la tecnica del Western Blotting, facendo reagire un anticorpo diretto contro la coda di poli-istidina inserita dal vettore di espressione. Come è mostrato in figura 4B l'anticorpo riconosce sia una banda proteica corrispondente alla proteina overespressa nella frazione insolubile del lisato cellulare indotto, sia la proteina parzialmente purificata, nonché la proteina purificata. La proteina hOCTN1, dopo purificazione, risulta essere arricchita 3.3 volte in più rispetto al lisato cellulare e la sua resa è di 2.5-4 mg di proteina purificata per litro di coltura.

Come detto in precedenza, l'over-espressione in batteri permette di ottenere grandi quantità di proteina utile per studi di tipo strutturale. Per questo motivo è stato messo a punto un protocollo di purificazione su larga scala utilizzando detergenti non ionici particolarmente indicati per gli studi cristallografici di proteine. Attualmente sono stati ottenuti 2 mg di proteina con purezza superiore al 97 %, che è stata inviata al Biochemie-Zentrum dell' università di Heidelberg con il quale siamo in collaborazione per gli studi strutturali.

3.3 Over-espressione in E.coli del costrutto GST-hOCTN2.

Il cDNA relativo alla proteina hOCTN2 di 1674bp, è stato isolato dall'RNA totale di fibroblasti cutanei umani e, quindi, amplificato mediante PCR utilizzando primer costruiti secondo la sequenza di hOCTN2 contenuta in banca dati.

Dopo averne verificato la correttezza della sequenza, il cDNA isolato è stato clonato all'interno di diversi vettori di espressione quali il pET-28 a(+), il pMWT7, il pH6EX3 e il pET-22b(+). I vettori ricombinanti elencati sono stati utilizzati per trasformare diversi ceppi di *E. coli*, come il ceppo Rosetta(DE3)pLysS, il ceppo RosettaGami2(DE3)pLysS, il ceppo C41(DE3), il ceppo C43(DE3) ed il ceppo BL21(DE3). È stato, infine, utilizzato anche il vettore di espressione pGEX-4T1, che permette l'inserimento a monte del gene di interesse della Glutatione-S-Transferasi (GST), allo scopo di aumentare la solubilità della proteina over- espressa e di essere utilizzato nella purificazione in condizioni non denaturanti usando come resina l'agarosio glutatione.

Il costrutto è stato utilizzato per trasformare differenti ceppi di *E. coli* in diverse condizioni di espressione. La proteina over-espressa, tuttavia, è stata sempre identificata nella frazione insolubile del lisato cellulare. Tale risultato ha impedito l'utilizzo di detergenti non denaturanti nella solubilizzazione della proteina di interesse rendendo impossibile la purificazione con la resina agarosio- glutatione.

Per questo motivo, il cDNA codificante per la proteina hOCTN2, è stato clonato all'interno del vettore di espressione pET-41a(+) che permette l'inserimento di una coda di poli-istidina, tra la proteina di interesse e GST, utile alla purificazione del trasportatore over-espresso in condizioni denaturanti. Il costrutto pET41a(+)-

hOCTN2, è stato, dunque, utilizzato per trasformare il ceppo batterico Rosetta(DE3)pLysS.

Per ottimizzare l'espressione della proteina di interesse, sono state variate sia la temperatura che il tempo di induzione, ottenendo la migliore espressione mantenendo le cellule in coltura a 28°C, inducendo l'espressione con IPTG 0.4 mM ed aggiungendo il mezzo di coltura con sorbitolo 1M e betaina 2.5 mM. Questa strategia ha permesso di creare uno shock osmotico alla cellula ospite con conseguente over- espressione del trasportatore hOCTN2-GST (Figura 7).

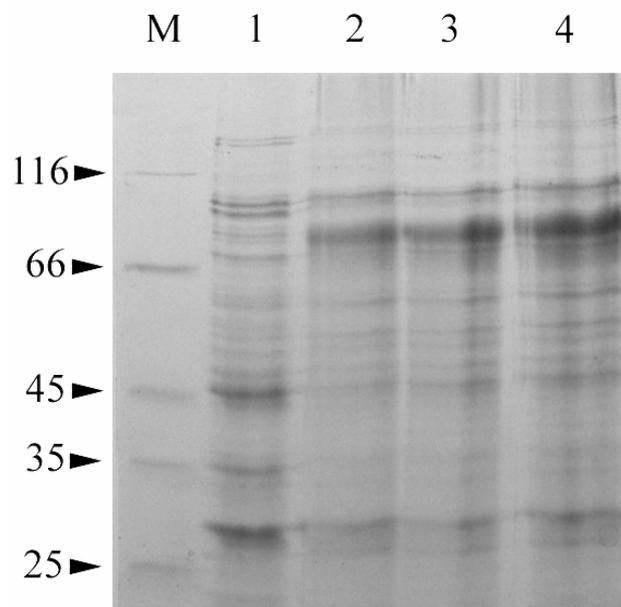


Figura 7 Espressione del costrutto pET41a(+)-hOCTN2 in *E.coli* Rosetta (DE3). Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1 lisato cellulare non indotto (30 µg); linee 2-4, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare (30 µg) dopo 2, 4 e 6 ore dall'induzione rispettivamente.

3.4 Purificazione della proteina over-espressa GST-hOCTN2

La proteina over-espressa GST-hOCTN2 è stata solubilizzata, come nel caso del trasportatore hOCTN1, con il detergente denaturante Sarkosyl, alla

concentrazione 0.8%, poiché non solubile in detergenti non ionici come Triton X-100 e C₁₂E₈.

Il lisato cellulare (Figura 7 linea 1) è stato, dunque, trattato con un tampone contenente Urea 3 M, 0.8% Sarkosyl, 8 mM DTE. In seguito a centrifugazione per 5 minuti a 6000 g, la proteina presente nella frazione solubile è stata caricata sulla colonna cromatografia al Nichel. Ques'ultima è stata, successivamente, lavata con 10 ml di un tampone contenente Tris/HCl 20 mM pH8.5, Triton X-100 0.1%, NaCl 200 mM e DTE 5mM e poi altri 5 ml dello stesso tampone addizionato di Imidazolo 10 mM per rimuovere le proteine batteriche eventualmente legate in maniera aspecifica alla colonna.

L'eluizione della proteina GST-hOCTN2 è stata ottenuta con lo stesso tampone di quello usato in precedenza, in cui è stato aggiunto Imidazolo 50 mM. Come mostrato in Figura 8 la proteina è stata completamente purificata dal resto del pattern proteico e risulta essere arricchita circa 10 volte rispetto al lisato cellulare.

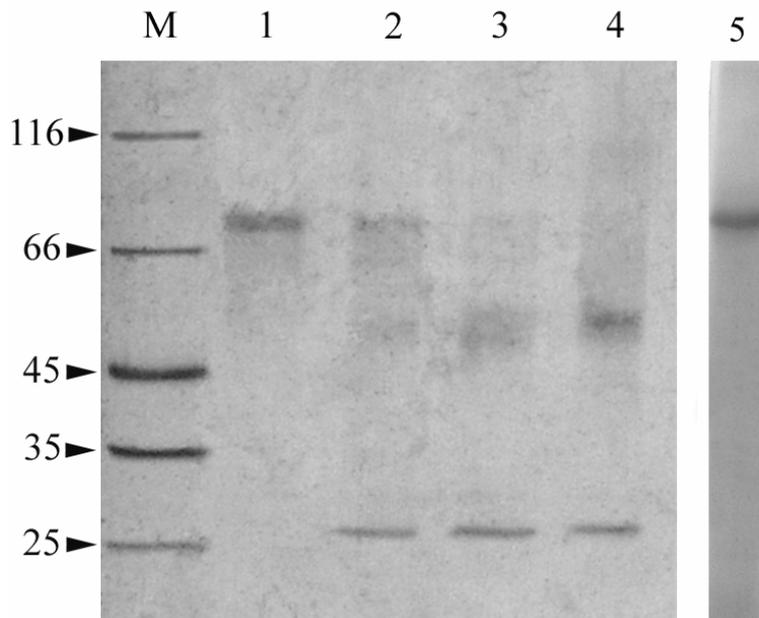


Figura 8 Purificazione e taglio mediante trombina del costrutto GST-hOCTN2. Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1, proteina di fusione purificata (10 µg); linee 2-4, proteina corrispondente alla linea 1 dopo incubazione 1, 3 e 4 ore con trombina, rispettivamente. Linea 5, Immunodecorazione DAB utilizzando un anticorpo anti-His (1:1000) su membrana PVDF dopo western blotting del campione della linea 1.

3.5 Trattamento con la trombina e separazione di hOCTN2

La proteina purificata, è stata incubata con la trombina al fine di separare la proteina di interesse, hOCTN2 dalla proteina di fusione GST, essendo presente una sequenza riconosciuta da tale enzima tra le due sequenze proteiche.

È stato ottimizzato il tempo di reazione per ottenere la completa separazione e, come è possibile osservare nella figura 8, la si ottiene dopo 4 ore di incubazione a 25°C con 0.1 U di trombina.

La frazione digerita con la trombina è stata, successivamente, sottoposta a cromatografia per esclusione molecolare e, come mostrato nella figura 9, completamente separata da GST. Al termine della procedura di purificazione, sono stati ottenuti 0.2 mg di proteina purificata per litro di coltura cellulare.

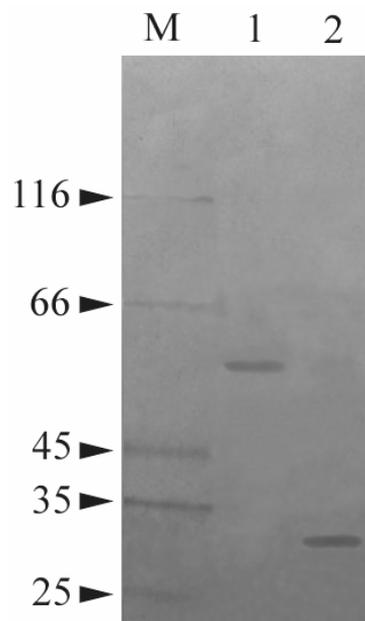


Figura 9 Purificazione della proteina over-espressa hOCTN2. Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1 hOCTN2; linea 2, GST.

3.6 Over-espressione e purificazione di hOCTN2(R2K)

Allo scopo di over- esprimere il trasportatore hOCTN2, senza la proteina di fusione GST, è stata utilizzata un'altra strategia basata sulla conoscenza della frequenza di utilizzo di determinati codoni in *E. coli* rispetto a quello degli organismi eucariotici. Nel caso specifico è stato cambiato il secondo codone del cDNA codificante per hOCTN2 (il wild-type CGG con la tripletta AAA). Tale cambiamento ha condotto ad una sostituzione conservativa dell' amminoacido arginina in lisina; si tratta, infatti, di una mutazione che non produce variazioni nel rapporto struttura/ funzione.

Il cDNA di hOCTN2 è stato, successivamente, clonato all'interno del vettore di espressione pET-21a(+). Il plasmide ricombinante ottenuto è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS, con conseguente over-espressione della proteina di interesse. La migliore condizione di espressione si riscontra, come evidenziato in figura 10, dopo 4 ore di induzione della sintesi proteica, con IPTG 0.1 mM alla temperatura di 28°C.

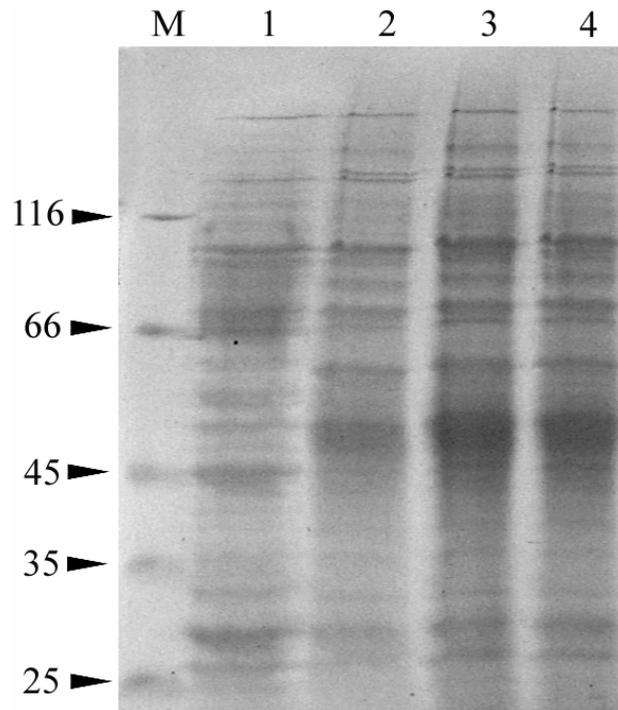


Figura 10 Espressione del costrutto ricombinante pET21a(+)-hOCTN2 in *E.coli* Rosetta (DE3)pLysS. Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1, lisato cellulare non indotto (30 μ g), linee 2-4, pellet della frazione insolubile (30 μ g) dopo 1, 2, e 4 ore dopo l'induzione della sintesi proteica rispettivamente.

