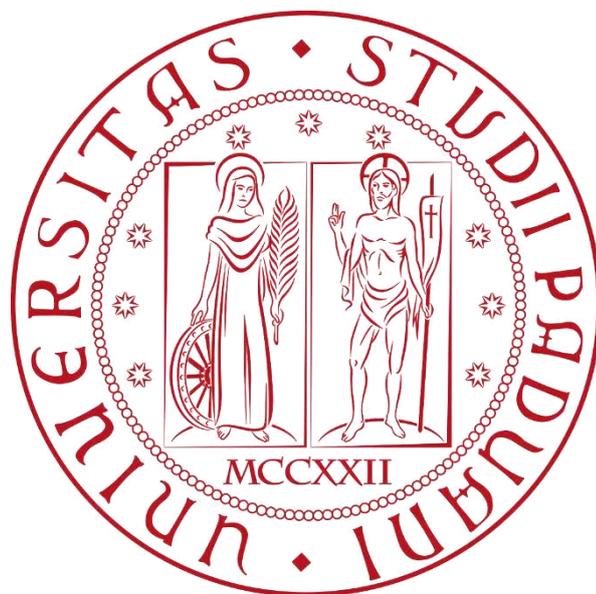


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA  
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE



ELABORATO DI LAUREA

**UTILIZZO DELLA TECNICA WESTERN BLOTTING PER LO STUDIO  
DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA SERCA1 CHE CAUSA UNA  
MIOPATIA CONGENITA NEI BOVINI OMOLOGA ALLA MIOPATIA  
UMANA DI BRODY.**

**Tutor: Prof.ssa Roberta Sacchetto**

**Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

**Laureanda : Serena Franzin**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

## Sommario

<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>STORIA DEL WESTERN BLOT</b>	<b>4</b>
<b>DESCRIZIONE DELLA TECNICA</b>	<b>6</b>
1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	6
2. GEL ELETTROFORESI	7
3. PREPARAZIONE DEL GEL	7
4. TRASFERIMENTO PROTEINE	9
5. INCUBAZIONE ANTICORPI	10
6. RILEVAZIONE SEGNALE	10
<b>TIPOLOGIE DI WESTERN BLOT</b>	<b>11</b>
<b>APPLICAZIONI DEL WESTERN BLOT</b>	<b>12</b>
<b>VANTAGGI E SVANTAGGI</b>	<b>13</b>
<b>MIGLIORIE APPORTATE ALLA TECNICA</b>	<b>14</b>
<b>MIOPATIA DI BRODY E PESUDOMIOTONIA BOVINA</b>	<b>15</b>
<b>PROTEINA SERCA</b>	<b>15</b>
<b>WESTERN BLOT APPLICATO ALLA PSEUDOMIOTONIA</b>	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>20</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>21</b>

## ABSTRACT

Il Western blot è una tecnica di laboratorio che permette l'identificazione e la caratterizzazione specifica delle proteine. Tale tecnica è stata ottimizzata nel laboratorio di George Stark a Stanford, mentre il nome Western blot gli viene assegnato nel 1981 da W.Neal Brunette. Il western blot prevede che le proteine vengano separate mediante elettroforesi su un gel SDS-PAGE e successivamente trasferite elettroforeticamente su una membrana di nitrocellulosa che viene incubata con anticorpi specifici. La presenza di anticorpi permette il riconoscimento e l'identificazione della proteina di interesse. Questo è un metodo importante e di routine per l'analisi delle proteine ed è sfruttabile per l'identificazione semiquantitativa o qualitativa di proteine specifiche e del loro peso molecolare da una miscela complessa. Questa tecnica, per quanto antica, risulta ancora largamente utilizzata nei laboratori biochimici e clinici.

Il Western blot si è rivelato essenziale nello studio della malattia di Brody umana e della Pseudomiopia congenita bovina, poiché ha permesso l'identificazione e l'analisi dell'espressione della proteina SERCA1, dalla quale si è constatato che tale proteina è sotto espressa e presenta una conformazione errata nelle due patologie.

