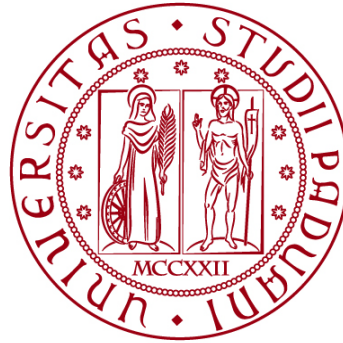


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**PURIFICAZIONE DELLE 14-3-3: UNA
FAMIGLIA DI PROTEINE CHAPERONE
IMPLICATE IN MALATTIE
NEURODEGENERATIVE**

Tutor: Prof.ssa Elisa Greggio

Co-tutor: Dott.ssa Isabella Tessari

Laureanda: Debora Padovan

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

1 INTRODUZIONE	1
1.1 Origine ed evoluzione.....	1
1.2 Struttura	2
1.3 Riconoscimento	3
1.4 Regolazione	4
1.5 Funzioni biologiche	4
1.6 Ruolo nel cervello.....	6
1.7 Le 14-3-3 nella malattia di Parkinson	7
1.7.1 LRRK2.....	7
1.7.1 Interazione tra le 14-3-3 e LRRK2	8
2 SCOPO DELLA TESI	10
3 MATERIALI E METODI	11
3.1 Cellule competenti BL21 (DE3).....	11
3.2 Plasmidi pET28a	11
3.3 Trasformazione.....	12
3.3.1 Efficienza di trasformazione.....	12
3.4 Induzione	12
3.5 Purificazione	13
3.5.1 Lisi tramite French Press	14
3.5.2 Colonnine gravity flow.....	14
3.6 SDS-PAGE	14
3.6.1 Sample buffer	15
3.6.2 Pesì di riferimento	15
3.6.3 Preparazione gel	15
3.6.4 Colorazione con Coomassie Brilliant Blue	16
3.7 Desalinizzazione e scambio di tampone.....	16
3.7.1 Colonnine di desalinizzazione.....	16
3.8 Quantificazione.....	17
3.1 Resa di purificazione	17
4 RISULTATI	18
4.1 Efficienza di trasformazione.....	18
4.2 SDS-PAGE per controllo induzione.....	18
4.3 SDS-PAGE per controllo purificazione	19
4.4 Resa di purificazione	20
5 DISCUSSIONE	21
BIBLIOGRAFIA	22

1 INTRODUZIONE

Le 14-3-3 sono una famiglia di proteine altamente conservata, implicate in importanti processi fisiologici, soprattutto nel cervello, dove sono particolarmente abbondanti e dove sono coinvolte nei processi di neurogenesi, sinaptogenesi, modellamento delle spine dendritiche e biosintesi di neurotrasmettitori [1]. Le numerose funzioni di queste proteine sono il risultato della loro capacità di riconoscere un ampio repertorio di target proteici. In seguito a dimerizzazione, le 14-3-3 possono legare proteine target che presentano residui di serina o treonina fosforilati e possono regolarne la funzione, la localizzazione o l'interazione con possibili altri partner [1]. Fanno parte di queste proteine anche LRRK2, Parkin e l' α -sinucleina, le quali hanno un ruolo fondamentale nella malattia di Parkinson [1].

1.1 Origine ed evoluzione

Le 14-3-3 sono proteine presenti in tutti gli eucarioti, per un totale di 153 isoforme, codificate da geni diversi e suddivisibili in 4 classi: Plantae, Fungi, Metazoa e Alveolata [1,2]. Circa il 53% della sequenza è conservata tra le diverse isoforme, suggerendo la presenza di un antenato comune, il quale avrebbe dato origine a isoforme diverse che si sarebbero evolute indipendentemente all'interno di ciascuna classe [2]. Esistono ipotesi contrastanti sul perché un così elevato numero di isoforme sia stato mantenuto. La prima ipotesi è quella della ridondanza funzionale, supportata dall'alto livello di omologia presente tra le diverse isoforme. La seconda ipotesi, al contrario, sostiene che le isoforme sono state conservate perché in grado di adempiere a compiti diversi, grazie, invece, alla presenza di regioni non conservate [1].

Nei mammiferi sono presenti 7 isoforme: β , γ , ε , ζ , η , θ/τ e σ (inizialmente erano state individuate anche α e δ , che, però, si sono rivelate essere la forma fosforilata di β e ζ rispettivamente). È stato osservato che una stessa isoforma appartenente a specie diverse mostra un livello di omologia molto elevato (96-100%), mentre isoforme diverse, ma appartenenti alla stessa specie, differiscono tra di loro per circa il 46% della sequenza [1,2]. Confrontando la sequenza delle sette isoforme dei mammiferi, si può osservare la presenza di 5 domini altamente conservati, intervallati da regioni più variabili (Fig.1). È stato osservato che residui conservati sono quelli coinvolti nella dimerizzazione e nel legame con le proteine target [2].

L'isoforma ε è quella che più si discosta dalle altre, non solo all'interno del gruppo dei mammiferi, ma anche del regno dei Metazoa. Essa, infatti, presenta alcune caratteristiche in comune con i lieviti e le piante, che sono assenti nelle altre isoforme [1,2]. Questa caratteristica suggerisce che ε , nella storia evolutiva dei Metazoa, si sia separata molto presto dalla linea che ha dato origine alle altre isoforme, mantenendo alcune caratteristiche ancestrali [2].

a tutte le isoforme la stessa capacità di legare le proteine target. Tuttavia, diversi ligandi mostrano una distinta preferenza per determinate isoforme. Questa specificità è conferita dalle regioni variabili, distribuite principalmente sulla superficie esterna [1,3] (Fig.2).

La regione con maggior variabilità e la C-terminale, la quale ha però un ruolo più regolatorio. La C-terminale è una regione flessibile di 15-40 aminoacidi, tra cui dei residui di Glu e Asp carichi negativamente che possono interagire con la tasca carica positivamente usata per il legame dei fosfopeptidi, bloccando possibili interazioni non specifiche. Quando avviene il legame con il fosfopeptide, la porzione C-terminale assume una nuova conformazione sopra l'elica H9 [3]

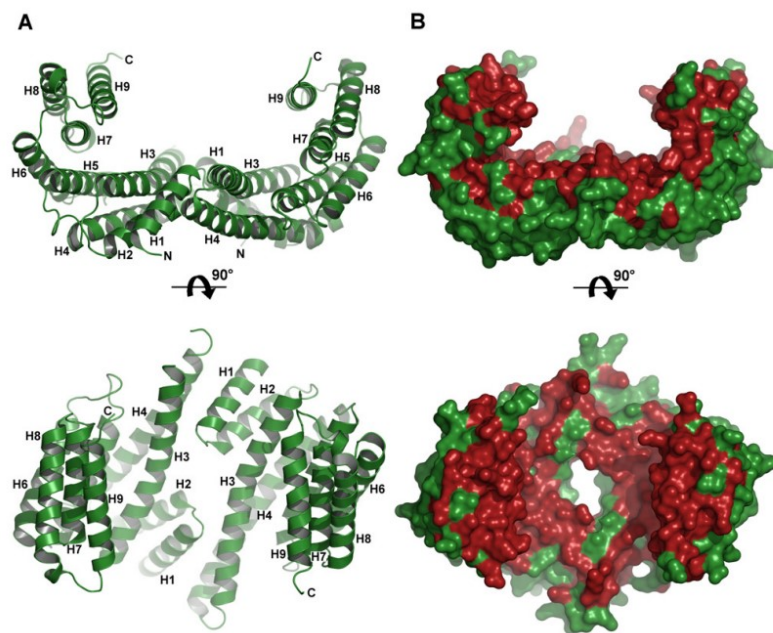


Fig.2 struttura cristallina di 14-3-3ζ. In B le regioni evidenziate in rosso indicano i residui conservati [4].