Anche in questo caso, tuttavia, la proteina over- espressa è presente nella frazione insolubile del lisato indotto. La strategia di purificazione utilizzata nel caso di tale trasportatore è, pressoché, identica a quella messa a punto per il costrutto GST-hOCTN2. Le differenze sperimentali riguardano, principalmente, l'utilizzo di un pH differente dei tamponi (pH 8.0 anziché pH 8.5) e della concentrazione di imidazolo nel tampone di eluizione (100 mM anziché 50 mM).

Come mostrato nella figura 11, la massa molecolare apparente del trasportatore purificato risulta essere 54 kDa, coincidente con il peso molecolare della proteina ottenuta dal costrutto GST-hOCTN2, in seguito a digestione enzimatica.

La presenza di hOCTN2 all'interno del lisato cellulare indotto è stata verificata anche mediante immunodecorazione, utilizzando un anticorpo diretto contro la coda di poli-istidina (figura 11).

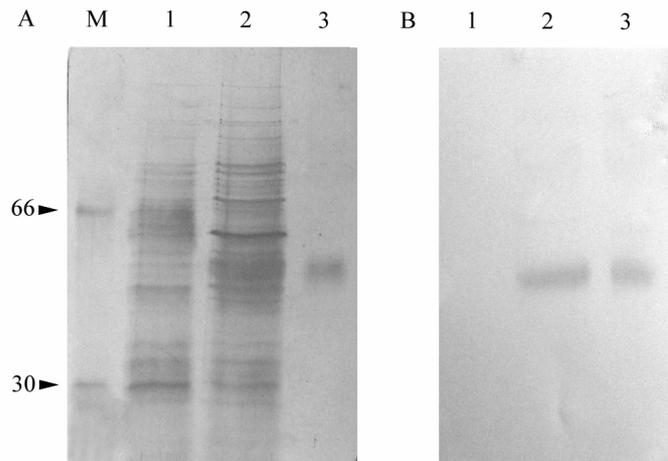


Figura 11 Purificazione della proteina hOCTN2(R2K). Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. (A) Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1, lisato cellulare non indotto (30 μ g); linea 2, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare (30 μ g) corrispondente la linea 4 della figura 10; linea 3, hOCTN2 purificata (3 μ g). (B) Immunodecorazione DAB utilizzando un anticorpo anti-His (1:1000) su membrana PVDF dopo western blotting dei campioni delle linee 1-3.

La resa totale della proteina purificata in questo caso risulta essere 3.5 mg per litro di coltura cellulare.

4. Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state messe a punto due tecniche per l' over-espressione in batteri di proteine umane di membrana plasmatica.

A partire dal cDNA di hOCTN1, isolato da fibroblasti umani, sono stati costruiti due diversi vettori di espressione ricombinanti e la proteina codificata è stata espressa in due diversi ceppi di *E. coli*. Il ceppo batterico Rosetta(DE3) è particolarmente utile per l'espressione di proteine umane, in quanto contiene tRNA specifici per codoni umani che sono normalmente presenti a livelli molto bassi in *E. coli* wild-type. Il primo risultato, ottenuto con il costrutto PET-28a (+)-hOCTN1, non è stato soddisfacente. Ciò può essere dovuto, tra altri fattori, alla eccessiva lunghezza della porzione N-terminale della proteina. Per questo motivo, è stato utilizzato un diverso plasmide (pH6EX3) che ha permesso di ridurre la lunghezza della porzione N-terminale, pur conservando la coda di poli-istidina utile per la purificazione. Il pH6EX3-hOCTN1 ha permesso di ottenere una considerevole quantità di proteina espressa, visibile su SDS-Page come una banda netta. L'efficienza di over-espressione è aumentata, ulteriormente, utilizzando un diverso ceppo cellulare di *E.coli*, chiamato RosettaGami2(DE3)pLysS, caratterizzato da una ridotta proteolisi intracitoplasmatica e particolarmente consigliato per l'espressione di proteine che richiedono la formazione di ponti disolfuro per il corretto ripiegamento.

Questa caratteristica potrebbe essere utile per l'espressione ed il folding di hOCTN1, in quanto questo trasportatore contiene 7 residui di Cys, alcuni dei quali possono essere coinvolti nella formazione di ponti di disolfuro. L' efficienza di espressione cioè, la quantità di OCTN1 espresso rispetto alle proteine totali, è risultata essere più alta in cellule indotte a bassa temperatura. La sintesi più lenta delle proteine, probabilmente, riduce la potenziale tossicità dell'espressione eterologa di proteine idrofobiche all'interno dei batteri. La massa molecolare

apparente della proteina over-espressa è risultata essere leggermente inferiore rispetto alla massa teorica molecolare della proteina ricombinante, calcolata sulla base della composizione amminoacidica. Questa discrepanza può essere dovuta alla elevata idrofobicità della proteina espressa rispetto alle proteine marker molecolari, che ne influenza la migrazione. In letteratura sono presenti alcuni casi di proteine di membrana espresse in batteri che hanno evidenziato una migrazione su gel più veloce rispetto al normale (Tate et al 2003, Tate et al 1998, Wu et al 2008, Keller et al 2008, Rath et al 2009). Inoltre, la proteina contiene tre residui Cys in porzioni presumibilmente transmembrana, due dei quali possono trovarsi nelle immediate vicinanze sulla base del modello topologico previsto per la proteina in esame, ottenuto mediante l'analisi del profilo idropatico (Fig. 6). Questi residui di Cys sono abbastanza vicini per formare ponti disolfuro in condizioni lievemente riducenti, contribuendo alla riduzione della massa molecolare apparente della proteina (Fig. 5). Questo può anche influenzare il legame dell' SDS alla proteina e, quindi, la sua migrazione (Rath et al 2009). La proteina over-espressa è stata ritrovata nella frazione insolubile del lisato cellulare, per cui è risultato molto importante ottimizzare la condizione di solubilizzazione per eseguire le successive fasi di purificazione. Per solubilizzare la proteina di membrana over-espressa, sono stati utilizzati diversi tipi di detergenti, non-ionici e ionici forti. Purtroppo, i detergenti non ionici hanno dato un'efficienza di solubilizzazione molto bassa per hOCTN1. Questo era prevedibile, poiché i corpi di inclusione, in cui la proteina è contenuta, sono spesso insolubili in detergenti non ionici (Bane et al 2007). Una condizione di solubilizzazione è stata ottenuta utilizzando Sarkosyl 0,8%, concentrazione che può essere tollerata dalla colonna cromatografica al Nichel. L'aggiunta di urea al buffer di solubilizzazione, come precedentemente descritto per le altre proteine di

membrana (Rogl et al 1998), ha permesso di solubilizzare in modo efficiente le proteine da cromatografare sulla colonna al Nichel. Il trasportatore hOCTN1 è stato eluito in grande quantità con un tampone contenente Triton X-100 e imidazolo. È interessante notare che la proteina presente nel lisato cellulare non è solubile in Triton X-100, mentre la proteina purificata diviene solubile in tale detergente. Ciò suggerisce la possibilità di un parziale ripiegamento della proteina dopo denaturazione con urea e Sarkosyl e successiva lenta diluizione su colonna degli agenti denaturanti. La purificazione di hOCTN1 in una forma solubile permetterà in futuro di effettuare studi di tipo strutturale. Inoltre, la disponibilità del trasportatore hOCTN1 in forma pura consentirà di chiarire le proprietà funzionali dopo ricostituzione in liposomi. In seguito sono stati ottenuti 2 mg di proteina con purezza superiore al 97 %, inviati al Biochemie-Zentrum dell' università di Heidelberg con il quale siamo in collaborazione per gli studi strutturali.

Per quanto riguarda il trasportatore hOCTN2, è stata utilizzata la stessa procedura ottimizzata per hOCTN1. Questa procedura, purtroppo, non ha portato a risultati. Pertanto, sono stati utilizzati numerosi plasmidi e diversi ceppi di *E. coli* per il clonaggio e l'espressione di hOCTN2, ma senza alcun successo. L'unica condizione in cui il trasportatore è over-espressione si ha inserendo la proteina di fusione GST a monte della sequenza codificante per hOCTN2. Il costrutto proteico GST-hOCTN2 ottenuto si sarebbe potuto utilizzare per la purificazione con resina agarosio-glutazione, utilizzando un protocollo di purificazione in condizioni native. Tuttavia, il costrutto GST-hOCTN2 è stato recuperato nella frazione insolubile del lisato cellulare solubilizzabile solo con detergenti ionici denaturanti. La proteina ricombinante, pertanto, non poteva essere purificata

mediante tale procedura, in quanto anche la proteina di fusione GST sarebbe stata in forma denaturata e non avrebbe legato la colonna.

Poiché l'introduzione della GST si è rivelata utile per l'espressione di hOCTN2, è stato disegnato un secondo costrutto che, oltre alla GST, contiene anche una coda di 6 His, utile per purificare la proteina in uno stato denaturato. Il costrutto over-espresso è stato, in seguito, purificato anche in condizioni denaturanti usando una resina cromatografia al Nichel. La proteina over-espressa è stata purificata con successo e trattata con trombina per idrolizzare il legame fra hOCTN2 e GST. Per separare le due proteine è stata eseguita una cromatografia per esclusione molecolare.

Il trasportatore over-espresso presente nel lisato cellulare batterico, anche in questo caso, è risultato essere insolubile in detergenti ionici ma, dopo purificazione è diventato solubile in Triton X-100. Ciò è probabilmente dovuto al ripiegamento della proteina, come descritto in precedenza per la purificazione di hOCTN1. La resa complessiva di questa procedura è stata bassa, probabilmente a causa delle numerose fasi di purificazione necessarie per ottenere hOCTN2. Una strategia completamente diversa è stata utilizzata per ottimizzare l'espressione della proteina senza tag. È noto, statisticamente, che *E. coli* utilizza codoni selezionati nella seconda posizione del DNA codificante (Niimura et al 2003). Partendo da questa osservazione abbiamo progettato la mutazione del cDNA di OCTN2 sostituendo il secondo codone CGG con una tripletta, più frequente in seconda posizione nei geni di *E. coli*. Il codone scelto per questo scopo è stato AAA, che porta ad una sostituzione conservativa del secondo aminoacido di OCTN2 (Arg-Lys). Il cDNA mutato è stato over-espresso in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. La proteina ottenuta è stata purificata utilizzando la stessa procedura descritta per il costrutto GST-hOCTN2. Il rendimento, in questo caso, è stato

maggiore rispetto a quello ottenuto per il costrutto GST-hOCTN2 e hOCTN2 purificato è diventato solubile in Triton-X100.

5. Bibliografia

Abramson et al (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli* Science 301(5633):610-615.

Allen et al (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174, 6938-47.

Asano et al (1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem.* 266(36):24632-24636.

Bane et al (2007) Expression and purification of milligram levels of inactive G-protein coupled receptors in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 52, 348-55.

Baneyx (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411-21.

Bentley et al (1990) Optimal induction of protein synthesis in recombinant bacterial cultures. *Ann N Y Acad Sci* 589, 121-38.

Berman et al (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* 28: 235-242.

Branden et al (1999) Introduction to Protein Structure. *New York: Garland*, (pp. 374-376).

Brutovetsky (1994) The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H⁺ transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. *J Biol Chem.* 269(44):27329-27336.

Brutovetsky (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry.* 35(26):8483-8488.

Cai et al (2005) The role of N-glycosylation in the stability, trafficking and GABA-uptake of GABA-transporter 1. Terminal N-glycans facilitate efficient GABA-uptake activity of the GABA transporter. *FEBS J.* 272(7):1625-1638.

Carrio et al (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* 96, 3-12.

Carrio et al (2005) Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol* 187, 3599-601.

Changet al (2002) Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol* 45, 289-306.

Chen et al (2003) DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 32, 221-31.

Daley et al (2005) Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* 308, 1321-3.

Derman et al (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262, 1744-7.

Di Virgilio et al (1989) Organic-anion transport inhibitors to facilitate measurement of cytosolic free Ca²⁺ with fura-2. *Methods Cell Biol.* 31:453-462.

Diamond (1987) Adaptive regulation of intestinal nutrient transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2242-2245.

Dierks et al (1990a) The mitochondrial aspartate/glutamate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents. *Biochim Biophys Acta.* 1028(3):268-280.

Dierks et al (1990b) Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a performed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport. *Biochim Biophys Acta.*1028(3):281-288.

Diop et al (2005) N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry.* 44(14):5420-5429.

Dubendorff et al (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219, 45-59.

Dumon-Seignovert et al (2004) The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* 37, 203-6.

expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-30.

F. Baneyx et al (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22, 1399-408.

Graslund et al (2008) Protein production and purification. *Nat Methods* 5, 135-46.

Guzman et al (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177, 4121-30.

Hayashi et al (2005) Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology*. 41(4):916-924.

Hoffmann et al (2002) Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol Bioeng* 80, 313-9.

Hoffmann et al (2004) Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89, 73-92.

Hopkins et al (2002) The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1, 727-30

Hosoyamada et al (2004) Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*. 15(2):261-268.

Hruz et al (2000) Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 11 of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Biochemistry*. 39(31):9367-9372.

Huang et al (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301(5633):616-620.