# INTRODUZIONE

Il Western Blot, che prende anche il nome di immunoblotting, è una comune e potente tecnica che permette l'identificazione e la semi-quantificazione di una proteina individuale a partire da un insieme di proteine estratte da cellule o tessuti. Tale tecnica permette inoltre l'identificazione di specifici amminoacidi nelle proteine post-traduzionalmente modificate nella cellula a causa di cambiamenti fisiologici, sia in condizioni di salute che di malattia. Il western blot, al giorno d'oggi, è una delle più comuni, anche se ormai datata, tecniche utilizzate in proteomica e in tutti i laboratori scientifici nel mondo. La tecnica del western blot prevede più passaggi, l'estrazione delle proteine dalle cellule, la loro quantificazione e separazione mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e infine il loro trasferimento su membrana e la valutazione mediante immunoblotting.

# STORIA DEL WESTERN BLOT

La tecnica del Western blot viene nominata per la prima volta più di 42 anni fa, più precisamente nel 1979. Da quel momento, questa tecnica è stata citata nelle parole chiave e nei titoli di oltre 400.000 articoli su PubMed. Questi dati evidenziano l'importanza della tecnica Western Blot e il suo continuo ed attuale impiego nei laboratori di bioscienze. E' quindi fondamentale esplorare la storia dietro questa tecnica per comprendere le motivazioni che hanno portato al suo sviluppo-

Il tutto ebbe inizio nel 1807 quando un fisico dell'Università statale di Mosca, Ferdinand Frederic Reuss, rilevò che quando l'elettricità veniva fatta passare attraverso un tubo di vetro con acqua e argilla, le particelle d'argilla tendevano a muoversi verso l'elettrodo positivo. Tale scoperta portò nel 1946 in Svizzera all'invenzione dell'elettroforesi su gel. Successivamente nel 1955 Oliver Smithies, genetista inglese premio Nobel per la medicina del 2007, riuscì a dividere gli estratti di tessuto umano utilizzando proprio l'elettroforesi su gel di amido. Questo esperimento permise conseguentemente di rilevare la diversità genomica a livello delle proteine.

Negli anni successivi più gruppi di ricerca lavorarono sulla tecnica, in particolare si riconoscono tre principali pubblicazioni scientifiche al centro dell'origine del Western blotting. Il primo luglio 1979 il laboratorio di George Stark pubblicò un metodo che utilizzava la diffusione per il trasferimento

delle proteine su una membrana. Tale metodo si avvaleva dell'utilizzo di una miscela di gel di poliacrilamide/agarosio per la matrice di separazione, carta di diazobenzilossimetile come membrana e proteina A marcata con 125-iodio per consentire il rilevamento, il tutto reso possibile dallo sfruttamento della forza capillare. Sempre nel 1979 fu reso noto un altro lavoro di Towbin e colleghi in cui furono impiegate forze elettroforetiche per il trasferimento di proteine invece che forze capillari. In questo esperimento gli scienziati utilizzarono l'elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) come matrice di separazione, una membrana di nitrocellulosa e anticorpi per l'identificazione delle proteine. Infine nel 1981 W. Neal Brunette in un sua pubblicazione, assegnò il nome di Western blotting ad una procedura simile a quelle citate in precedenza. Questo nome prende spunto dalla collocazione geografica del suo laboratorio, situato sulla costa ovest degli Stati Uniti. Il metodo, utilizzato da Brunette, è del tutto comparabile a quello di Towbin e dei suoi colleghi, in quanto entrambi utilizzarono l' SDS-PAGE, la forza elettroforetica e la membrana di nitrocellulosa. Diversamente però il metodo di Brunette si avvale anche dell'uso delle proteina A radiomarcata per l'immobilizzazione.