1.3 Riconoscimento

Le 14-3-3 legano principalmente peptidi che presentano fosfoserina (pS) o fosfotreonina (pT). Fino ad ora sono stati identificati tre motivi di legame contenenti questi residui: RSX(pS/pT)XP (mode I), RX(F/Y)XpSXP (mode II) e pS/TX₁₋₂-COOH al C-terminale (mode III) [1]. Il gruppo fosfato può formare legami ionici e a idrogeno con i residui conservati Lys49, Arg56, Arg127 e Tyr128, localizzati nelle eliche H3 e H5 e che formano una tasca carica positivamente all'interno del solco di legame [4].

Esistono però anche dei motivi non fosforilati che possono comunque essere riconosciuti dalle 14-3-3. Ne è un esempio il motivo anfipatico WLDLE, sul peptide R18, che lega la 14-3-3ζ [4]. Anche ExoS, una tossina batterica, nonostante non sia fosforilata, è in grado di legare le 14-3-3 attraverso contatti idrofobici, in cui Leu428 ha un ruolo critico [4]. Inoltre, è stato dimostrato che le 14-3-3 possono legare il motivo O-linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc), che può essere aggiunto come modifica post-trascrizionale a residui di serina e treonina [3].

La presenza di due siti di legame permette al dimero di legare due proteine diverse, agendo da scaffold, oppure una singola proteina che però presenta più siti di legame per le 14-3-3. In quest'ultimo caso, è presente solitamente un sito di legame dominante che fa da "gate keeper" e favorisce il legame ad altri siti secondari più deboli. LRRK2, ad esempio, presenta 6 siti di legame, di cui quelli con K_d più alta sono pS910 e pS935 [1].

1.4 Regolazione

Le 14-3-3 possono essere regolate da una serie di modifiche post-trascrizionali, che risultano principalmente in una perdita della loro funzione, alterando la loro struttura o la loro capacità di legare le proteine target. La prima di queste modifiche è la fosforilazione di Ser58/59, Ser185 e Ser/Thr232. Ser58/59 è un residuo conservato che può essere riconosciuto da diverse chinasi, tra cui PAK6 che fosforila Ser59 di 14-3-3 γ , comportandone la dissociazione da LRRK2 a seguito della dissociazione del dimero [1,5]. Poiché questo residuo è normalmente mascherato nell'interfaccia del dimero, è necessario un cambiamento conformazionale della molecola, che è stato osservato poter essere causato dal legame con la sfingosina [1,5]. Anche Ser185 di 14-3-3 ζ e σ può essere soggetta a fosforilazione sfingosina-dipendente. Il risultato è il distacco dal sito di legame di Bax, che, una volta raggiunti i mitocondri, ne perturba il potenziale di membrana, causando il rilascio del citocromo C mitocondriale, che può essere riconosciuto dall'apoptosoma [5].

Un'altra modifica post-trascrizionale è l'acetilazione di Lys49 (e/o altre lisine). Questo comporta il mascheramento delle cariche positive nel solco di legame, impedendo il riconoscimento di residui fosforilati sulle proteine target [1].

Le 14-3-3 possono essere soggette anche a taglio proteolitico: la proteolisi di 14-3-3 σ causa il distacco di quest'ultima dal complesso formato dalle cicline B1-CDC2, portando a un'elevata proliferazione cellulare. Infatti, il sequestro di questo complesso da parte dell'isoforma σ permette di inibire la fase G2 [5]. Lo stesso risultato si ottiene anche in seguito a metilazione, modifica epigenetica che riduce l'espressione di 14-3-3 σ . Questi eventi sono frequenti in alcune forme di cancro come il cancro al seno o il carcinoma epatocellulare [1,5].

1.5 Funzioni biologiche

Le numerose interazioni a livello dell'interfaccia del dimero conferiscono alle 14-3-3 una struttura particolarmente rigida, che non subisce quasi alcun cambiamento in seguito all'interazione con le proteine target. Ciò significa che sono queste ultime a dover subire un cambiamento conformazionale, alterando così la loro funzione. Un esempio è fornito dall'enzima AANAT (serotonina N-acetiltransferasi), il quale catalizza il trasferimento dell'acetile da AcCoA (acetil-coenzima A) alla serotonina, producendo N-acetilserotonina, un precursore della melatonina. Per funzionare, AANAT ha bisogno del legame con 14-3-3 ζ , così da poter passare da una conformazione a bassa affinità ad una ad alta affinità [1,4].

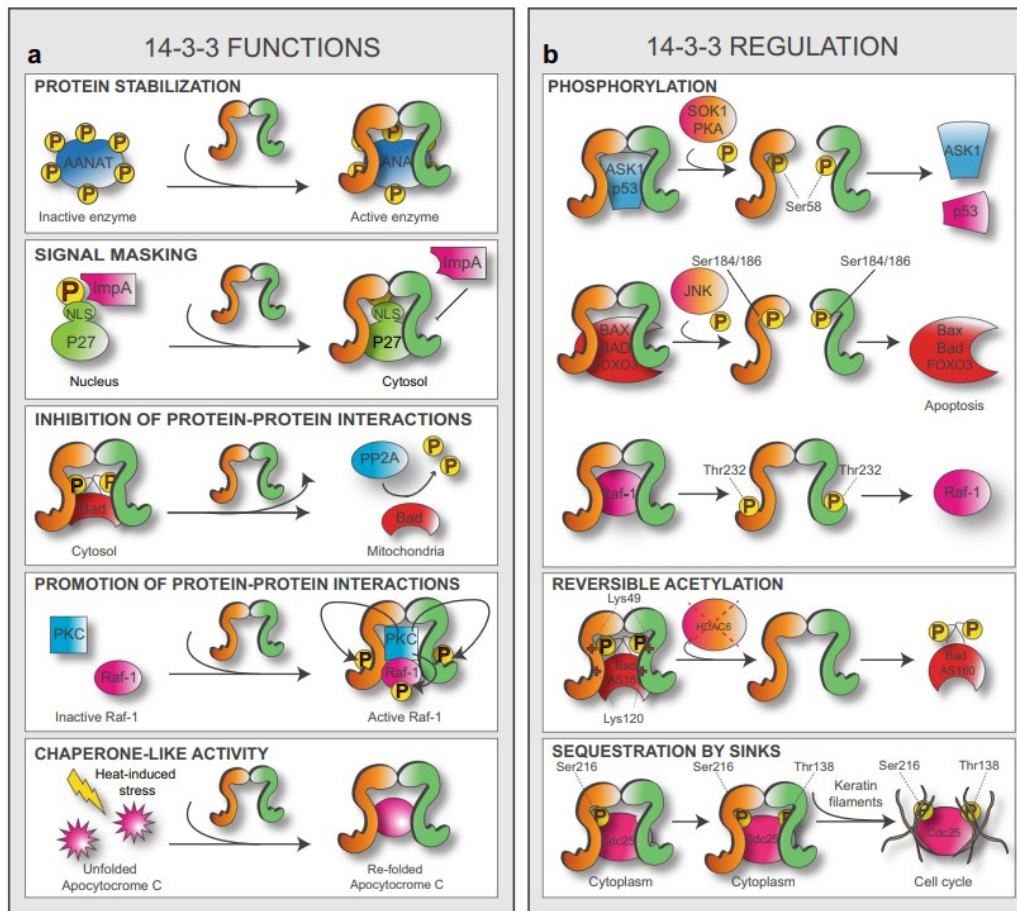


Fig.3 rappresentazione schematica della regolazione delle funzioni delle 14-3-3 [1]

L'interazione con le 14-3-3 può anche mascherare le sequenze di localizzazione NES (Nuclear Export Sequence) e NLS (Nuclear Localization Sequence) qualora queste si trovassero in prossimità dei motivi di legame, come nel caso dei fattori di trascrizione FOXO. La loro attività può essere regolata tramite fosforilazione di tre residui, due dei quali (Thr³² e) necessari per l'interazione con le 14-3-3. In prossimità di Ser¹⁹⁷ si trova NES, che viene quindi mascherato in seguito al legame con le 14-3-3. In questo modo, i fattori FOXO vengono traslocati nel citosol e la loro attività trascrizionale viene inibita [3].