Huizing et al (1997) Cloning of the Human Carnitine-Acylcarnitine Carrier cDNA and Identification of the molecular defect in a patient. *Am J Hum Genet* 61:1239-1245.

Indiveri et al (1998) Bacterial overexpression, purification, and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 249(3): 589-594.

Iost et al (1995) The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J* 14, 3252-61.

Iost et al (1992) Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes *in vivo*. *J Bacteriol* 174, 619-22

Jack et al (1996) An optimal host for expression of DNA-processing enzymes via T7 RNA polymerase. *New England Biolabs internal*.

Jermutus et al (1998) Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Curr Opin Biotechnol* 9, 534-48.

Kasahara et al (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J* 315:177-182.

Keller et al (2008) Cell free expression and functional reconstitution of eukaryotic drug transporters, *Biochemistry* 15 4552–4564.

Kiefer (2003) In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1610, 57-62.

Kolb et al (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* 62, 749-95.

Kramer et al (1986) Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column. *Biochim. Biophys. Acta* 863:289-296.

Krupka (1994) Interpreting the effects of site-directed mutagenesis on active transport systems. *Biochim Biophys Acta* 1193(1):165-178.

Lahjouji et al (2001) Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency, *Mol Genet Metab.* 73 287-297

- Lee AG (2003)** Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612:1-40
- Lewis et al (1996)** Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271, 1247-54.
- Li et al (2004)** The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J Biol Chem.* 279(20):21012-21020. Epub 2004 Mar 15.
- Lian et al (2008)** Efficient expression of membrane-bound water channel protein (Aquaporin Z) in *Escherichia coli*, *Protein Pept. Lett.* 15 687–691.
- Makarova et al (1995)** Transcribing of *Escherichia coli* genes with mutant T7 RNA polymerases: stability of *lacZ* mRNA inversely correlates with polymerase speed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12250-4.
- Makrides (1996)** Strategies for achieving high-level overexpression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60, 512-38.
- Mawe (1965)** The exchange of ¹⁴C-glucose across the membrane of the human erythrocyte. *J Cell Physiol.*66(1):95-103.
- McRee (1993)** Practical Protein Crystallography. *San Diego: Academic Press*, (pp. 1-23).
- Miroux et al (1996)** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289-98
- Moffatt et al (1987)** T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49, 221-7.
- Niimura et al (2003)** Comparative analysis of the base bias at the gene terminal portions in seven eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 31, 5195-5201
- Nunez et al (1994)** Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of glycine transporter. *J Biol Chem.* 269(24):16920-16924.
- Palacin et al (2005)** The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology* 20:112-24. Review.

Palmieri et al (1995) Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol.* 260:349– 369.

Pao et al (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):1-34. Review.

Pebay-Peyroula et al (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426(6962):39-44.

Pochini et al (2004) Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1661 78-86.

Pochini et al (2009) Inactivation by omeprazole of the carnitine transporter (OCTN2) reconstituted in liposomes, *Chem. Biol. Interact*, 179 394-401

production of the serotonin transport, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 141–153.

Quick et al (2003) Employing *Escherichia coli* to functionally express, purify, and characterize a human transporter. *PNAS.* 99(13):8597–8601.

Rath et al (2009) Detergent binding explains anomalous SDS–PAGE migration of membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 1760–1765.

Reithmeier (1993) The erythrocyte anion transporter (band 3). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 515-523.

Rhodes (1993) Crystallography Made Crystal Clear. *San Diego: Academic Press*, (pp. 8-10, 29-38).

Ringquist et al (1992) Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol Microbiol* 6, 1219-29.

Rogers et al (2003) Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 308(3):422-426.

Rogl et al (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography, *FEBS Lett.* 432 21–26.

Saier (1999) Eukariotic Transmembrane Solute Transport System. *International Review of Cytology* 190:60-136.

Saurin et al (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 48(1):22-41.

Schwarz et al (1994) Ion channel properties of the reconstituted chloroplast triose phosphate/phosphate translocator. *J Biol Chem.*269(47):29481-29489.

Sharom (1997) The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and

Siegele et al (1997) Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8168-72.

Stein (1967) The movement of molecules across cell membranes. Academic Press New York.

Straumann et al (2006) Effects of N-linked glycosylation on the creatine transporter. *Biochem J.* 393:459-469

Studier (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219, 37-44.

Studier (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207-34.

Studier et al (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level

Tamai et al (1997) Cloning and characterization of novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1, *FEBS* 419 107-111

Tanaka et al (2004) Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. *J Biol Chem.* 279(15):14961-14966.

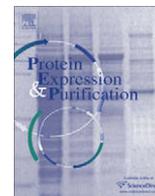
Tate et al (1994) The effect of N-linked glycosylation of activity of the Na- and Cl- dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells, *J. Biol. Chem.* 269 26303–26310.

Tate et al (2003) Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the their modulation of activity. *Biochem Soc Trans.* 3:1088-1096

Tulinsky (1999) "The Protein Structure Project, 1950-1959: First Concerted Effort Of a Protein Structure Determination In the U.S." *The Rigaku Journal.* 16

- Valax et al (1993)** Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnol Prog* 9, 539-47
- Ventura et al (2006)** Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol* 24, 179-85.
- Wallmeier et al (1992)** Insight into the Structure of the Chloroplast Phosphate Translocator Protein. In “Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes” (D.T. Cooke and D.T. Clarkson, eds), Plenum, New York.
- Wang et al (1999)** Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 96:2356-2360.
- Weber et al (2002)** Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol Bioeng* 80, 320-30
- Weiss et al (2002)** Purification and characterization of the human adenosine A2a receptor functionally expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 269, 82-92.
- Wilkinson et al (1991)** Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 9, 443-8.
- Wuu et al (2008)** High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 1237–1250.
- Wycuff et al (2000)** Generation of an AraC-*araBAD* promoterregulated T7 expression system. *Anal Biochem* 277, 67-73
- Yabuuchi et al (1999)** Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 768–773
- Zhang et al (2008)** Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6, 222-33

6. Pubblicazioni



Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN1 transport protein

Michele Galluccio^a, Lorena Pochini^a, Linda Amelio^a, Rosita Accardi^b,
Massimo Tommasino^b, Cesare Indiveri^{a,*}

^aDepartment of Cell Biology, University of Calabria, Via P. Bucci 4c, 87036 Arcavacata di Rende (CS), Italy

^bInfections and Cancer Biology Group, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 69372 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2009

and in revised form 23 June 2009

Available online 28 June 2009

Keywords:

OCTN1

E. coli

Over-expression

Purification

ABSTRACT

The hOCTN1 amplified from skin fibroblast RNA was cloned in pET-28a(+) or in pH6EX3 plasmid. The encoded recombinant hOCTN1 resulted in a 6-His tagged fusion protein with a 34 or 21 amino acid extra N-terminal sequence in the pET-28a(+)-hOCTN1 or in the pH6EX3-hOCTN1 constructs, respectively. Both constructs were used to express the hOCTN1 in *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS. The best over-expression was obtained with the pH6EX3-hOCTN1 after 6 h of induction with IPTG at 28 °C. The expressed protein with an apparent molecular mass of 54 kDa, was collected in the insoluble fraction of the cell lysate. Further improvement was obtained using the *E. coli* RosettaGami2(DE3)pLysS strain to express the protein encoded by pH6EX3-hOCTN1. After 6 h of induction with IPTG at 28 °C, hOCTN1 accounted for 30% of the total protein in the insoluble pellet. This protein fraction was washed with Triton X-100 and deoxycholate, solubilized with a buffer containing 0.8% Sarkosyl, 3 M urea and applied to a Ni²⁺-chelating chromatography column. The homogeneously purified hOCTN1 was eluted with a buffer containing 50 mM imidazole, 0.1% Triton X-100 and 50 mM 2-mercaptoethanol. A yield of about 3 mg purified protein per liter of cell culture was obtained.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Genes coding for membrane proteins represent about one fourth of the protein coding regions of sequenced genomes [1]. Membrane transporters are included in this class of proteins since all of them possess variable number of hydrophobic membrane spanning domains. Transporters are involved in nutrient uptake, elimination of metabolites and regulation of the homeostasis of several compounds which are essential for the life of cells and of whole organisms; thus, defects of the function of transporters are involved in human pathologies [2–7]. The molecular studies of transport systems are hampered by their insolubility in water and are particularly difficult in the case of higher eukaryote transporters which cannot be easily over-expressed in bacteria. These problems limit both the studies of the functional properties of transporters and the determination of the tertiary structures. Among the transporters which share importance in the cell metabolism and involvement in human pathology there is OCTN1 (SLC22A4). Defects of this transporter are associated with the Crohn disease [8]. This transporter belongs to the OCTN protein subfamily which includes three members, namely OCTN1, OCTN2 and OCTN3 [9]. These proteins share more than 66% identity with

each other. The main functional properties of the OCTN1 transporter have been studied in intact oocytes or HEK293 cell systems, expressing the transporter in minute amount. In these systems it was found that OCTN1 catalyzed a pH dependent transport of tetraethylammonium (TEA)¹. The transport was electroneutral and presumably driven by a counterflux of protons which balanced the positive charge of TEA [10]. The transport activity of OCTN1 was inhibited by several pharmacological compounds like cimetidine, quinine, verapamil and others [11]. More recently it was found that the main physiological substrate of OCTN1 is ergothioneine, which is transported in a sodium dependent mode [12]. In contrast, other authors showed that OCTN1 transported carnitine and was localized in the inner mitochondrial membrane [13]. Thus, some properties concerning the function and the biogenesis of this transporter are still controversial. So far, no examples of strategies of large scale over-expression and/or purification of the proteins belonging to the OCTN subfamily have been reported. In this paper the over-expression in *Escherichia coli* and the large scale purification to homogeneity of the human OCTN1 protein are described. This strategy represents the starting point for structural studies and for further functional characterization of the transporter.

* Corresponding author. Fax: +39 0984 492911.

E-mail address: indiveri@unical.it (C. Indiveri).

¹ Abbreviation used: TEA, tetraethylammonium.

Materials and methods

Materials

All chemicals and the Anti-His antibody (“Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase antibody produced in mouse” A7058) were from Sigma–Aldrich, if not otherwise specified. pET-28a(+) plasmid, *E. coli* Rosetta(DE3) and RosettaGami2(DE3)pLysS strains were purchased from Novagen. Restriction endonucleases, other cloning reagents and prestained molecular mass standard proteins were purchased from Fermentas. pH6EX3 was kindly provided by Prof. M. Barile.

Cloning of cDNA coding for hOCTN1

Total RNA was isolated from primary human fibroblasts and reverse-transcribed. The 1656 bp cDNA corresponding to the encoding sequence for hOCTN1 (GenBank NM_003059) was amplified using the forward and reverse primers 5′-ATGCGGGACTACGACGAGGTGATCG-3′ and 5′-TCAGAATGCAGTTATTAGAACCTTG-3′, respectively. The amplified cDNA sequence was verified. Sequencing was performed three times by ABI 310 automated sequencer Applied Biosystems.

The full length cDNA coding for hOCTN1 was amplified using the forward and reverse primers 5′-CCGGATCCATGCGGGACTACGACGA-3′ and 5′-AAATAAGAATCCGGCCGCTCAGAATGCAGTTATT-3′, containing the BamHI and NotI sites, respectively and cloned in the BamHI/NotI sites of the pET-28a(+) expression vector. The resulting recombinant plasmid, defined as pET-28a(+)-hOCTN1, encoded a fusion protein corresponding to the hOCTN1 carrying the extra N-terminal sequence MGSSHHHHHSSGLVPRGS HMASMTGGQQMGRGS. Alternatively, the full length cDNA coding for hOCTN1 was amplified using the forward and reverse primers 5′-CCGGAATTCATGCGGGACTACGACGAGGT-3′ and 5′-CCGCTCAGTCAGAATGCAGTTATTAGAAC-3′ containing the EcoRI and XhoI sites, respectively and cloned in the EcoRI/XhoI sites of the pH6EX3 expression vector. The resulting recombinant plasmid, defined as pH6EX3-hOCTN1, encodes a fusion protein corresponding to the hOCTN1 carrying the extra N-terminal sequence MSPIHH HHHHLVPRGSEASNS.