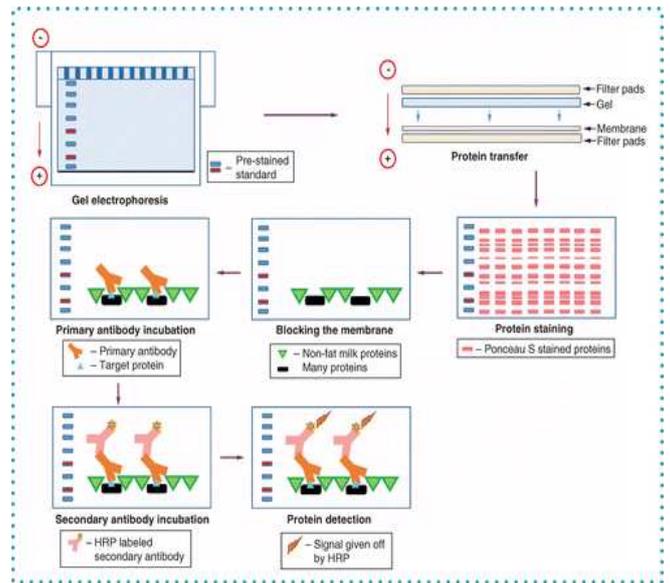
Dall'anno del suo sviluppo nel 1979 due progressi chiave sono entrati a far parte della storia del western blot: l'elettroforesi capillare e lo sviluppo di Western Blot a cellula singola. L'elettroforesi capillare prevedeva l'utilizzo di capillari di nanovolume per separare le proteine attraverso una matrice di impilamento e risoluzione. Le proteine una volta separate venivano immobilizzate mediante foto attivazione sulla parete del tubo capillare. Rispetto all'elettroforesi tradizionale, l'elettroforesi capillare offre un vantaggio significativo grazie alle dimensioni dei capillari, che sono lunghi e sottili. Questo comporta un rapporto area superficiale/volume più elevato, riducendo così il surriscaldamento che si verifica a tensioni elevate.

Diversamente invece i Western blot unicellulari, che furono menzionati per la prima volta dal laboratorio di Amy Herr, consentono il Western blotting a livello di singola cellula sfruttando un vetrino per microscopia con gel di poliacrilamide fotosensibile dotato di micropozzetti. Grazie a questo metodo, fu possibile analizzare i cambiamenti a livello della singola cellula e, inoltre, esaminare grandi quantità di cellule in tempi brevi, entro le 4 ore.

Questa tecnica, nonostante risalga a più di 40 anni fa, rimane ancora una delle tecniche più comunemente utilizzate nello studio delle proteine superando sia la tecnica ELISA che l'immunoistochimica IHC.

# DESCRIZIONE DELLA TECNICA

La tecnica Western blot si compone di diversi importanti passaggi. Prima di tutto viene preparato il campione di proteine nel modo più appropriato. Successivamente si utilizza l'elettroforesi su gel per separare le proteine in base alla loro dimensione. Le proteine con peso molecolare maggiore si spostano più lentamente rispetto a quelle con peso minore, tale spostamento è permesso dalla corrente elettrica che viene fatta passare attraverso il gel. Le proteine migrano verso l'elettrodo positivo in quanto esse sono cariche negativamente dopo il trattamento con sodio-dodecil-solfato (SDS). Successivamente alla separazione su gel, avviene il trasferimento delle proteine su una membrana utilizzando anche qui una carica elettrica. Viene poi effettuato il blocco della membrana con albumina sierica bovina (BSA) per evitare che gli anticorpi si leghino ad essa in modo aspecifico e successivamente incubata con l'anticorpo primario, mentre un anticorpo secondario viene utilizzato per l'identificazione della proteina di interesse.



## 1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il primo passo per ottenere dei buoni risultati utilizzando la tecnica Western blot è la preparazione del campione. Per poter ottenere dei risultati che siano riproducibili è necessario effettuare un'efficiente estrazione e purificazione delle proteine utilizzando il metodo di omogenizzazione più adatto a rilasciare il contenuto intracellulare attraverso la rottura delle membrane cellulari.

I possibili metodi di omogenizzazione utilizzati sono i seguenti: macinazione con perle di vetro, ultrasonificazione, omogenizzazione meccanica, french press, macinazione manuale con uso di pestello e mortaio.