Un'altra funzione delle 14-3-3 è quella di mascherare, sulla proteina che viene legata, eventuali siti di legame con altri partner a valle. Bad è una molecola proapoptica che può essere sequestrata dalle 14-3-3, che ne inibiscono l'interazione con la fosfatasi PP2A e la conseguente attivazione della via apoptotica [1].

Il legame con le 14-3-3 può anche fornire una protezione dalla defosforilazione e dalla degradazione proteolitica [3].

Inoltre, la capacità del dimero di legare due molecole contemporaneamente consente alle 14-3-3 di fungere da scaffold. Per esempio, Raf-1 e PKC-ζ, per poter interagire, hanno bisogno di formare con le 14-3-3 (-β o -ζ) un eterotrimerico. In seguito, PKC-ζ può fosforilare sia Raf-1, attivandola, sia la 14-3-3, comportando la dissociazione del trimerico [1].

È stato anche osservato che le 14-3-3 possiedono alcune caratteristiche simili alle proteine chaperone, in quanto sono in grado di regolare il ripiegamento e l'aggregazione proteica. Questa funzione può essere svolta solamente in forma di monomero, poiché questa conformazione permette l'esposizione dei residui idrofobici, che servono per il riconoscimento di regioni idrofobiche esposte sulla proteina mal ripiegata [1].

1.6 Ruolo nel cervello

Le 14-3-3 costituiscono l'1% delle proteine solubili nel cervello. L'abbondanza di queste proteine suggerisce la loro importanza all'interno di questo organo: esse sono infatti coinvolte nei processi di sviluppo del cervello, plasticità sinaptica e rilascio del neurotrasmettitore [1].

Nello sviluppo del cervello sono coinvolte principalmente le isoforme ϵ e ζ . 14-3-3 ϵ , per esempio può prendere parte al processo di migrazione neuronale legando Nedd1 nella sua forma fosforilata, la quale può formare con LIS1 un complesso in grado di regolare il funzionamento della dineina citoplasmatica, essenziale in questo processo. Nella sindrome di Miller-Dieker (MDS), una grave forma di lissencefalia, delezioni ai geni che codificano LIS1 e 14-3-3 ϵ risultano in una mancata migrazione e conseguente formazione degli strati corticali, che possono provocare ritardi mentali, epilessia, microcefalia e anomalie craniofacciali [1,6].

14-3-3 ϵ ha un ruolo importante anche nel processo di iniziazione del neurite, in quanto il complesso formato da 14-3-3 ϵ e Dcx controllano la dinamica dei microtuboli, che possono entrare all'interno dei lamellipodi di actina per stabilizzarli e dare inizio all'allungamento del neurite. Un aumento dell'interazione tra Dcx e 14-3-3 ϵ (dovuta alla sovraespressione di quest'ultima) interferisce con l'oligomerizzazione e la polimerizzazione dei microtuboli, impedendo l'iniziazione del neurite [6].

Anche 14-3-3 ζ è importante nel processo di neuromorfogenesi e sinaptogenesi: è stato scoperto che il knock out di questa proteina, in topo, genera dei cambiamenti conformazionali del cervello simili a quelli osservati nei casi di schizofrenia [6]. Questo è dovuto alla mancata interazione di ζ con il complesso DISC1/NDEL1/LIS1, che impedisce la normale migrazione e connettività sinaptica a livello delle fibre muscolari dell'ippocampo [1].

Le 14-3-3 possono anche interagire con PKA per influenzare la direzione del cono di crescita

Inoltre, le 14-3-3 sono coinvolte nella rigenerazione dell'assone in seguito a danno. È stato osservato in vitro che FC-A può stabilizzare l'interazione tra le 14-3-3 e GCN, promuovendo la crescita del neurite [1].

Le 14-3-3 partecipano anche alla sintesi dei neurotrasmettitori. TH (Tyrosine Hydroxylase) è enzima chiave per la biosintesi delle catecolamine, ma per essere attivato necessita del legame con le 14-3-3 [1].

A livello delle sinapsi, è stato osservato che le 14-3-3 possono interagire con EAAT/GLT-1, il trasportatore incaricato del riassorbimento del glutammato. Il suo corretto funzionamento è fondamentale, poiché un accumulo di glutammato extracellulare potrebbe generare fenomeni di eccitotossicità, come osservato in diversi modelli di Parkinson [1].

1.7 Le 14-3-3 nella malattia di Parkinson

Il Parkinson è una malattia neurodegenerativa causata dalla progressiva perdita dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*. La ridotta produzione di dopamina che ne consegue si riflette nei classici sintomi motori associati a questa malattia, ovvero: tremori, rigidità, perdita di equilibrio e bradicinesia [1].

Nonostante la maggior parte dei casi siano sporadici, circa il 10% è di tipo familiare. Mutazioni alla base del Parkinson familiare sono state identificate nei geni codificanti l' α -sinucleina e LRRK2. L' α -sinucleina è la principale componente dei corpi di Lewy, degli aggregati proteici insolubili anormali osservabili nel cervello dei pazienti affetti da Parkinson [1].

Le 14-3-3 sono in grado di interagire sia con l' α -sinucleina sia con LRRK2 [1].

1.7.1 LRRK2

La chinasi Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) è un enzima multidominio associato al Parkinson: mutazioni a questa molecola sono tra le più diffuse cause dei casi familiari di questa malattia (~5% dei casi). Queste mutazioni causano una forma autosomica dominante, ma con una penetranza incompleta e età-dipendente, che si manifesta attraverso sintomi altamente simili a quelli osservati nel Parkinson sporadico. Questa similarità, insieme all'individuazione di mutazioni puntiformi anche in circa l'1% dei casi idiopatici, suggeriscono l'importanza dell'apprendimento del funzionamento di LRRK2 per lo sviluppo di potenziali cure [7].

La struttura di LRRK2 (Fig.4) è caratterizzata dalla presenza di un core catalitico formato da due domini: un dominio ROC (Ras Of Complex) e un dominio chinasi. Il primo ha una funzione GTPasica e permette di regolare la localizzazione della molecola all'interno della cellula: il legame di ROC al GTP favorisce il trasferimento di LRRK2 alle membrane dove può esercitare la sua attività chinasi, mentre il legame con il GDP mantiene la molecola in uno stato citosolico [7]. Inoltre, ROC media la dimerizzazione insieme al dominio COR (C-terminus of ROC), che si trova tra i due domini enzimatici [7]. Il dominio chinasi, invece, consente l'interazione con altre molecole, fosforilando residui di Ser/Thr sulle proteine target, principalmente le proteine Rab. LRRK2 è anche soggetto ad autofosforilazione: Ser1292, in particolare può essere utilizzata come indicatore dell'attività chinasi [7].