Expression of recombinant hOCTN1 protein in *E. coli*

To obtain the recombinant hOCTN1 protein, the expression host *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS was transformed with the pET-28a(+)-hOCTN1 plasmid by calcium chloride treatment. Selection of transformed colonies was performed on LB-agar plates containing 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol. Cells carrying the recombinant plasmid were inoculated in 100 mL of LB medium (1% Bacto peptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) supplemented with 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol, and cultured overnight at 37 °C with rotary shaking (~200 rpm). Fifty milliliters portion of the cell culture was transferred to 0.5 L of fresh LB medium supplemented with 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol and in the middle of the logarithmic phase (0.5–0.7 O.D. at 600 nm wavelength), 0.4 mM IPTG (except when differently specified) was added to induce the expression of the recombinant protein. Alternatively, the expression host *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS or *E. coli* RosettaGami2(DE3) pLysS was transformed with the pH6EX3-hOCTN1 plasmid by calcium chloride treatment. Selection of transformed colonies was performed on LB-agar plates containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol and, only in the case of *E. coli* RosettaGami2(DE3) pLysS, 12.5 µg/mL tetracycline. Cells carrying the recombinant plasmid were inoculated in 100 mL of LB medium

(1% Bacto peptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol (and, in the case of *E. coli* RosettaGami2(DE3)pLysS, 12.5 µg/mL tetracycline), and cultured overnight at 37 °C with rotary shaking (~200 rpm). Fifty milliliters portion of the cell culture was transferred to 0.5 L of fresh LB medium supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol (and, in the case of *E. coli* RosettaGami2(DE3) pLysS, 12.5 µg/mL tetracycline) and, in the middle of the logarithmic phase, 0.4 mM IPTG (except when differently specified) was added to induce the expression of the recombinant protein. In all the cases, after the induction two portions of 0.25 L each of cells were grown at 28 and 37 °C, respectively. Every 2 h, fractions of 50 mL were harvested by centrifugation at 3000g for 10 min at 4 °C and the pellet stored at –20 °C. The bacterial pellet (about 0.4 g wet weight) was thawed on ice for 15 min and resuspended in 5 mL 50 mM Hepes/Tris pH 7.5 supplemented with 20 µL of protease inhibitor cocktail (P8849, Sigma–Aldrich) and 0.5 mM PMSF. Cells were disrupted by mild sonication at 4 °C (10 min in pulses of 1 s sonication, 1 s intermission). The soluble and the insoluble cell fractions were separated by centrifugation of the cell lysate at 12,000g for 30 min at 4 °C. The protein patterns of the cell lysate fractions were analyzed by SDS–PAGE.

Purification of recombinant hOCTN1

The insoluble fraction obtained as described above, was washed twice with 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 3% Triton X-100 and centrifuged at 12,000g for 10 min at 4 °C; the pellet was resuspended with 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 3% deoxycholate and centrifuged again at 12,000g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was washed with 100 mM Tris/HCl pH 8.0 and centrifuged at 12,000g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was solubilized with a buffer containing 3 M urea, 0.8% Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 for 5 min at 25 °C and centrifuged at 12,000g for 10 min at 4 °C. One milliliters of the supernatant was applied onto a column filled with His-select Ni-Chelating affinity gel (0.5 cm diameter, 3 cm height) pre-conditioned with 10 mL of a buffer containing 0.1% Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. The elution was performed with 25 mL of a buffer containing 0.1% Triton X-100, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM 2-mercaptoethanol and then 6 mL of the same buffer containing 10 mM imidazole and then 6 mL of the same buffer containing 50 mM imidazole. Forty eight fractions of 1 mL were collected. The purified protein was eluted in the fractions 43–45.

Other methods

Protein concentration was measured by the method of Lowry, modified for the presence of detergents [14]. Proteins were separated by SDS–PAGE on 12% polyacrylamide gels performed according to Laemmli [15], using the Hoefer SE260 mini-vertical unit and stained by Coomassie-brilliant blue.

Quantitative evaluation of Coomassie-stained protein bands was carried out using the Chemidoc imaging system equipped with Quantity One software (Bio-Rad). The theoretical molecular mass of protein was determined by the pI/pMW tool at the web site <http://www.expasy.org>.

Results

The 1656 bp hOCTN1 cDNA was amplified from total human skin fibroblast RNA using forward and reverse primers constructed on the 5′ and 3′ ends of the hOCTN1 cDNA (GenBank NM_003059). The amplified cDNA showed an electrophoretic mobility on aga-

rose gel corresponding to about 1700 bp, very close to its theoretical size. Upon sequencing, no mutations were found in the cDNA as compared to the deposited hOCTN1 sequence (not shown). To determine whether hOCTN1 could be expressed in *E. coli*, different vectors and host bacterial strains were used and the experimental conditions were varied. The isolated cDNA was amplified with forward and reverse primers containing the restriction sites Bam HI at 5' and Not I at 3' (see Materials and methods) for inserting it in the pET-28a(+) vector which has been previously used for the expression of membrane proteins [16]. The recombinant pET-28a(+)-hOCTN1 plasmid, encoding hOCTN1 fused with the 34 amino acid extra N-terminal sequence MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAS MTGGQQMGRGS, containing a 6-His tag, was used for heterologous expression of the protein in the *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS strain. To optimize the expression of hOCTN1, the time after induction by IPTG and the growth temperature were varied. The cell lysates obtained under the different conditions were separated in the soluble and the insoluble fractions by centrifugation. The insoluble fractions (inclusion bodies) were analyzed by SDS-PAGE. The presence of a diffused spot was observed in the fraction collected from the IPTG induced cells which was absent in the uninduced cell lysates (not shown). The presence of a non homogeneous protein spot suggested us to change the experimental conditions. Thus, hOCTN1 was cloned in the pH6EX3 vector which carries the coding sequence for a 6-His tag at the N-terminal end of the protein. The cDNA was amplified using forward and reverse primers carrying the restriction sites Eco RI and Xho I, respectively (see Materials and methods). The recombinant pH6EX3-hOCTN1 plasmid encoded hOCTN1 fused with the extra N-terminal 21 amino acid sequence MSPHHHHHHLVPRGSEASNS. This construct was used for heterologous expression of the protein in the *E. coli* Rosetta(DE3)-pLysS strain. Also in this case the time and temperature dependence was investigated in the attempt to improve the protein expression. The insoluble inclusion body fractions of cell lysates were analyzed by SDS-PAGE. As shown by Fig. 1, the presence of a heavily stained protein band was observed after induction by IPTG, which was absent in the uninduced control, without IPTG induction. The amount of protein increased with the time up to 6 h of induction at both the temperatures of growth. After this time no further increase of expression was observed (not shown). The best enrichment of the expressed protein with respect to the

bacterial ones was obtained at 28 °C. The apparent molecular mass was determined on the basis of the molecular mass of marker proteins (Fig. 1 lane M). Its value was 54 kDa, lower than the molecular mass of hOCTN1, 64.505 kDa calculated on the basis of the amino acid composition (see Materials and methods). The over-expressed protein could be identified as hOCTN1 (see Fig. 4). To optimize the expression of hOCTN1 in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS transfected with the pH6EX3-hOCTN1 construct, the IPTG concentration was varied from 0.1 to 1 mM. The best level of expression was obtained at 0.4 mM. At 1 mM a reduction of expressed protein amount with respect to the bacterial proteins was observed; no improvement of expression was obtained by decreasing the growth temperature (not shown). To further improve the expression of the hOCTN1 protein, the *E. coli* RosettaGami2(DE3)pLysS strain was transformed with the pH6EX3-hOCTN1 recombinant plasmid. As shown by Fig. 2, the amount of expressed protein was higher than in the preparation obtained with *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. The expression as in the other cases was better at 28 °C than at 37 °C (not shown). The expressed protein after 6 h induction accounted for about 30% of the total proteins, as determined by densitometry (see Table 1). The apparent molecular mass calculated from the SDS-PAGE was the same of that calculated in the case of expression in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS strain.

Solubilization and purification of the expressed hOCTN1

A main challenge of the membrane protein handling is their very low solubility in aqueous solutions. The solubility of the expressed hOCTN1 has been tested using detergents with different properties. The insoluble cell fractions from lysates were treated with Triton X-100, C₁₂E₈, dodecylmaltoside, deoxycholate, Sarkosyl, and SDS. All the detergents were used at a concentration of 3%. The suspensions obtained after treatment of the expressed protein (insoluble fraction from the cell lysates) with each of the detergents were centrifuged and the protein patterns of the supernatants analyzed by SDS-PAGE. Fig. 3 shows that, among the detergent tested, only Sarkosyl and SDS (Fig. 3, lanes 5 and 6) were effective in solubilizing the expressed protein, which was present in the lanes 5 and 6 at the apparent molecular mass of 54 kDa. These detergents were also tested at lower concentrations. It was found that the minimal concentrations of Sarkosyl and SDS which

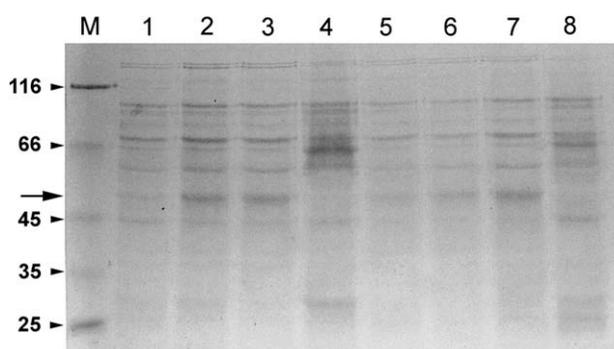


Fig. 1. Expression of recombinant pH6EX3-hOCTN1 in *E. coli* Rosetta(DE3). Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and methods. Lane M: molecular mass markers: β -galactosidase (116 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactate dehydrogenase (35 kDa), restriction endonuclease Bsp 98I (25 kDa); lanes 1, 2 and 3: pellets of the insoluble fraction of cell lysate (30 μ g), after 2, 4 and 6 h of IPTG-induction, respectively obtained at 37 °C; lane 4: pellet of the insoluble fraction of uninduced cell lysate (30 μ g) obtained at 37 °C; lanes 5, 6 and 7: pellets of insoluble fraction of cell lysate (30 μ g), after 2, 4 and 6 h of IPTG-induction, respectively obtained at 28 °C; lane 8: pellet of the insoluble fraction of uninduced cell lysate (30 μ g) obtained at 28 °C. The over-expressed protein is indicated by the arrow.

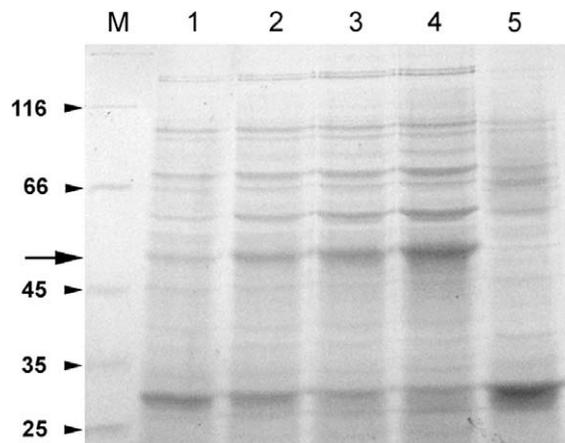


Fig. 2. Expression of recombinant pH6EX3-hOCTN1 in *E. coli* RosettaGami2(DE3). Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1; lanes 1, 2, 3 and 4: pellets of the insoluble fraction of cell lysate (30–50 μ g), after 1, 2, 4 and 6 h of IPTG-induction, respectively obtained at 28 °C; lane 5: pellet of the insoluble fraction of uninduced cell lysate (50 μ g) obtained at 28 °C. The over-expressed protein is indicated by the arrow.

Table 1

Purification of the OCTN1 protein. The specific concentration of OCTN1 in the various fractions was determined by quantitative evaluation of the Coomassie-stained protein bands using the Chemidoc imaging system equipped with Quantity One software (Bio-Rad). The indicated fractions corresponded to the cell lysate, the cell lysate after treatment with Triton X-100 and deoxycholate and the fraction 44 of the purification procedure (see also Fig. 4).

Fraction	Total protein (µg)	Spec. OCTN1 amount (% purity)	Purification (fold)	Total OCTN1 amount (µg)	Yield (%)
Lysate	400	30	1.0	120	100
Detergent treat.	190	45	1.5	86	72
Ni ²⁺ chelating	52	100	3.3	52	43

Seventy milligrams of wet weight cells were used in this preparation.