Per ottenere un campione di qualità per le fasi successive del Western blot, è fondamentale congelare rapidamente i tessuti con azoto liquido o, in alternativa, lisarli il più velocemente possibile per prevenire la degradazione causata dalle proteasi endogene. Il tampone di lisi che viene utilizzato dev'essere appropriato per il tipo di tessuto e la localizzazione cellulare della proteina bersaglio, fra i vari tamponi troviamo: tampone per il test di radio

immunoprecipitazione (RIPA) , tamponi Tris-Triton o Tris-HCL con inibitori delle proteasi/fosfatasi e Nonidet P-40.

Dopo la lisi i campioni vengono centrifugati per la rimozione dei detriti cellulari o per l'arricchimento del campione di interesse ottenuto grazie al frazionamento del tessuto.

## 2. GEL ELETTROFORESI

Dopo aver preparato il campione proteico è necessario andare a separare le proteine attraverso l'elettroforesi su gel. L'elettroforesi può essere svolta utilizzando diverse matrici, tra le quali troviamo agarosio, acrilammide o amido. Nel caso delle proteine la matrice di più comune utilizzo è l'acrilammide, poiché la sua polimerizzazione può essere fortemente regolata per consentire la formazione di gel forti, con dimensioni riproducibili dei pori. Molto importante è anche il rapporto tra acrilammide e bisacrilammide che è pari a 37,5:1 nel caso in cui si voglia ottenere un frazionamento proteico ad alta risoluzione. Utilizzando il gel di acrilammide si possono fare due diverse tipologie di elettroforesi : l'elettroforesi nativa e l' SDS-PAGE. L'elettroforesi nativa viene utilizzata per l'analisi delle proteine native, le proteine non denaturate vengono separate in base alla loro carica, forma e dimensione. In questo caso non risulta quasi mai necessario l'utilizzo di SDS in quanto la gran parte delle proteine presenta già una carica netta negativa essendo trattata in tamponi alcalini. In questa metodica l'attività enzimatica delle proteine rimane integra e la gran parte delle subunità componenti la proteina interagiscono fra loro correttamente.

Per quanto riguarda il western blot la tecnica di più comune utilizzo è invece l' SDS-PAGE , che permette di analizzare complesse miscele di proteine e separarle in base al loro peso molecolare. La caratteristica peculiare di questo metodo è proprio data dall'utilizzo dell' SDS, detergente anionico che reagisce prontamente con le proteine portando alla formazione di complessi carichi negativamente. La carica negativa viene fornita dal gruppo  $SO_4$  dell' SDS (sodio dodecilsolfato). Il rapporto con cui si lega alle proteine l' SDS è di un anione per ogni due amminoacidi. Una volta legati alle proteine esse ottengono una carica netta negativa proporzionale alla loro dimensione molecolare e sono quindi in grado di viaggiare verso l'elettrodo positivo in base alle loro dimensioni molecolari.

## 3. PREPARAZIONE DEL GEL

Il primo passo da effettuare per ottenere un gel elettroforetico consiste nell'andare ad aggiungere il tampone di corsa ai pozzetti nel gel. I tamponi di corsa che vengono comunemente utilizzati sono Tris-glicina, acetato, l'acido 2-etansolfonico, l'acido

3propansolfonico, il tris acetato, per finire la ricetta. Ogni componente del tampone di corsa ha un ruolo ben specifico. Ad esempio l'acetato presenta una buona capacità di separazione nell'intervallo di massa più elevato (100-500kDa), o ancora la glicina fornisce gli ioni glicinato per formare l'estremità finale durante l'elettroforesi nello stacking gel, come verrà spiegato successivamente.