Il core catalitico è circondato dalle regioni ripetute Armadillo (Arm), Ankirin (Ank) e Leucine-rich repeat (LRR) nella porzione N-terminale, e da WD40 nella C-terminale [7].

Inoltre, un cluster di serine costitutivamente fosforilate è posizionato tra Ank e LRR. Queste serine non sono soggette ad autofosforilazione, ma sono target di chinasi come PKA. La loro defosforilazione, invece, avviene ad opera delle fosfatasi PP1 e PP2A [7].

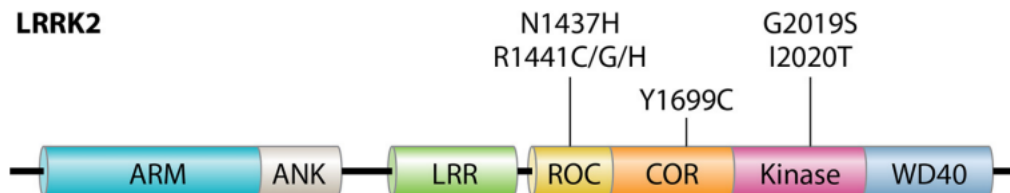


Fig.4 Domini e mutazioni di LRRK2 [8].

Ad oggi sono state identificate sette mutazioni rilevanti nel Parkinson, concentrate a livello del core catalitico (Fig.4). Tutti i mutanti presentano un aumentato livello di fosforilazione delle proteine target. G2019S è la mutazione più diffusa e si trova a livello del dominio chinasi, che stabilizza nella sua forma attiva. Le mutazioni al dominio ROC, invece, riducono l'idrolisi del GTP, comportando una più lunga permanenza di LRRK2 a livello delle membrane e, di conseguenza, una maggiore fosforilazione delle proteine Rab [7].

Nonostante non siano noti tutti ruoli di LRRK2, è stato osservato il suo coinvolgimento in diverse pathway. Una di queste è la mitofagia, che regola attraverso l'interazione con Rab10. Le mutazioni G2019S e R1441C causano un aumento della fosforilazione di Rab10, rallentando il processo di degradazione dei mitocondri, causando un'alterazione del normale livello di energia prodotta e un potenziale aumento di ROS [8].

G2019S genera anche una maggiore fosforilazione di Rab35, che controlla il rilascio dell' α -sinucleina, causando la sua propagazione [7].

LRRK2 è anche coinvolto nel rilascio di neurotrasmettitori: esso, infatti, è stato individuato come regolatore positivo del rilascio del glutammato, che, a sua volta, regola il rilascio della dopamina. Un'eccessiva neurotrasmissione glutammatergica causata da G2019S reprime il rilascio di dopamina [7].

LRRK2 è anche coinvolto nel trasporto di vescicole e organelli lungo i microtuboli riducendo la motilità di chinesine e dineine. A questo proposito, è stato osservato che le mutazioni R1441C e Y1699C interrompono completamente il traffico assonale [8].

1.7.2 Interazione tra le 14-3-3 e LRRK2

Le 14-3-3 possono legare LRRK2 attraverso i residui fosforilati Ser935 e Ser910, appartenenti al cluster di serine tra Ank e LRR, Ser860 nel dominio Ank, Ser1444 nel dominio ROC e Thr2524 al C-terminale. Tutte le isoforme delle 14-3-3 sono in grado di legare LRRK2 (a eccezione di sigma), con le più alte affinità mostrate da γ e η [1].

In presenza di mutazioni su LRRK2 è stata osservata una riduzione del livello di fosforilazione di questi residui e una conseguente mancata interazione con le 14-3-3, che può portare ad un'aumentata attività chinastica di LRRK2, a una rilocalizzazione o ad un'aggregazione in corpi di inclusione [1].

In presenza della mutazione G2019S di LRRK2 e di una 14-3-3 fosforilabile, l'interazione tra le due proteine può essere regolata dalla chinasi PAK6 [9]. Questa è in grado di legare con il suo dominio CRIB il dominio ROC di LRRK2 [10]. In seguito al legame, PAK6 fosforila la 14-3-3 a livello della Ser59, che causa la dissociazione del dimero. Il cluster di serine tra Ank e LRR, non essendo più protetto dal legame con la 14-3-3, è soggetto all'azione delle fosfatasi. L'interazione PAK6 mantiene G2019S-LRRK2 in una forma inattiva nel citosol, permettendo una riduzione dei fenotipi associati alla mutazione G2019S, tra cui l'accorciamento del neurite [9,10].

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è quello di illustrare il processo di purificazione delle sette isoforme umane delle 14-3-3 in forma ricombinante.

Queste proteine purificate verranno impiegate, dal laboratorio in cui è stato svolto il lavoro di tesi, in saggi di overlay, per testare, in collaborazione con l'azienda farmaceutica Ambagon Therapeutics (<https://www.ambagontx.com>), molecole che stabilizzino il legame tra le 14-3-3 e LRRK2.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Cellule competenti BL21 (DE3)

Il ceppo BL21 (DE3) di *E. coli* è particolarmente adatto per l'espressione di geni eterologhi poiché, grazie alla mancanza in queste cellule delle proteasi Lon e OmpT, la degradazione di proteine eterologhe è altamente ridotta. Inoltre, contiene il gene per la T7 RNA polimerasi, la quale è in grado di sintetizzare RNA ad un ritmo molto elevato, permettendo un alto livello di espressione proteica. Il gene per la T7 RNA polimerasi è sotto il controllo di lacUV5 (una forma mutata di lac), la cui azione può essere regolata da lacI (repressore) e da IPTG (induttore).

Per rendere i batteri competenti è stato utilizzato il kit "Mix &Go *E.coli* Transformation Kit & Buffer Set" della ZYMO RESEARCH.

Per la preparazione di queste cellule si deve, per prima cosa, prelevare un campione da uno stock di BL21 (DE3), piastrarlo in terreno LB solido e lasciare crescere overnight a 37°C. Il giorno successivo si preleva una colonia e la si pone in 10ml di terreno liquido LB, dove viene lasciata a crescere overnight. Fatto ciò, viene misurato l'OD₆₀₀ della coltura e la si diluisce fino ad un OD₆₀₀=0,1. La coltura viene quindi incubata a 28°C fino al raggiungimento di un OD₆₀₀=0,6 e viene poi posta in ghiaccio per 10 min. Trascorso questo tempo viene centrifugata a 2000g per altri 10 min. Seguendo le indicazioni del protocollo fornito con il kit, viene poi rimosso il surnatante e risospeso il pellet in 1ml di Wash Buffer 1X. Ripetere il processo di centrifuga e, dopo aver eliminato anche questa volta il surnatante, si risospescono le cellule in 1ml di Competent Buffer 1X. A questo punto i batteri sono competenti, ovvero sono in grado di internalizzare DNA esogeno.

Dividere la soluzione in aliquote da 100µl.