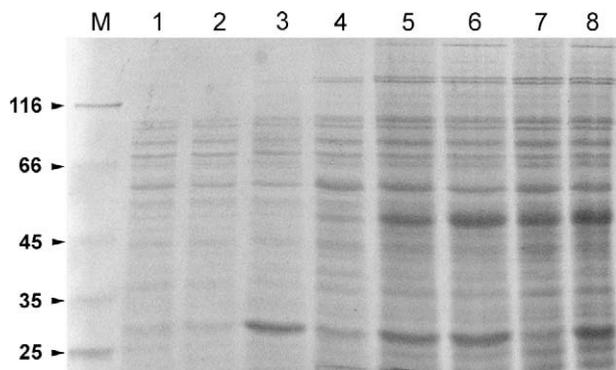


Fig. 3. Solubilization of the expressed hOCTN1. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1; lanes 1–8: over-expressed hOCTN1, corresponding to the protein of lane 4 of Fig. 2, solubilized with 3% of Triton X-100, C₁₂E₈, *n*-dodecyl- β -D-maltoside, deoxycholate, Sarkosyl, SDS, 0.5% SDS, 0.8% Sarkosyl, respectively (20–50 µg of total protein).

were still effective in solubilizing the expressed protein were 0.8% and 0.5% respectively (Fig. 3, lanes 7 and 8). To purify the protein, the different solubility of hOCTN1 in detergents have been exploited to partially enrich the over-expressed protein. The insoluble cell fraction was treated with 3% Triton X-100. The suspension was centrifuged and the pellet was treated with 3% deoxycholate. In the resulting pellet (Fig. 4A, lane 2), the expressed hOCTN1 was enriched with respect to the pellet of the cell lysate (Fig. 4A, lane 1), i.e., several bacterial proteins were removed by the pre-treatment with Triton X-100 and deoxycholate. The over-expressed protein accounted in the treated fraction (Fig. 4A, lane 2) for about 45% of the total proteins (Table 1). The final purification step was then performed using a Ni²⁺-chelating chromatography column. The enriched protein pellet (Fig. 4A lane 2) was solubilized with a buffer containing 0.8% Sarkosyl, 3 M urea (see Materials and methods). The solubilized protein was loaded onto the column. After washing with a buffer containing 20 mM Tris/Cl pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 200 mM NaCl, virtually all the proteins of bacterial origin were removed. Then the hOCTN1 was eluted with the same buffer added with 50 mM imidazole; it resulted as a single protein band on SDS-PAGE (Fig. 4, lane 3). All the buffers used in the various purification passages contained 50 mM 2-mercaptoethanol. The presence of SH reducing reagent was justified by the observation that the migration of the protein, i.e., the apparent molecular mass, was affected by the redox state of the Cys residues. As shown in Fig. 5, in the absence of 2-mercaptoethanol or in the presence of low concentration, the apparent molecular mass was about 40 kDa. The staining of the protein was weakened in the absence or at very low concentration of 2-mercaptoethanol; this

may indicate that a fraction of the protein did not enter the gel probably due to the formation of large molecular mass aggregates caused by disulfide cross-linking. In the presence of 50 or 100 mM 2-mercaptoethanol, the apparent molecular mass was higher, corresponding to that observed under the conditions of Figs. 1–3. Indeed, similar results were obtained using, instead of 2-mercaptoethanol, 50 or 100 mM DTE, which was present in the sample buffers of the Figs. 1–4. At high 2-mercaptoethanol concentration the apparent molecular mass of the OCTN1 was 61.7 kDa, slightly lower with respect to the theoretical mass of the protein. This strongly suggested that, under mild reducing conditions, the protein formed S–S bridge(s) which influenced the electrophoretic mobility, also in the presence of SDS. To confirm that the purified protein corresponded to the over-expressed hOCTN1, it was detected using an anti-His antibody. As shown in Fig. 4 B, a specific immunodetection of a protein band with the apparent molecular mass corresponding to that of the over-expressed protein was

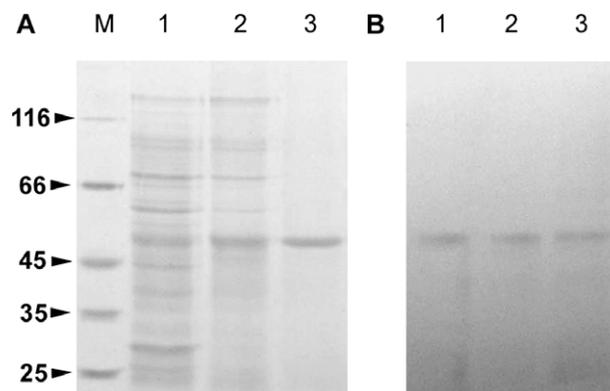


Fig. 4. Purification of the expressed hOCTN1. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and methods. (A) Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1. Lane 1: solubilized protein (40 µg), corresponding to the protein of lane 4 of Fig. 2; lane 2: protein of lane 1 after washing with 3% Triton X-100 and 3% deoxycholate (25 µg); lane 3: protein fraction 44 from the Ni-chelating chromatography column after acetone precipitation (15 µg). (B) 3,3'-diaminobenzidine immunodetection by anti-His antiserum (1:1000) of PVDF membrane after Western blotting of the same gel of (A).

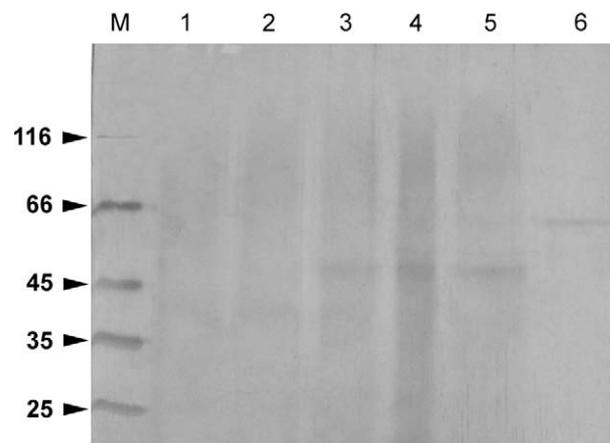


Fig. 5. Influence of 2-mercaptoethanol on the migration of the OCTN1 protein on SDS-PAGE. The sample buffer contained 2-mercaptoethanol rather than DTE. The purified OCTN1 (10 µg) was applied on the gel, without heating, in absence (lane 1) or in the presence of 1 mM (lane 2) 10 mM (lane 3) 50 mM (lane 4) 100 mM (lane 5) and 1 M (lane 6) 2-mercaptoethanol added to the sample buffer. The gel was stained as described in Materials and methods. (A) Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1.

insoluble in non-ionic detergents [22]. A milder solubilization condition for further manipulation of the protein was obtained using 0.8% Sarkosyl which is better tolerated by the Ni²⁺-chelating supports than SDS. The addition of 3 M urea to the solubilization buffer, as previously described for other membrane proteins [23], allowed to efficiently bind the protein to Ni²⁺-chelating column, from which hOCTN1 was specifically eluted in large scale with Triton X-100 and imidazole. Interestingly, the protein which was not soluble before the purification procedure, was then solubilized in 0.1% Triton X-100. This suggested the occurrence of refolding process after the denaturation by urea and Sarkosyl and the subsequent slow dilution of the denaturing agents, on column. The purification of hOCTN1 in a folded soluble form will allow structural studies. In addition, the availability of the purified hOCTN1 will also allow to define its functional properties, upon reconstitution in phospholipid bilayers.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministero dell'Università e della Ricerca (PRIN, FIRB), from University of Calabria and from La Ligue Contre le Cancer (Comités du Rhône, Drôme and Savoie), the Association pour la Recherche sur le Cancer, European Union (LSHC-2005-018704) and Association for International Cancer Research to MT.

References

- [1] E. Wallin, G. von Heijne, Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, *Protein Sci.* 7 (1998) 1029–1038.
- [2] M. Palacin, R. Estevez, J. Bertran, A. Zorzano, Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters, *Physiol. Rev.* 78 (1998) 969–1054.
- [3] K. Lahjouji, G.A. Mitchell, I.A. Qureshi, Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 73 (2001) 287–297.
- [4] H. Daniel, G. Kottra, The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology, *Pflügers Arch.* 447 (2004) 610–618.
- [5] E.M. Wright, E. Turk, The sodium/glucose cotransport family SLC5, *Pflügers Arch.* 447 (2004) 510–518.
- [6] A. Bröer, J.A. Cavanaugh, J.E. Rasko, S. Bröer, The molecular basis of neutral aminoacidurias, *Pflügers Arch.* 451 (2006) 511–517.
- [7] F. Palmieri, Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review, *Biochim. Biophys. Acta.* 1777 (2008) 564–578.
- [8] V.D. Peltekova, R.F. Wintle, L.A. Rubin, C.I. Amos, Q. Huang, X. Gu, B. Newman, M. Van Oene, D. Cescon, G. Greenberg, A.M. Griffiths, P.H. St. George-Hyslop, K.A. Siminovitch, Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease, *Nat. Genet.* 36 (2004) 471–475.
- [9] I. Tamai, R. Ohashi, J.I. Nezu, Y. Sai, D. Kobayashi, A. Oku, M. Shimane, A. Tsuji, Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40064–40072.
- [10] I. Tamai, H. Yabuuchi, J. Nezu, Y. Sai, A. Oku, M. Shimane, A. Tsuji, Cloning and characterization of novel human pH-dependent organic cation transporter, hOCTN1, *FEBS Lett.* 419 (1997) 107–111.
- [11] H. Yabuuchi, I. Tamai, J. Nezu, K. Sakamoto, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, A. Tsuji, Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 (1999) 768–773.
- [12] D. Gründemann, S. Harlfinger, S. Golz, A. Geerts, A. Lazar, R. Berkels, N. Jung, A. Rubbert, E. Schömig, Discovery of the ergothioneine transporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 5256–5261.
- [13] A.M. Lamhonwah, I. Tein, Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 1315–1325.
- [14] J.R. Dullea, P.A. Grieve, A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination, *Anal. Biochem.* 64 (1975) 136–141.
- [15] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [16] J. Lian, X. Fang, J. Cai, Q. Chen, Q. Zheng, L. Kai, Z. Xu, Efficient expression of membrane-bound water channel protein (Aquaporin Z) in *Escherichia coli*, *Protein Pept. Lett.* 15 (2008) 687–691.
- [17] C.J. Tate, J. Haase, C. Baker, M. Boorsma, F. Magnani, Y. Vallis, D.C. Williams, Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 (2003) 141–153.
- [18] C.G. Tate, R.D. Blakely, The effect of N-linked glycosylation on activity of the Na⁺- and Cl⁻-dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 26303–26310.
- [19] J.J. Wu, J.R. Swartz, High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 1237–1250.
- [20] T. Keller, D. Schwarz, F. Bernhard, V. Dotsch, C. Hunte, V. Gorboulev, H. Koepsell, Cell free expression and functional reconstitution of eukaryotic drug transporters, *Biochemistry* 15 (2008) 4552–4564.
- [21] A. Rath, M. Glibowicka, V.G. Nadeau, G. Chen, C.M. Deber, Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 1760–1765.
- [22] S.E. Bane, J.E. Velasquez, A.S. Robinson, Expression and purification of milligram levels of inactive G-protein coupled receptors in *E. coli*, *Prot. Expr. Pur.* 52 (2007) 348–355.
- [23] H. Rogl, K. Kosemund, W. Kühlbrandt, I. Collinson, Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography, *FEBS Lett.* 432 (1998) 21–26.
- [24] A.G. Lee, Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (2003) 1–40.

Editorial Manager(tm) for Molecular Biotechnology
Manuscript Draft

Manuscript Number: MOBI-D-10-00267

Title: Over-expression in E. coli and purification of the human OCTN2 transport protein.

Article Type: Research Papers

Keywords: OCTN2

E. coli

Over-expression

Purification

Codon Bias

Corresponding Author: Cesare Indiveri

Corresponding Author's Institution:

First Author: Michele Galluccio

Order of Authors: Michele Galluccio;Linda Amelio;Mariafrancesca Scalise;Lorena Pochini;Eckhard Boles;Cesare Indiveri

Abstract: The OCTN2 cDNA amplified from human skin fibroblast was cloned in pET-41a(+) carrying the glutathione S-transferase (GST) gene. The construct pET-41a(+)-hOCTN2 was used to express the GST-hOCTN2 fusion protein in E. coli Rosetta(DE3)pLysS. The best over-expression was obtained after 6 h of induction with IPTG at 28°C. The GST-hOCTN2 polipeptide was collected in the insoluble fraction of the cell lysate and showed an apparent molecular mass on SDS-PAGE of 85 kDa. After solubilization with a buffer containing 0.8 % Sarkosyl and 3 M urea the fusion protein was applied onto a Ni²⁺-chelating chromatography column. The purified GST-hOCTN2 was treated with thrombin and the hOCTN2 was separated from the GST by size exclusion chromatography. After the whole procedure a yield of about 0.02 mg purified protein per litre of cell culture was obtained. To improve the protein yield, hOCTN2 cDNA was subjected to codon bias. The second codon CGG was substituted with AAA; the substitution led to the mutation R2K in the hOCTN2 protein. hOCTN2(R2K) cDNA was cloned in pET-21a(+) carrying a C-terminal 6His tag. The resulting protein was expressed in E. coli Rosetta(DE3)pLysS and purified by Ni²⁺-chelating chromatography. A yield of about 3.5 mg purified protein per litre of cell culture was obtained with this procedure.

Suggested Reviewers: Celia Goulding
celia.goulding@uci.edu

Hartmut Wohlrab
wohlab@bbri.org

Tiziano Verri
tiziano.verri@unisalento.it

Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN2 transport protein.

Michele Galluccio^a, Linda Amelio^a, Mariafrancesca Scalise^a, Lorena Pochini^a, Eckhard Boles^b,
Cesare Indiveri^a

^a Department of Cell Biology, University of Calabria, Via P. Bucci 4c 87036 Arcavacata di Rende,
Italy

^b Institute of Molecular Biosciences, Goethe-University Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Str. 9,
60438 Frankfurt am Main, Germany

Correspondence to:

Cesare Indiveri,

Dipartimento di Biologia Cellulare

Università della Calabria

Via P.Bucci cubo 4c

87036 Arcavacata di Rende (CS)

Italy.

Tel.: +39-0984-492939

Fax: +39-0984-492911

e-mail: indiveri@unical.it

Michele Galluccio e-mail: mgalluccio@unical.it

Linda Amelio e-mail: linda.amelio@unical.it

Mariafrancesca Scalise e-mail: mariafrancesca.scalise@unical.it

Lorena Pochini e-mail: pochini@unical.it

Eckhard Boles e-mail: e.boles@bio.uni-frankfurt.de

Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN2 transport protein.