Il sistema che viene più comunemente utilizzato per l'SDS-PAGE prevede l'uso di un sistema tampone discontinuo. Esso è caratterizzato da un gel avente due diverse soluzioni di poliacrilamide: nella parte alta si trova il gel spaziatore che prende anche il nome di STACKING gel, che presenta pori più grandi ed è tamponato a pH 6,8, sotto invece si colloca il gel di corsa RESOLVING o RUNNING gel, con pori più piccoli e tamponato a pH 8,8. I componenti essenziali del tampone sono il Tris-HCl e la glicina. Tali componenti sono essenziali per permettere il corretto impilamento delle proteine all'inizio della corsa elettroforetica.

Infatti, nello stacking gel, una volta fatta partire la corsa, il cloro, molecola estremamente piccola e molto carica negativamente, migra velocemente verso l'elettrodo positivo fino al raggiungimento del resolving gel. Dietro il cloro si trovano le proteine e infine la glicina che presenta una bassissima carica negativa e di conseguenza migrerà più lentamente. Quindi sulla linea che divide i due gel le proteine si trovano schiacciate fra il cloro e la glicina concentrate così in una banda sottile, all'interfaccia dei due gel.

La differenza nella dimensione dei pori fra i due gel provoca una maggiore resistenza delle proteine quando entrano nel gel di corsa avendo esso maglie più strette. Il gel di corsa ha anche un pH più elevato, necessario per deprotonare i gruppi amminici N-terminali sulle proteine rendendole più cariche negativamente. Come risultato del pH più elevato e della maggiore concentrazione di Tris-HCl nel gel di corsa gli ioni glicinato e Cl si muovono entrambi più velocemente degli ioni proteici. Le proteine, di seguito, si separano invece in base al loro peso molecolare.

L'altra tipologia di sistema è dato invece da un tampone continuo dove il gel è generalmente costituito da una concentrazione continua del monomero di acrilammide e il campione viene caricato direttamente nel gel dove avverrà la separazione. I campioni sono solitamente concentrati e i volumi sono piccoli per ottenere risultati migliori.

I sistemi a tampone discontinui si rivelano però più vantaggiosi rispetto ai sistemi tamponi continui, poiché è possibile applicarli a grandi volumi di campioni proteici diluiti ed ottenere lo stesso una buona risoluzione del campione.

#### 4. TRASFERIMENTO PROTEINE

Dopo aver effettuato la corsa elettroforetica è necessario trasferire le proteine opportunamente separate in un supporto rappresentato da una membrana sottile. Il trasferimento delle proteine su una membrana immobilizzante permette il blocco della diffusione delle proteine e rende più accessibili gli epitopi dell'antigene all'anticorpo. La membrana sulla quale vengono trasferite le proteine può essere di cellulosa, nitrocellulosa, polivinilidene difluoruro PVDF, acetato di cellulosa, polietere solfone e nylon attivato. La membrana di più comune utilizzo è la nitrocellulosa, essa infatti presenta un'elevata affinità di legame proteico, buona capacità di distinzione fra proteine grandi e piccole e di immobilizzazione di proteine e glicoproteine. Inoltre è compatibile con i vari metodi di rilevamento (cromogenico, fluorescenza e chemiluminescenza). Per ottenere la nitrocellulosa si tratta la cellulosa con l'acido nitrico, ottenendo una fragile membrana di nitrato di cellulosa. Nel caso in cui invece si voglia utilizzare più volte la membrana è consigliabile preferire il PVDF che presenta una migliore resistenza meccanica rispetto alle membrane in nitrocellulosa, rendendole così adatte per lo stripping/reprobing e per il successivo sequenziamento degli amminoacidi. Un limite del PVDF è dato dal fatto che alle volte può fornire una colorazione di fondo più elevata rispetto alla nitrocellulosa, richiedendo così una maggiore ottimizzazione.

Le metodiche che permettono di trasferire con successo le proteine da un gel a una membrana sono diverse, tramite il trasferimento capillare, la diffusione, l'elettroblotting e il blotting sotto vuoto.