3.2 Plasmidi pET28a

I pET28a (Fig.5) sono dei plasmidi *low copy number* in cui sono state inserite le open reading frame (ORF) delle 14-3-3. Alle estremità dell'ORF è presente anche la sequenza per l'His-Tag, un motivo amminoacidico di 6 istidine. La trascrizione della ORF avviene ad opera della T7 RNA polimerasi, che riconosce il T7 promoter a monte della ORF. All'interno del plasmide è presente anche il gene per LacI (lacI), il quale ha un effetto inibitorio quando si lega a lac operator, un elemento regolatorio anch'esso a monte della ORF, impedendo il legame tra la polimerasi e il promotore. Inoltre, LacI inibisce anche la sintesi della T7 RNA polimerasi da parte della cellula batterica BL21 (DE3). Questo meccanismo permette di controllare la trascrizione della proteina di interesse, che può essere indotta al momento desiderato tramite l'aggiunta di IPTG. L'IPTG impedisce il legame di LacI a lacUV5 e lac operator, bloccandone l'azione inibitoria. In questo modo può essere sintetizzata la T7 RNA polimerasi, la quale, legandosi al T7 promoter, permette la trascrizione della proteina.

Un altro gene contenuto nel plasmide è KanR, il quale conferisce resistenza alla kanamicina. In questo modo è possibile isolare i batteri che hanno internalizzato il plasmide aggiungendo l'antibiotico al terreno di crescita.



Fig.5 Struttura del plasmide pET28a

3.3 Trasformazione

Per ciascuna isoforma di 14-3-3, si aggiungono 2 μ l di DNA (concentrazione = 50ng/ μ l) a un'aliquota da 100 μ l di cellule competenti e si lascia a riposare in ghiaccio per 10min, così da permettere l'internalizzazione dei plasmidi.

Si aggiungono poi 200 μ l di terreno liquido SOC in ogni provetta e si lascia ad incubare in agitatore a 37°C per 40min, tempo necessario per esprimere la resistenza all'antibiotico. Si piastrano poi i batteri in terreno solido già contenete l'antibiotico e si lascia crescere over-night a 37°C.

3.3.1 Efficienza di trasformazione

Per calcolare l'efficienza di trasformazione si segue il processo descritto nel paragrafo precedente, trasformando, però, i batteri con 1 μ g di DNA. Il giorno successivo si contano il numero di colonie.

3.4 Induzione

Per prima cosa si preparano preinoculi contenenti 5ml di terreno LB + 5 μ l di kanamicina (concentrazione stock kanamicina=25mg/ml, 1000X). Da ciascuna piastra si preleva un campione da una colonia, lo si mette in un preinoculo e si lascia crescere over-night.

Il giorno successivo si misura l'OD₆₀₀ dei preinoculi. Si diluisce ciascun preinoculo in una coltura preparata con 50ml di terreno LB + 50 μ l di kanamicina, in modo da ottenere un OD₆₀₀=0,1. Poiché si stanno purificando le 7 isoforme delle 14-3-3 contemporaneamente, partire dalla stessa concentrazione permette di seguire la crescita delle cellule più facilmente.

Le beute contenenti le colture batteriche vanno poi messe in agitatore a 37°C, dove rimarranno fino al raggiungimento di OD₆₀₀=0,6.

A questo punto, in ciascuna beuta si aggiungono 25µl di IPTG 1M (induttore) e si lascia continuare la crescita per 4 ore.

Successivamente si centrifuga la soluzione contenuta nelle beute, si elimina il surnatante e si congela il pellet per la successiva purificazione.

Prima e dopo l'induzione sono stati prelevati dei campioni per il gel di controllo.

3.5 Purificazione

Per la purificazione delle 14-3-3 è stata utilizzata la resina HisPur™ Ni-NTA Resin della Thermo Scientific. Questa resina è formata da chelati di NTA (acido nitriacetico) e Nickel (Ni²⁺) ancorati a un gel di agarosio. Ni²⁺ permette il legame con l'His-tag presente sulle proteine che si vogliono purificare, immobilizzandole all'interno della resina (Fig.6).

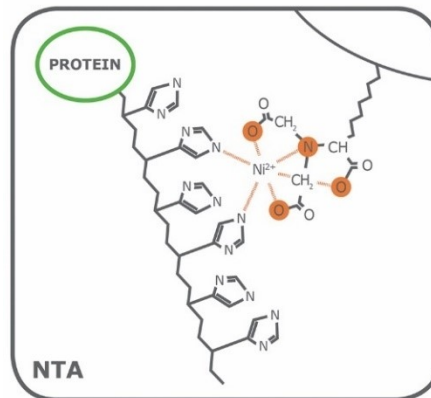


Fig.6 Rappresentazione dell'interazione tra l'His-tag della proteina e il chelato formato da Ni²⁺ e NTA (Cube Biotech).

Seguendo le indicazioni del protocollo, si preparano i seguenti buffer:

- Equilibration Buffer, pH 7.4:
20 mM sodium phosphate
300 mM sodium chloride
10 mM imidazolo
- Wash Buffer, pH 7.4
20 mM sodium phosphate
300 mM sodium chloride
25 mM imidazolo
- Elution Buffer, pH 7.4
20 mM sodium phosphate
300 mM sodium chloride
250 mM imidazolo

Ad ogni passaggio del processo di purificazione si prelevano dei campioni per la preparazione del SDS-page di controllo.

3.5.1 Lisi tramite French Press

Per prima cosa si risospendono i batteri preparati in 4ml di Equilibration Buffer, per poi lisarli tramite French Press a una pressione di 1,35kBar. Questo macchinario è composto da una pompa idraulica che fa muovere un pistone all'interno del cilindro in cui è stato caricato il campione, applicando su di esso un'elevata pressione che lo spinge attraverso una valvola a spillo. Il passaggio attraverso questa valvola sottopone le cellule batteriche a sforzi di taglio e decompressione che risultano nella rottura della parete batterica e conseguente lisi.

Per evitare che le proteasi digeriscano le proteine nel campione lisato, si aggiunge a quest'ultimo un cocktail di proteasi e PMSF diluiti 1:100. Si centrifuga il lisato.

3.5.2 Colonnine gravity flow

Per la preparazione delle colonnine gravity flow si inseriscono 500µl di resina e, una volta che questa si sarà compattata, si aggiungono 500µl di Equilibration buffer, il quale permette di mettere in condizioni di lavoro la resina che era stata conservata in etanolo.

Dopo che l'Equilibration buffer è sceso, si fa passare attraverso le colonnine il surnatante dei campioni lisati precedentemente centrifugati. Il flow through viene fatto passare nuovamente attraverso la colonnina.

Si prosegue facendo scorrere più volte 500µl di Wash Buffer, controllando il flow through con colorante di Bradford, il quale, in presenza di proteine in soluzione, passa da un colore grigio a uno azzurro. L'imidazolo, presente in concentrazione maggiore nel Wash rispetto all'Equilibration, si lega ai chelati, sostituendo le proteine che si erano legate debolmente alla resina, ma non le 14-3-3. Quando il colorante non cambia più colore significa che all'interno della resina le uniche proteine presenti saranno quelle legate con maggiore affinità ai chelati, ovvero le 14-3-3, grazie alla loro His-tag, mentre tutte le altre, che hanno un'affinità più bassa, saranno state eliminate.

Infine, si fanno scorrere 500µl di Elution Buffer, in cui l'imidazolo è altamente concentrato, in modo da poter competere con l'His-tag per il legame ai chelati. Ciò che si ottiene è un eluato contenente le 14-3-3 purificate in soluzione.