Abstract

The OCTN2 cDNA amplified from human skin fibroblast was cloned in pET-41a(+) carrying the glutathione S-transferase (GST) gene. The construct pET-41a(+)-hOCTN2 was used to express the GST-hOCTN2 fusion protein in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. The best over-expression was obtained after 6 h of induction with IPTG at 28°C. The GST-hOCTN2 polypeptide was collected in the insoluble fraction of the cell lysate and showed an apparent molecular mass on SDS-PAGE of 85 kDa. After solubilization with a buffer containing 0.8 % Sarkosyl and 3 M urea the fusion protein was applied onto a Ni²⁺-chelating chromatography column. The purified GST-hOCTN2 was treated with thrombin and the hOCTN2 was separated from the GST by size exclusion chromatography. After the whole procedure a yield of about 0.2 mg purified protein per litre of cell culture was obtained. To improve the protein yield, hOCTN2 cDNA was subjected to codon bias. The second codon CGG was substituted with AAA; the substitution led to the mutation R2K in the hOCTN2 protein. hOCTN2(R2K) cDNA was cloned in pET-21a(+) carrying a C-terminal 6His tag. The resulting protein was expressed in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS and purified by Ni²⁺-chelating chromatography. A yield of about 3.5 mg purified protein per litre of cell culture was obtained with this procedure.

1. Introduction

Membrane proteins represent a significant fraction of proteomes of all organisms (1). Among the membrane proteins, transporters play essential roles in living organisms since they are involved in nutrient uptake, elimination of catabolites and regulation of the homeostasis of several cofactors and metabolites. That transport systems are essential for life is demonstrated by the occurrence of severe pathologies, which are caused by defects of transporter coding genes (2-7). The chemico-physical properties of membrane proteins, like insolubility in water and propensity to aggregate, make them

difficult to handle. These properties limit both functional and structural studies of transporters and, in general, of membrane proteins. One of the main challenge of the study of membrane proteins from mammals, is the difficulty in heterologous expression. This problem is more evident in bacterial hosts which, indeed, are the most suitable to obtain large scale preparations of proteins for structural studies (8). Recently, the over-expression in *E. coli* of the human OCTN1 transporter was obtained (9) with a yield of 3 mg purified protein per litre of cell culture. This transporter belongs to a small protein subfamily whose members, OCTN1, OCTN2 and OCTN3 have been identified only in higher mammals (10); OCTN3 has still not been identified in *H. sapiens*. The OCTN2 member of the subfamily is the most widely characterized at the functional level. After studies in brush-border vesicles (11), this transport system has been cloned and functionally characterized in intact cell systems expressing the transport protein in minute amount (10, 12). It catalyses a sodium-dependent carnitine transport which is inhibited by acylcarnitines, betaine, choline and tetraethylammonium. The carnitine OCTN2 transporter extracted from rat kidney has also been studied in proteoliposomes, in which the functional aspects found in cells have been confirmed and novel properties have been revealed (13). Using SH specific chemical reagents in the reconstituted system, it has been found that the OCTN2 transporter possesses extra cytoplasmic Cys residues. One or more of these residues represent the target of omeprazole which inactivates the transporter; this finding explains some of the side effects of the drug (14). OCTN2 is widely expressed in several tissues and, hence, it is involved in the regulation of the homeostasis of carnitine in mammals. Defects of the OCTN2 gene have been reported to be the cause of primary carnitine deficiency, a syndrome characterized by several symptoms including cardiomyopathy, progressive muscle weakness and non ketotic hypoglycemia (3). It is of great interest to obtain the over-expression of the human orthologue of OCTN2 and its large scale purification to allow structural studies and further functional analysis of the protein to define its role in metabolism and

relationships with pathologies. To express the transport protein in large scale, different strategies were employed, which are described in this work.

2. Materials and Methods

2.1. Materials.

All chemicals, HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel (P6611) and the Anti-His antibody ("Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase antibody produced in mouse" A7058) were from Sigma–Aldrich, pET vectors, *E. coli* Rosetta(DE3) and RosettaGami2(DE3)pLysS and other strains from Novagen, *E. coli* C41(DE3), C43(DE3), BL21(DE3) from Lucigen, restriction endonucleases, other cloning reagents from Fermentas, Profinity IMAC resin Ni²⁺ charged resin from BioRad.

2.2. Cloning of cDNA coding for hOCTN2.

Total RNA was isolated from primary human fibroblasts and reverse-transcribed. The 1674 bp cDNA corresponding to the encoding sequence for hOCTN2 (GenBank NM_003060) was amplified using the forward and reverse primers 5'- ATGCGGGACTACGACGAGGTGACCG-3' and 5'- TTAGAAGGCTGTGCTTTTAAGGATT-3', respectively. The amplified cDNA sequence was verified. Sequencing was performed three times by ABI 310 automated sequencer Applied Biosystems. The full length cDNA coding for hOCTN2 was amplified using the forward and reverse primers 5'- GCGGATCCATGCGGGACTACGACGAG-3' and 5'- CCCAAGCTTTTAGAAGGCTGTGCTTTT-3', containing the BamHI and HindIII sites, respectively and cloned in the BamHI/HindIII sites of the pET-41a(+) expression vector. The resulting recombinant plasmid, defined as pET-41a(+)-hOCTN2, encoded a fusion protein corresponding to the hOCTN2 carrying the extra N-terminal sequence containing the GST tag, 6His tag and a S tag.

2.3. Expression of recombinant GST-hOCTN2 protein in E. coli and purification.

To obtain the recombinant hOCTN2 protein, the expression host *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS was transformed with the pET-41a(+)-hOCTN2 construct by calcium chloride treatment. Selection of transformed colonies was performed on LB-agar plates containing 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol. Cells carrying the recombinant plasmid were inoculated in 100 mL of 2x YT medium (1.6% Bacto peptone, 1% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) supplemented with 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol, 1M sorbitol, 2.5 mM betaine and cultured overnight at 37 °C with rotary shaking (~ 200 rpm). 50 mL aliquot of the cell culture was transferred to 0.5 L of fresh 2x YT medium supplemented with 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol, 1M sorbitol, 2.5 mM betaine and in the middle of the logarithmic phase (0.5-0.7 O.D. at 600 nm wavelength), 0.4 mM IPTG was added to induce the expression of the recombinant protein and the temperature was lowered to 28 °C. In all the cases, after the induction two aliquots of 0.25 L each of cells were grown at 28 °C and 37 °C, respectively. Every two hours, fractions of 50 ml were harvested by centrifugation at 3,000g for 10 min at 4 °C and the pellet stored at -20 °C. The bacterial pellet (about 0.4 g wet weight) was thawed on ice for 15 min and resuspended in 5 mL 20 mM Hepes/Tris pH 7.5 supplemented with 20 µL of protease inhibitor cocktail (P8849, Sigma–Aldrich) and 0.5mM PMSF. Cells were disrupted by mild sonication at 4 °C (10 min in pulses of 1 s sonication, 1 s intermission). The soluble and the insoluble cell fractions were separated by centrifugation of the cell lysate at 12,000g for 30 min at 4 °C. The protein patterns of the cell lysate fractions were analyzed by SDS-PAGE. The insoluble fraction obtained as described above, was incubated for 15 min at 20 °C and 1000 rpm in Eppendorf thermomixer in 100 mM DTE and then solubilized with a buffer containing 3 M urea, 0.8 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was applied onto a column filled with Profinity IMAC Ni²⁺ charged resin (0.5 cm diameter, 2.5 cm height) pre-conditioned with 5 ml of a buffer containing 0.1 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10%

glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.4. The elution was performed with 3 ml of a buffer containing 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.4 and then 3 ml of the same buffer containing 50 mM imidazole. 12 fractions of 1 ml were collected. The purified protein was eluted in the fraction 10. 1 ml of 10th fraction containing about 120 µg of the purified hOCTN2-GST protein was incubated with 0.1 U thrombin at 25°C for 4 h at 1000 rpm in Eppendorf thermomixer.

2.4. Expression of recombinant hOCTN2(R2K) protein in *E. coli* and purification.

To clone the full length hOCTN2 cDNA in the NdeI/XhoI sites of the pET-21a(+) expression vector, the NdeI restriction site of hOCTN2 at 1159 position we firstly removed by site-directed mutagenesis using the following forward and reverse primers 5'-TTGAAGTCCCAGCATAACGTGTTGGCCT-3', 5'-AGGCCAACACGTATGCTGGGACTTCAA-3', respectively which do not carry any amino acid mutation. Then, the cDNA was amplified with the forward and reverse primers 5'-GGGAATTCCATATGAAAGACTACGACGAGGTG-3' and 5'-CCGCTCGAGGAAGGCTGTGCTTTTAAGGAT-3', containing the NdeI and XhoI respectively. The resulting recombinant construct, pET-21a(+)-hOCTN2(R2K), encoded a fusion protein corresponding to the hOCTN2 carrying the mutation R2K and the extra C-terminal sequence 6-His tag. To obtain the recombinant hOCTN2 protein, the expression host *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS was transformed with the pET-21a(+)-hOCTN2(R2K) plasmid by calcium chloride treatment. Selection of transformed colonies was performed on LB-agar plates containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol. Cells carrying the recombinant plasmid were inoculated in 100 mL of 2x YT medium (1.6% Bacto peptone, 1% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol, and cultured overnight at 37 °C with rotary shaking (~ 200 rpm). 50 mL aliquot of the cell culture was transferred to 0.5 L of fresh 2x YT medium supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol and

in the middle of the logarithmic phase (0.5-0.7 O.D. at 600 nm wavelength), 0.1 mM IPTG was added to induce the expression of the recombinant protein and the temperature was lowered to 28°C. Every two hours, fractions of 50 ml were harvested by centrifugation at 3,000g for 10 min at 4°C and the pellet stored at -20 °C. The bacterial pellet (about 0.4 g wet weight) was thawed on ice for 15 min and resuspended in 5 mL 20 mM Hepes/Tris pH 7.5 supplemented with 20 µL of protease inhibitor cocktail (P8849, Sigma–Aldrich) and 0.5mM PMSF. Cells were disrupted by mild sonication at 4 °C (10 min in pulses of 1 s sonication, 1 s intermission). The soluble and the insoluble cell fractions were separated by centrifugation of the cell lysate at 12,000g for 30 min at 4 °C. The protein patterns of the cell lysate fractions were analyzed by SDS-PAGE. The insoluble fraction obtained as described above, was incubated for 15 min at 20 °C and 1000 rpm in Eppendorf thermomixer with 100 mM DTE and then solubilized with a buffer containing 3 M urea, 0.8 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 % glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. The sample was centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was applied onto a column filled with His-select Ni²⁺-chelating affinity gel (0.5 cm diameter, 2.5 cm height) pre-conditioned with 5 ml of a buffer containing 0.1 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. The elution was performed with 3 ml of a buffer containing 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, then 3 ml containing 100 mM imidazole of the same buffer. 15 fractions of 1 ml were collected. The purified protein was eluted in the fraction 14.

2.5. Other methods.

Protein concentration was measured by the method of Lowry, modified for the presence of detergents (*16*). Proteins were separated by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels performed according to Laemmli (*17*), using the Hoefer SE260 mini-vertical unit and stained by Coomassie-brilliant blue. Quantitative evaluation of Coomassie-stained protein bands was carried out using the Chemidoc imaging system equipped with Quantity One software (Bio-Rad).

3. Results.

3.1. Expression of the GST-hOCTN2 construct.

The 1674 bp hOCTN2 cDNA was amplified from total human skin fibroblast RNA using forward and reverse primers constructed on the 5' and 3' ends of the hOCTN2 cDNA (GenBank NM_003060). The amplified cDNA showed an electrophoretic mobility on agarose gel corresponding to about 1700 bp, very close to its theoretical size. Upon sequencing, no mutations were found in the cDNA as compared to the deposited hOCTN2 sequence (not shown). To determine whether hOCTN2 could be expressed in *E. coli*, different vectors and host bacterial strains were used and the experimental conditions were varied. The isolated cDNA was amplified and cloned in the vectors pET-28a(+), pMWT7, pH6EX3 and pET-22b(+). However, the recombinant plasmids containing the hOCTN2 did not lead to any detectable expression of the protein in the *E. coli* strains: Rosetta(DE3)pLysS, RosettaGami2(DE3)pLysS, C41(DE3), C43(DE3) and BL21(DE3). Thus, a different strategy was employed. The hOCTN2 was inserted in the pGEX-4T1 plasmid carrying the glutathione S-transferase (GST) gene to obtain a construct GST-hOCTN2 with improved solubility which could be purified under native condition on glutathione-agarose affinity resin. The recombinant plasmid was expressed in *E. coli* Rosetta(DE3). The cell lysates obtained under different conditions were separated in the soluble and the insoluble fractions by centrifugation. However, the presence of an expression product analyzed on SDS-PAGE, was observed only in the insoluble fractions (not shown). The protein in the insoluble state needed to be solubilized with denaturing detergents such as Sarkosyl or SDS which would denature also the GST tag impeding the purification. Thus, a similar strategy was adopted using the pET-41a(+) vector which allowed us to insert also a 6His tag between the GST and hOCTN2 to perform the purification on Ni²⁺-chelating resin under denaturing conditions (9). The construct pET-41a(+)-GST-hOCTN2 was used to transform Rosetta(DE3)pLysS strain. To optimize the expression of

GST-hOCTN2, the time after induction by IPTG and the growth temperature were varied. The cell lysates obtained under the different conditions were separated in the soluble and the insoluble fractions by centrifugation. On SDS-PAGE, A heavily stained protein band was observed after induction by IPTG, in the insoluble fraction (inclusion bodies) which was absent in the uninduced lysate (Fig. 1). The amount of protein increased with the time up to 6 h of induction. The best enrichment of the expressed protein with respect to the bacterial ones was obtained at 28 °C and 0.4 mM IPTG after 6 h; no further increase of expression was observed at longer times of induction (not shown). The apparent molecular mass was 85 kDa, lower than the theoretical molecular mass of the construct GST-hOCTN2, 95043 Da calculated on the basis of the amino acid composition (see section 2.5). The over-expressed protein was identified as GST-hOCTN2 (see Fig. 2 lane 5).