3.6 SDS-PAGE

L'SDS-PAGE è una tecnica che permette la separazione di proteine in base alle loro dimensioni. L'SDS è un detergente ionico in grado di denaturare le proteine e di legare gli amminoacidi, mascherando eventuali cariche presenti su di essi. Essendo l'SDS negativo, quando lega le proteine crea attorno ad esse un rivestimento che conferisce loro una carica complessiva negativa. La carica è proporzionale alle dimensioni della proteina in modo che il rapporto tra le due sia uguale per tutte le proteine. In questo modo, durante la corsa elettroforetica, le proteine si separeranno puramente a seconda delle loro dimensioni e non della loro carica. La forma denaturata, inoltre, permette alle proteine di attraversare le maglie del gel più facilmente. Il gel di poliacrilamide è costituito da due parti: lo Stack e il Run.

Lo Stack contiene una percentuale di acrilamide più basso che permette l'allineamento delle proteine prima che queste entrino nel Run nel quale avviene l'effettiva divisione delle proteine.

3.6.1 Sample buffer

Affinché la corsa elettroforetica possa avvenire correttamente, le proteine caricate devono: essere denaturate e avere tutte cariche uguali. Questi requisiti possono essere soddisfatti aggiungendo ai campioni il Sample buffer, il quale contiene al suo interno:

- DTT, che rompe i ponti disolfuro, favorendo la denaturazione delle proteine;
- SDS;
- Agente per appesantire le proteine, permettendo di caricarle correttamente nei pozzetti;
- Un colorante che permette di visualizzare il campione al momento della carica nel pozzetto e durante la corsa elettroforetica.

3.6.2 Pesì di riferimento

I pesi di riferimento utilizzati sono i Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories S.r.l.). questi permetteranno di riconoscere le proteine in base al loro peso molecolare. (Fig.2)

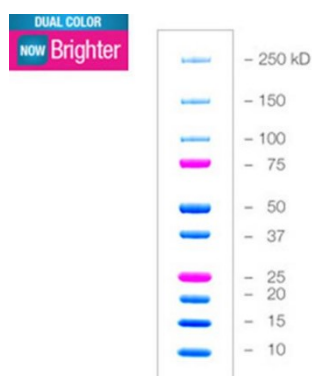


Fig.2 Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories S.r.l.)

Fig.7 Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories S.r.l.)

3.6.3 Preparazione gel

Si preparano 2 gel dello spessore di 1mm:

- Per 14ml di Run al 13%:
 - 5,67ml H₂O
 - 4,55ml Acryl 40%
 - 3,5ml Tris 1,5M (pH=8,8)
 - 140µl SDS 10%
 - 140µl APS 10%
 - 6µl Temed

- Per 4ml di Stack:
 - 1,754ml H₂O
 - 0,5ml Acryl 40%
 - 1,664ml Tris 0,3M (pH=6,8)
 - 40µl SDS 10%
 - 40µl APS 10%
 - 4µl Temed

Prima di caricare il gel, i campioni vanno lasciati a 90°C per 10min. Dopodiché si centrifugano e dal surnatante si prelevano i seguenti volumi da caricare nei pozzetti:

- Per controllo induzione:
 - 10µl di NI (campione Non Indotto) e 10µl di I (campione Indotto)
- Per controllo purificazione:
 - 10µl di NI e 10µl di I
 - 5µl di PFP (Pellet dopo French Press), SPF (Surnatante dopo French Press), FT1 (Flow Through 1) e FT2 (Flow Through 2)
 - 2µl di E (Eluato)

In ciascun gel si caricano anche 3µl dei pesi di riferimento.

3.6.4 Colorazione con Coomassie Brilliant Blue

Per rendere le proteine visibili è necessario immergere i gel in una soluzione di Coomassie Brilliant Blue, dove rimarranno over-night prima di sottoporli a una serie di lavaggi con una destaining solution.

Destaining solution:

- 10%v/v etanolo
- 10% v/v acido acetico

3.7 Desalinizzazione e scambio di tampone

Per poter correttamente mantenere le 14-3-3 purificate in vista di esperimenti futuri, è necessario sottoporre i campioni eluiti (E) a un processo di desalinizzazione e di cambio di tampone per evitare che l'imidazolo usato per l'eluizione vada a incidere sulla stabilità della proteina o a interferire con processi successivi.

3.7.1 Colonnine di desalinizzazione

Le colonnine di desalinizzazione utilizzate sono le PD MiniTrap G-10, della GE Healthcare. Seguendo le indicazioni del protocollo, dopo aver fatto defluire la soluzione di conservazione, si riempie la colonnina di PBS (Phosphate-Buffered Saline) e si lascia scorrere attraverso la resina. In totale si devono aggiungere 16ml

di PBS. Successivamente si possono aggiungere fino a 1,0ml di campione (E) per volta e, una volta che questo è entrato nella resina, si inserisce anche una quantità di buffer tale per cui il volume totale (campione +buffer) è pari a 1,7ml. Infine, si eluisce con 1,2ml di buffer PBS e si raccoglie l'eluato.

Dell'eluato si misura l'assorbanza per la quantificazione e poi si aggiunge DTT 3mM per evitare che le proteine si aggregino formando ponti disolfuro.

3.8 Quantificazione

Per la quantificazione delle proteine è stata misurata l'assorbanza dei campioni eluiti (E), caricati in cuvette di quarzo da 60 μ l, a una lunghezza d'onda di 280nm.

Per calcolare la concentrazione si può fare la proporzione tra l'assorbanza misurata e la Abs 0,1% (ovvero l'assorbanza quando la concentrazione è 1g/L).

I valori dell'Abs 0,1% sono stati ottenuti inserendo le sequenze amminoacidiche delle isoforme di 14-3-3 nel programma Protparam.

3.9 Resa di purificazione

Conoscendo il volume dell'eluato e la sua concentrazione, si può calcolare la quantità di proteina (in grammi) ottenuta.

4 RISULTATI

4.1 Efficienza di trasformazione

L'efficienza di trasformazione (ET) è una misura del numero di cfu (unità formanti colonia) che si ottiene trasformando un volume noto di cellule competenti con 1 µg di DNA. Per calcolarla, 100 µl di batteri competenti BL21(DE3) sono stati trasformati con 100 ng di DNA e piastrati in terreno LB solido, già contenete kanamicina (antibiotico). Dopo aver lasciato crescere over-night, il numero di colonie contato è circa 3200. Con 1 µg si otterrebbero quindi $3,2 \times 10^4$ colonie. Si applica la formula:

$$ET = \frac{\text{numero di colonie}}{\text{quantità di DNA}} \times \text{fattore di diluizione} = \frac{3,2 \times 10^4}{1 \mu\text{g}} \times 1 = 3,2 \times 10^4 \text{ colonie}/\mu\text{g}$$

(fattore di diluizione=1 perché è stato piastrato l'intero volume di batteri)

4.2 SDS-PAGE per controllo induzione

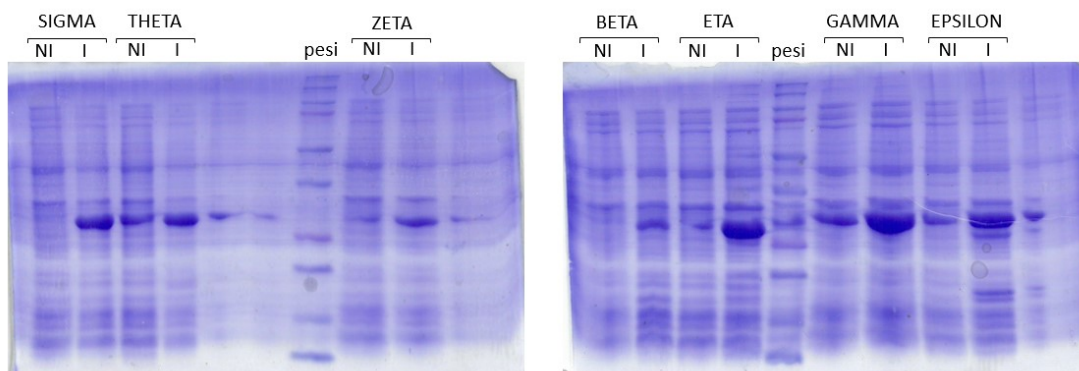


Fig.8 Gel per il controllo dell'induzione delle sette isoforme delle 14-3-3. (NI=Non Indotto, I=Indotto).