3.2. Purification of the expressed GST-hOCTN2.

The GST-hOCTN2 expressed protein was solubilized with Sarkosyl as previously done for hOCTN1 (9). The minimal concentration of Sarkosyl which was still effective in solubilizing the expressed protein was 0.8 %. Whereas the protein was not soluble in non ionic detergents like Triton X-100 and C₁₂E₈ (not shown). The protein pellet (Fig. 1 lane 4) was solubilized with a buffer containing 0.8 % Sarkosyl, 3 M urea, 8 mM DTE (see Materials and Methods). The solubilized protein was loaded onto a Ni²⁺-chelating column. After washing with a buffer containing 20 mM Tris/HCl pH 8.5, 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 5 mM DTE virtually all the proteins of bacterial origin were removed. Then the GST-hOCTN2 was eluted with the same buffer added with 50 mM imidazole; it resulted as a single protein band on SDS-PAGE (Fig. 2, lane 1), which was identified by immunodecoration with anti-His antibody (Fig. 2, lane 5). The GST-hOCTN2 in the purified fraction was enriched about 10 folds with respect to the cell lysate.

3.3. Thrombin treatment and separation of hOCTN2.

The purified GST-hOCTN2 fusion protein was subjected to thrombin treatment. The time of digestion was optimized to obtain the complete cleavage of the fusion protein. As shown in Fig. 2, after 3 h most of the OCTN2 had been cleaved and after 4 h the cleavage was complete (Fig. 2 lane 4). To separate the OCTN2 protein from the GST polypeptide the cleaved fraction was applied on a size exclusion chromatography resin. As shown in Fig. 3 the two proteins were separated by this procedure. After the entire procedure the yield of purified OCTN2 was 0.2 mg per litre of cell culture (3.5 g of wet weight cells).

3.4. Expression and purification of hOCTN2(R2K).

To express the hOCTN2 without GST tag, a different strategy was employed. It was known that the codon usage of *E. coli* is different from eukaryotic organisms (18). In particular, we have optimized the second codon of the OCTN2 cDNA according to the most frequently occurring in *E. coli* genes. The best compromise between a second codon frequently used by *E. coli* and the consequent amino acid mutation was the substitution of the second codon of WT hOCTN2, CGG with AAA. By this substitution the second amino acid was conservatively changed from Arg to Lys, which should not lead to structure/function variation of the protein. The 1674 bp hOCTN2(R2K) cDNA was amplified and cloned in the vector pET-21a(+) which inserted a 6His tag at the C-terminus of the protein. The recombinant plasmid was expressed in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. The cell lysates obtained under different conditions were separated in the soluble and the insoluble fractions by centrifugation. An heavy stained protein band on SDS-PAGE, was observed in the insoluble fractions from IPTG induced cells, which was not present in non induced cell lysate (Fig. 4). The best condition for expression was obtained after 4 h induction with 0.1 mM IPTG at 28°C. The increase of IPTG to 0.4 or 1 mM and the increase of temperature led to reduction of expression (not shown). The protein was solubilized from the insoluble fraction with Sarkosyl and Urea essentially

as previously done for the GST-hOCTN2 construct, with the exception that the pH of the buffers was pH 8.0. The solubilized protein was then purified on Ni²⁺-chelating with a procedure similar to that used for the GST-hOCTN2 construct, except that 100 mM imidazole was used instead of 50 mM to achieve the elution of the protein. As shown in Fig. 5 the apparent molecular mass of the purified protein was 54 kDa i.e., coincident with that of the protein obtained with the GST-hOCTN2 construct after thrombin digestion. The hOCTN2 was identified by immunodecoration with anti-His antibody both in the insoluble cell lysate and in the purified fraction. The protein yield after the purification procedure was about 3.5 mg per liter of cell culture (3.5 g of wet weight cells).

4. Discussion

The reported results represent, to our knowledge, the first report of over-expression of the human OCTN2 transport protein in bacteria. To obtain this goal the procedure previously used for the over-expression of hOCTN1 was firstly attempted. Unfortunately, this procedure revealed not suitable for hOCTN2, in spite of the high identity between the two proteins. Thus, several different plasmids and *E. coli* strains for cloning and expressing the hOCTN2 were also checked, but without any success. Only the introduction of a GST tag at the N-terminal end of the hOCTN2 led to expression of the protein. The construct GST-hOCTN2 could potentially be purified using glutathione-agarose resin. However, such procedure could be performed only with native GST. But, the over-expressed GST-hOCTN2 was recovered in the insoluble cell fraction which was solubilized only by denaturing detergents. Thus, the purification procedure with glutathione-agarose resin could not be performed with denatured GST. However, since the introduction of GST had revealed useful for the expression of hOCTN2 a second construct was assembled which, besides GST, contained also a 6His tag which would be useful to purify the protein construct starting from a denatured state. The new construct, which was over-expressed as well, could be purified also in the denatured state using a Ni²⁺-chelating resin. Indeed the over-expressed GST-hOCTN2 was successfully purified and,

then, the hOCTN2 was separated from the GST by thrombin treatment and size exclusion chromatography. Interestingly, the hOCTN2, which could be solubilized only with ionic detergents from the cell lysate, became soluble in 0.1 % Triton X-100 after purification. This was most probably due to the refolding of the protein, as previously described for the over-expressed hOCTN1. The overall yield of this procedure was, however, not very high. The scarce recovery was due, among other things, to the several steps required to obtain the hOCTN2. A completely different strategy employing codon optimization was used to obtain the over-expressed protein without any N-terminus tags. It was known that *E. coli* statistically uses selected second codons (18). Starting from this observation we designed the mutation of the hOCTN2 cDNA to substitute the second codon CGG with a triplet which is more frequent at second position of *E. coli* genes. The triplet chosen was AAA resulting in a conservative substitution of the second amino acid of hOCTN2(R2K). The mutated cDNA was highly expressed by *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. The protein was then purified using the same procedure described for the construct GST-hOCTN2. The yield of this procedure was much higher than that obtained with the previous construct. Also in this case the purified hOCTN2 became soluble in 0.1 % Triton X-100.

5. References

1. Wallin, E., von Heijne, G., (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7, 1029-1038.
2. Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano A., (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78, 969-1054.
3. Lahjouji, K., Mitchell, G.A., Qureshi., (2001) Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 73, 287-297.
4. Daniel, H., Kottra, G., (2004) The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch.* 447, 610-618.

5. Wright, E.M., Turk, E., (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447, 510-518.
6. Bröer, A., Cavanaugh, J.A., Rasko, J.E., Bröer, S., (2006) The molecular basis of neutral aminoacidurias. *Pflugers Arch.* 451, 511-517.
7. Palmieri, F., (2008) Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 564-578.
8. Tate, C.G., (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett.* 504, 94-98.
9. Galluccio, M., Pochini, L., Amelio, L., Accardi, R., Tommasino, M., Indiveri, C., (2009) Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN1 transport protein. *Protein. Expr. Purif.* 68, 215-220.
10. Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J.I., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M., Tsuji A., (2000) Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem.* 275, 40064-40072.
11. Lahjouji, K., Malo, C.K., Mitchell, G.A., Qureshi, I.A., (2002) L-Carnitine transport in mouse renal and intestinal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1558, 82– 93.
12. Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, Y., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., Tsuji, A., (1998) Molecular and functional identification of sodium iondependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* 273, 20378– 20382.
13. Pochini, L., Oppedisano, F., Indiveri, C., (2004) Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1661, 78-86.

14. Pochini, L., Scalise, M., Indiveri, C., (2009) Inactivation by omeprazole of the carnitine transporter (OCTN2) reconstituted in liposomes. *Chem. Biol. Interact.* 179, 394-401.
15. Wu, X., Huang, W., Prasad, P.D., Seth, P., Rajan, D.P., Leibach, F.H., Chen, J., Conway, S.J., Ganapathy, V., (1999) Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1482-1492.
16. Dulley, J.R., Grieve P.A., (1975) A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* 64, 136-141.
17. Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
18. Niimura, Y., Terabe, M., Gojobori, T., Miura, K., (2003) Comparative analysis of the base biases at the gene terminal portions in seven eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 31, 5195-5201.

Legends to Figures.

Fig. 1. Expression of recombinant pET-41a(+)-hOCTN2 in *E. coli* Rosetta(DE3). Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers: β -galactosidase (116 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactate dehydrogenase (35 kDa), REase BSP98I (25 kDa); lane 1, uninduced cell lysate (80 μ g), lanes 2-4: pellets of the insoluble fraction of cell lysate (80 μ g), after 2 h, 4 h and 6 h of IPTG-induction, respectively.

Fig. 2. Purification and cleavage of the GST-hOCTN2 fusion protein. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1. Lane 1: purified GST-hOCTN2 fusion protein (8 μ g); lane 2-4: protein fractions of lane 1 after incubation with thrombin for 1, 3 or 4 h, respectively. Lane 5 3,3'-diaminobenzidine

immunodetection by anti-His antiserum (1:1000) of PVDF membrane after Western Blotting of the same protein fraction of lane 1.

Fig. 3. Purification of the expressed hOCTN2. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1. Lane 1: hOCTN2 protein (10 μ g); lane 2 GST protein.

Fig. 4. Expression of recombinant pET-21a(+)-hOCTN2(R2K) in *E. coli*. Rosetta (DE3)pLysS. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1; lane 1, uninduced cell lysate (80 μ g), lanes 2-4: pellets of the insoluble fraction of cell lysate (80 μ g), after 1 h, 2 h and 4 h of IPTG-induction, respectively.

Fig. 5. Purification of the hOCTN2(R2K) protein. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. (A) lane M: molecular mass markers: BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa); lane 1, uninduced cell lysate (80 μ g), lanes 2: pellet of the insoluble fraction of cell lysate (80 μ g) corresponding to lane 4 of Fig. 4; lane 3, purified OCTN2 (8 μ g). (B) 3,3'-diaminobenzidine immunodetection by anti-His antiserum (1:1000) of PVDF membrane after Western Blotting of the same protein fractions of lanes 1-3.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