Per ciascuna delle sette isoforme delle 14-3-3 si prelevano dei campioni dalle colture batteriche prima e dopo l'induzione tramite aggiunta di IPTG 1M. Questi campioni vengono utilizzati per l'allestimento di un SDS-PAGE. I gel ottenuti (Fig8.) mostrano come l'induzione sia avvenuta in tutte le isoforme: negli indotti (I), si vedono chiaramente delle bande più scure e spesse, dovute alle elevate concentrazioni derivanti dalla sovraespressione delle proteine. Inoltre, se confrontata con quella dei pesi di riferimento, la posizione delle bande indica che la dimensione delle proteine è ~30kDa, corrispondente a quella delle 14-3-3.

Per alcune isoforme (gamma, epsilon, theta), l'espressione sembrerebbe essere avvenuta anche se non indotta. Questo potrebbe essere dovuto a problemi avuti durante la preparazione del gel e il successivo caricamento. Infatti, nel gel di controllo della purificazione, nonostante i campioni usati siano gli stessi, ciò non si osserva. Inoltre non può essere dovuta a casi di *leakage expression*: la regolazione dell'induzione dei batteri BL21(DE3), trasformati con pET28a, consente di ridurre la probabilità di *leakage expression*, che, pur non essendo nulla, non permetterebbe di osservare bande come quelle presenti nel gel.

4.3 SDS-PAGE per controllo purificazione

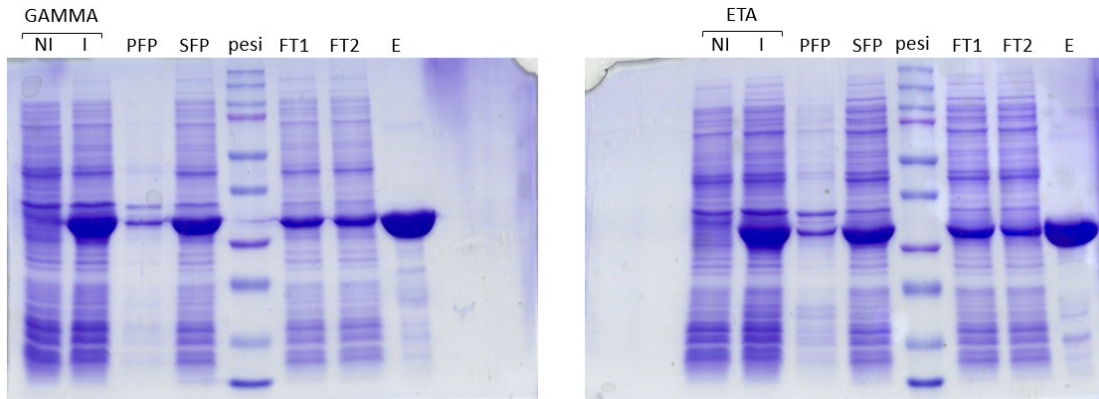


Fig.9 Gel per il controllo dell'induzione delle isoforme eta e gamma delle 14-3-3. (NI=Non Indotto, PFP=Pellet French Press, SFP= Surnatante French Press, FT1=Flow Through 1, FT2=Flow Through 2, E=Eluato).

Per il controllo della purificazione sono state scelte le 14-3-3 γ e 14-3-3 η (Fig.9), ovvero le isoforme che dimostrano una maggiore affinità per LRRK2. Ad ogni passaggio del processo sono stati prelevati dei campioni, che sono stati caricati in un gel di poliacrilamide. Per prima cosa le cellule batteriche trasformate vengono indotte per fare esprimere la proteina. Come già discusso nel paragrafo precedente, il campione indotto (I) mostra una marcata banda più scura rispetto al non indotto (NI), segno che l'induzione è avvenuta correttamente.

Il secondo passaggio, invece, prevede la lisi dei batteri tramite French Press e la successiva centrifugazione del campione lisato. Dopo la centrifuga si separa il surnatante (SFP=Surnatante French Press) dal pellet (PFP=Pellet French Press). Dall'osservazione di PFP e SFP le 14-3-3 appaiono altamente solubili (come previsto): la maggior parte delle proteine, infatti, si trova in SFP, anche se una piccola quantità è presente anche in PFP, probabilmente a causa della formazione di corpi di inclusione.

Successivamente il surnatante viene fatto passare, per due volte, attraverso una resina Ni-NTA per immobilizzare le 14-3-3 al suo interno. In entrambi i flow through ottenuti (FT1 e FT2) è presente ancora proteina. Questo perché la resina potrebbe essere stata satura.

Infine, si eluiscono le proteine ottenendo una soluzione (E) contenente le 14-3-3 purificate. Nel gel si può osservare anche la presenza di quelle che sembrerebbero essere altre proteine. Tuttavia, essendo queste solamente più piccole delle 14-3-3, potrebbero essere dei loro frammenti. Questi si potrebbero essere formati per azione delle proteasi, oppure, essendo la proteina sovraespressa, potrebbe essere stata tradotta a pezzi.

4.4 Resa di purificazione

Per ottenere la resa di purificazione, le sette isoforme purificate delle 14-3-3 sono state, per prima cosa, quantificate. Attraverso l'impiego dello spettrofotometro, è stata misurata l'assorbanza a 280nm (Fig.10) che, rapportata all'Abs0,1% (1 g/l), permette di ottenere la concentrazione della proteina in soluzione (Fig.11).

Conoscendo la concentrazione e il volume della soluzione, si calcola la massa della proteina purificata (Fig.11). Questa quantità è stata ottenuta partendo da una coltura di 50ml. Il valore calcolato è stato riportato a 1 litro.

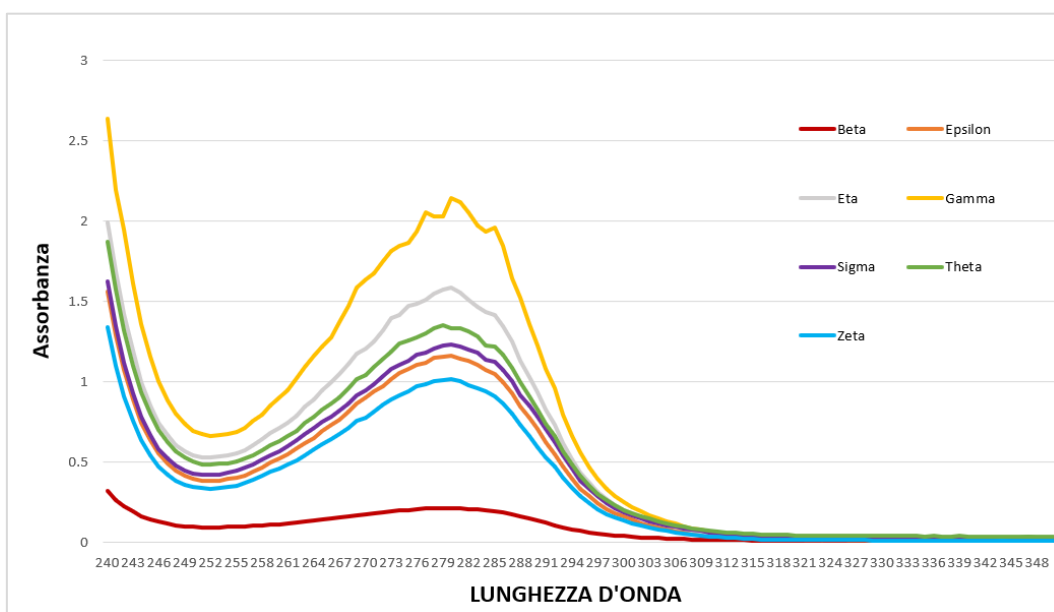


Fig.10 Assorbanza delle sette isoforme delle 14-3-3 a seguito della purificazione e cambio buffer.

Fig. 11 tabella riportante, per ciascuna isoforma, l'assorbanza (Abs) misurata, l'Abs 0,1%, la massa di proteina ottenuta partendo da 50ml di coltura e quella che si otterrebbe se fosse stata usata una coltura di 1l.

Isoforma	Abs misurata	Abs (0,1%)	Concentrazione (g/l)	Massa (g) (per 50ml)	Massa (g) (per 1l)
BETA	0,2129	0,98	0,217	$2,604 \times 10^{-4}$	$5,208 \times 10^{-3}$
ZETA	1	0,992	1,008	$1,210 \times 10^{-3}$	0,024
EPSILON	1,15	0,994	1,157	$1,388 \times 10^{-3}$	0,028
THETA	1,3	0,996	1,305	$1,566 \times 10^{-3}$	0,031
SIGMA	1,23	0,937	1,3127	$1,575 \times 10^{-3}$	0,032
ETA	1,58	1,028	1,537	$1,844 \times 10^{-3}$	0,037
GAMMA	2,13	1,13	1,88	$2,256 \times 10^{-3}$	0,045

5. DISCUSSIONE

Come dimostrato dalla resa di purificazione, le sette isoforme delle 14-3-3 mostrano diversi livelli di espressione. Poiché il processo di purificazione è stato svolto in contemporanea per tutte isoforme, queste differenze non possono essere dipendenti dal giorno o dall'operatore. Un'ipotesi potrebbe essere quella del *codon bias*: ovvero il meccanismo per cui, in un organismo, l'uso di certi codoni sinonimi è preferito rispetto ad altri. Le sequenze delle 14-3-3 usate sono quelle delle isoforme umane, ma l'organismo in cui sono state sintetizzate è *E.coli*; quindi, potrebbe accadere che codoni comuni nell'uomo siano, invece, rari nei batteri. Secondo questa ipotesi, una sequenza che presenta un maggior numero di codoni rari per *E.coli* avrebbe un livello di espressione più basso, perché questi potrebbero essere scambiati per codoni di stop.

Per testare se questa ipotesi fosse corretta sono stati individuati, nelle tavole di *codon usage* di *E.coli*, i codoni che vengono usati con minore frequenza (AGG, AGA, CGA, CUA e AUA). Successivamente è stata calcolata la frequenza di questi codoni rari all'interno della sequenza di ciascuna isoforma (Fig.12). I risultati ottenuti sembrerebbero portare ad escludere l'ipotesi del *codon bias*: l'isoforma beta, pur avendo una frequenza di codoni rari pari a circa la metà rispetto ad epsilon e zeta (Fig.12), il suo livello di espressione è circa cinque volte inferiore (Fig.11). Inoltre, l'espressione di beta è quasi sette volte inferiore rispetto a eta (Fig.11), nonostante le loro frequenze di codoni rari sia simile (Fig.12).

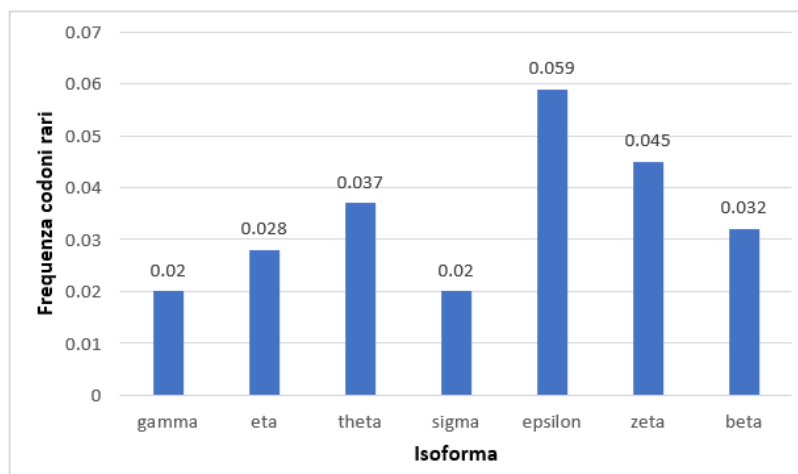


Fig.12 Frequenze dei codoni rari per *E. coli* nelle sette isoforme umane delle 14-3-3.

La differenza osservata nella resa delle sette isoforme non è comunque tale da compromettere gli studi successivi, per i quali sarà sufficiente potare le isoforme alla stessa concentrazione, così da poter confrontare correttamente la loro capacità di legare i residui fosforilati di LRRK2.

BIBLIOGRAFIA

1. Giusto E, Yacoubian TA, Greggio E, Civiero L. (2021) "Pathways to Parkinson's disease: a spotlight on 14-3-3 proteins.", *NPJ Parkinsons Dis.*, 7:85.
2. Rosenquist M, Sehnke P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C. (2000) "Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity?", *J Mol Evol* Nov, 51:446-458.
3. Obsilova V, Obsil T. (2022) "Structural insights into the functional roles of 14-3-3 proteins.", *Front Mol Biosci.* 9:1016071.
4. Obsil T, Obsilova V. (2011) "Structural basis of 14-3-3 protein functions." *Semin Cell Dev Biol.* 22:663-672.
5. Aitken A. (2011) "Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22:673–680.
6. Cornell B, Toyo-Oka K. (2017) "14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis." *Front Mol Neurosci.* 10:318.
7. Iannotta L, Greggio E. (2021) "LRRK2 signaling in neurodegeneration: two decades of progress." *Essays Biochem.* 65:859-872.
8. Usmani A, Shavarebi F, Hiniker A. (2021) "The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's Disease." *Mol Cell Biol.* 41:e00660-20
9. Civiero L, Cogo S, Kiekens A, Morganti C, Tessari I, Lobbstaël E, Baekelandt V, Taymans JM, Chartier-Harlin MC, Franchin C, Arrigoni G, Lewis PA, Piccoli G, Bubacco L, Cookson MR, Pinton P, Greggio E. (2017) "PAK6 Phosphorylates 14-3-3 γ to Regulate Steady State Phosphorylation of LRRK2." *Front Mol Neurosci.* 10:417
10. Cogo S, Ho FY, Tosoni E, Tomkins JE, Tessari I, Iannotta L, Montine TJ, Manzoni C, Lewis PA, Bubacco L, Chartier Harlin MC, Taymans JM, Kortholt A, Nichols J, Cendron L, Civiero L, Greggio E. (2022) "The Roc domain of LRRK2 as a hub for protein-protein interactions: a focus on PAK6 and its impact on RAB phosphorylation." *Brain Res.* 1778:147781