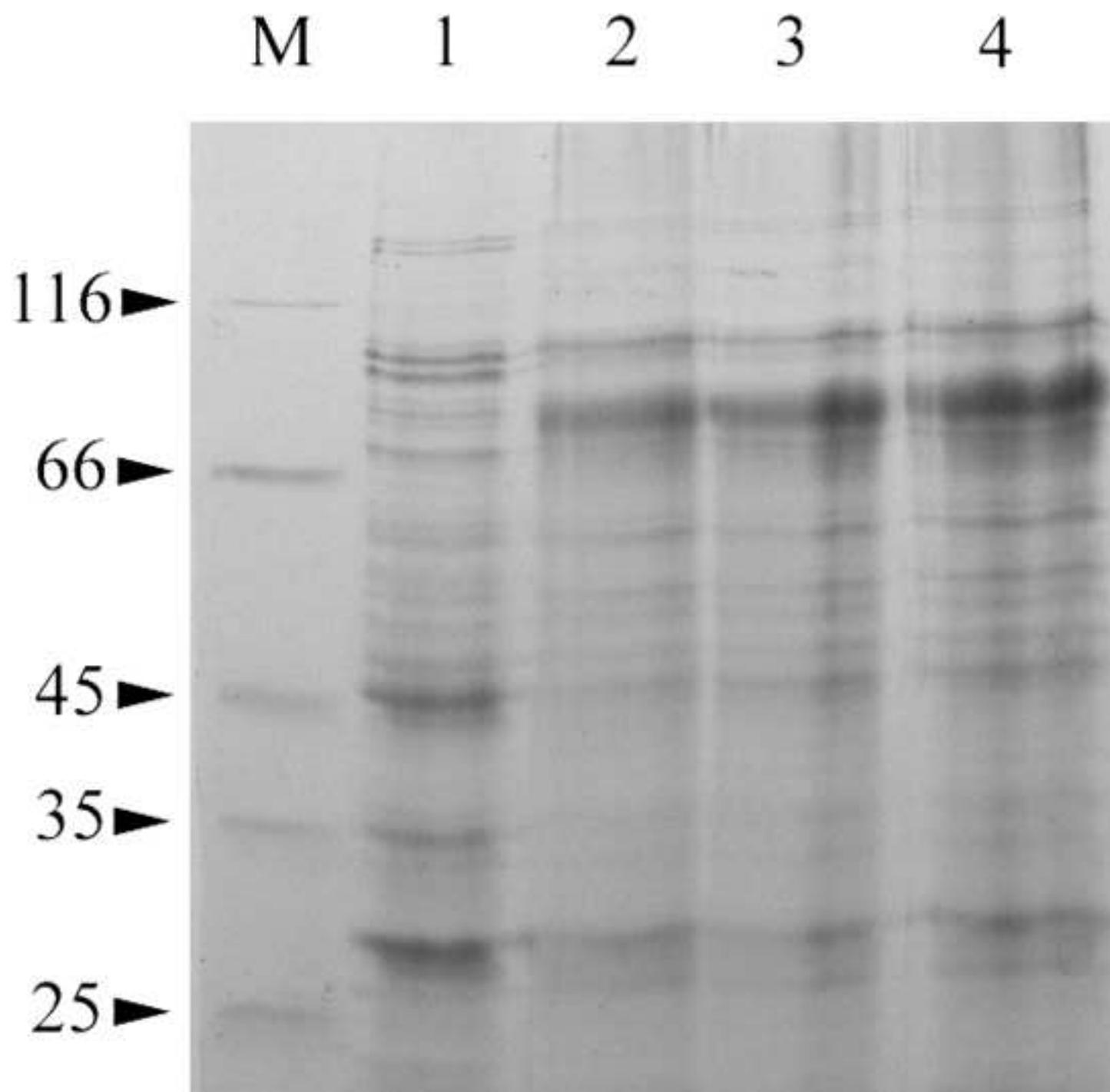


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

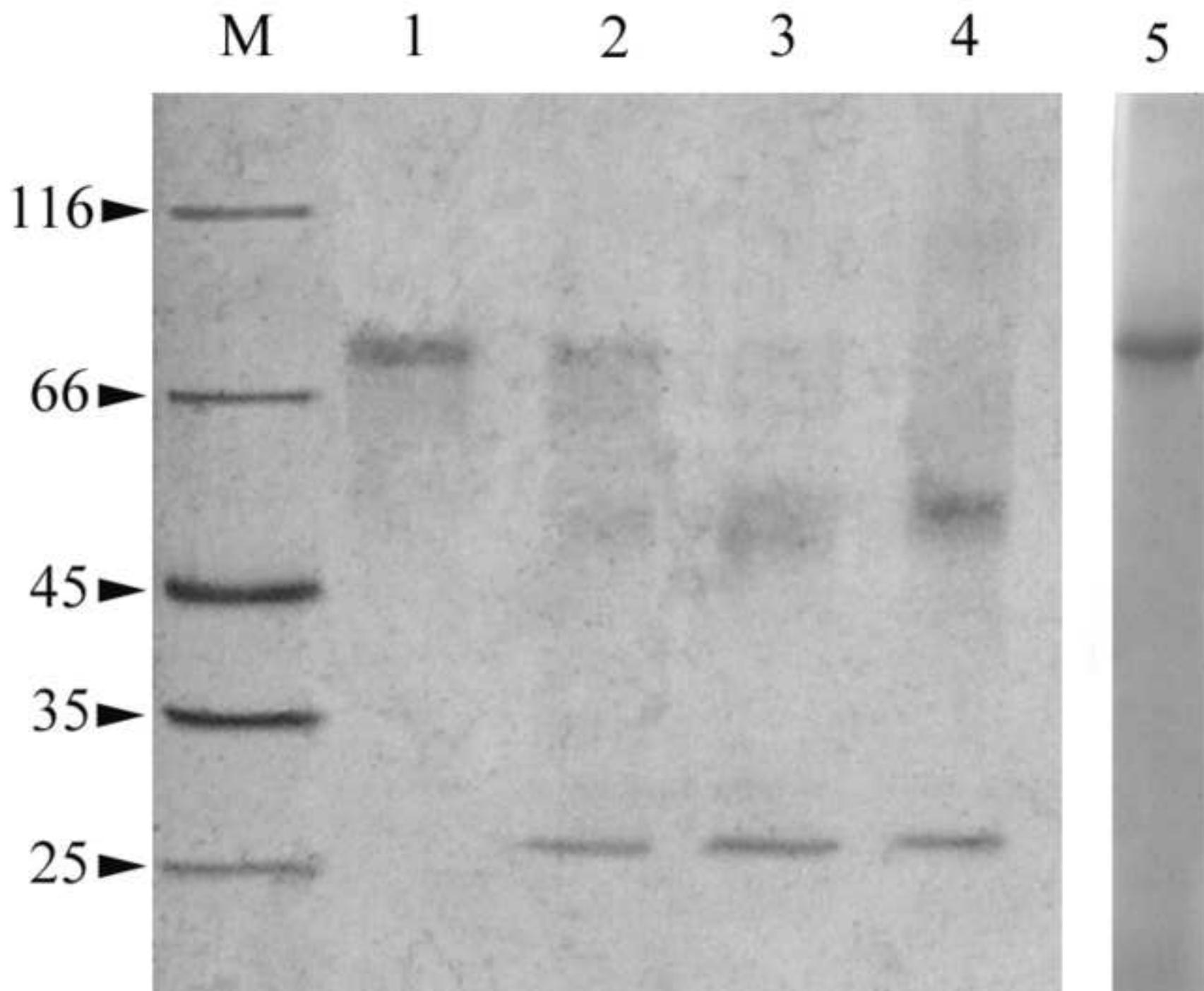


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

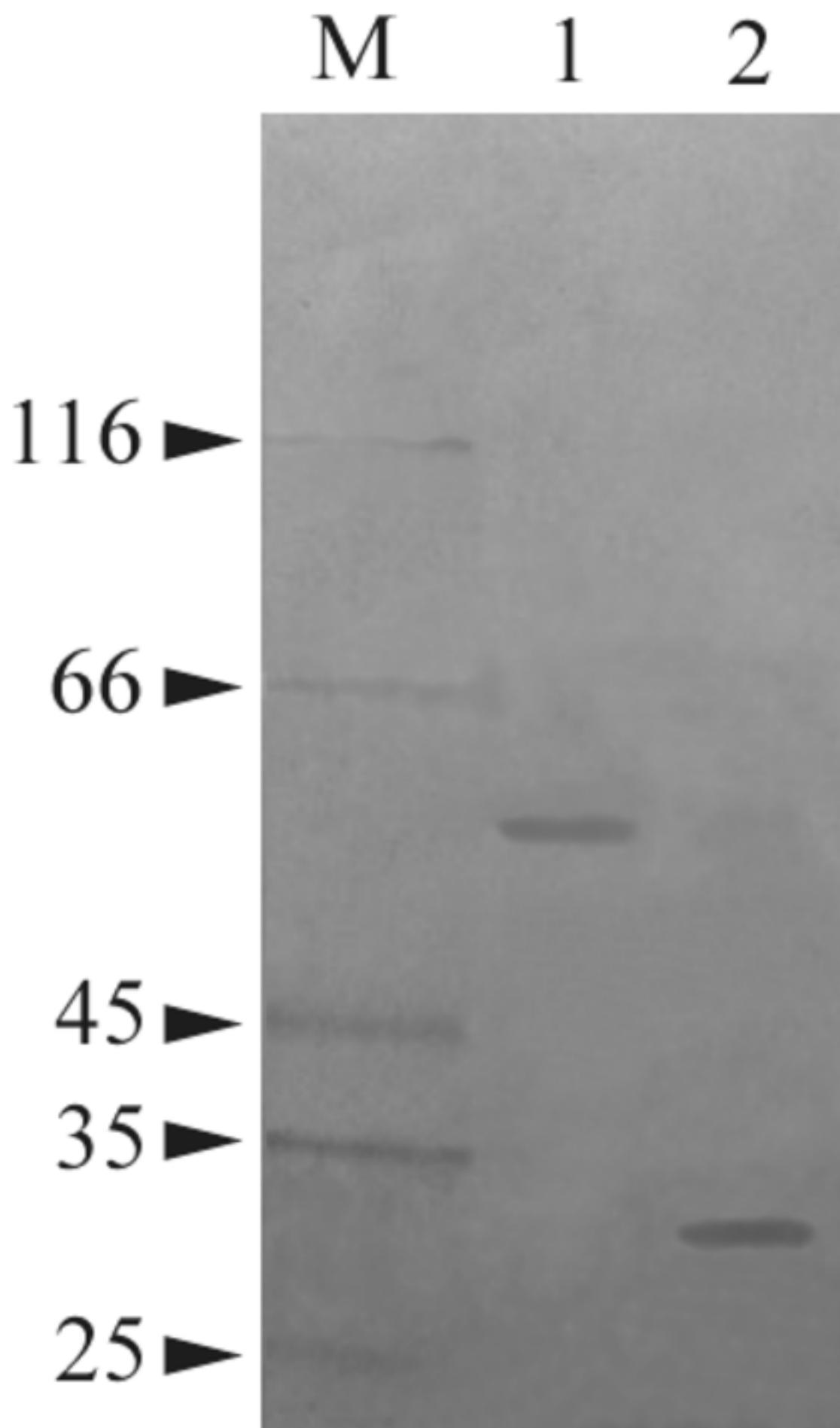


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

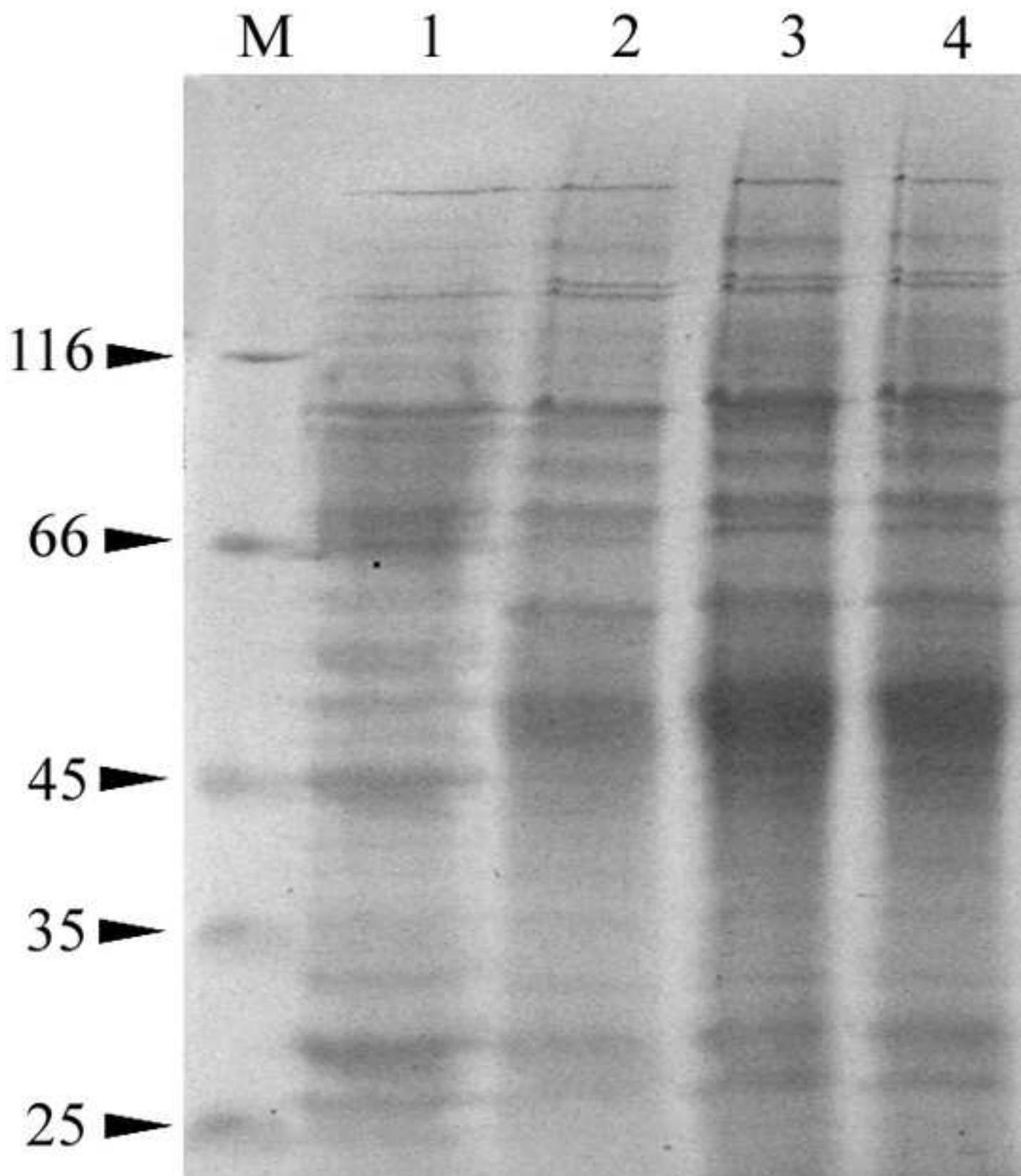


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