L'elettroblotting è realizzabile utilizzando un campo elettrico perpendicolare alla superficie del gel, in questo modo le proteine cariche si spostano tramite corrente elettrica dal gel alla membrana. Per permettere questo spostamento la membrana viene posta di fronte all'elettrodo positivo, mentre il gel di poliacrilamide di fronte a quello negativo. La membrana e il gel devono essere inseriti fra loro per consentire un trasferimento efficiente. E' necessario però proteggere la membrana e il gel, per far ciò si utilizzano dei tamponi in fibra (spugne) a ciascuna estremità per contribuire alla formazione di un sandwich stretto tra il gel e la membrana. Tale sandwich si compone di una spugna con sopra un foglio di carta da filtro, il gel, la membrana, un secondo foglio di carta da filtro e infine un'altra spugna uguale a quella posta in precedenza. Quest'accorgimento previene la formazione di bolle tra il gel e la membrana che potrebbero portare a risultati imprecisi.

Prima di procedere con l'incubazione con gli anticorpi è necessario effettuare il blocco dei siti aspecifici della membrana , cioè la sua saturazione, per evitare che gli anticorpi si leghino ad essa in modo non specifico. In questo modo si va a ridurre il rumore di fondo e ad evitare i falsi positivi.

Per fare in modo che venga bloccato il legame non specifico si incuba la membrana in albumina bovina sierica (BSA) o latte in polvere senza grassi diluito in soluzione salita tamponata contenente il detergente Tween 20 o altri detergenti non aggressivi . Il tempo di incubazione è di circa un'ora a temperatura ambiente. Le proteine contenute all'interno del latte o della BSA si legano a quelle zone della membrana leganti le proteine alle quali però le proteine trasferite dal gel non si sono legate. Lo scopo di questi legami è prevenire le interazioni non specifiche che si andrebbero ad instaurare fra gli anticorpi e la membrana.

#### 5. INCUBAZIONE ANTICORPI

Il passo successivo consiste nell'andare ad incubare la membrana con l'anticorpo primario, lavarla con TBST o PBST, incubarla nuovamente con l'anticorpo secondario e lavare ancora.

Gli anticorpi primari si distinguono per la loro selettività, che gli permette loro di legarsi preferibilmente all'antigene bersaglio, in presenza di una miscela complessa di proteine e per la loro specificità, ovvero la loro capacità di riconoscere e legarsi solo al rispettivo antigene bersaglio.

L'anticorpo secondario invece ha come scopo il riconoscimento dell'anticorpo primario e la produzione di un segnale. Per consentire il rilevamento di tale segnale l'anticorpo secondario viene tendenzialmente coniugato ad un enzima, come ad esempio l'HRP.57 o la fosfatasi alcalina AP.

I lavaggi che si effettuano dopo le due incubazioni con PBST o TBST sono fondamentali per ridurre al minimo il rumore di fondo e rimuovere gli anticorpi non legati.

#### 6. RILEVAZIONE SEGNALE

L'ultima fase del Western Blot prevede il rilevamento delle sonde sugli anticorpi marcati legati alla proteina di interesse. Per andare ad effettuare il rilevamento possono essere utilizzati diversi metodi : colorimetrici, radioattivi, fluorescenti. Nel caso del Western Blot la tecnica di più comune utilizzo è sicuramente il rilevamento chemio luminescente (ECL).

L'ECL prevede che l'anticorpo secondario sia marcato con l'enzima HRP, che catalizza l'ossidazione del luminolo in presenza di perossido a 3-amminoftalato, emettendo 428nm di luce, l'emissione viene rilevata dalla pellicola o da una fotocamera con dispositivo a

coppia carica e da imager digitali. La quantità di luminescenza prodotta dalla reazione è relativa alla quantità di proteine rilevata. Al posto della chemiluminescenza per il rilevamento del segnale è possibile utilizzare anche la fluorescenza che utilizza anticorpi secondari coniugati con colorante fluorescente. Uno dei vantaggi più importanti di questo metodo, rispetto a quello citato prima, è dato dal possibile rilevamento di bersagli multipli sfruttando l'azione di fluorofori con spettri di eccitazione-emissione non sovrapposti. Tuttavia però i fluorofori presentano prestazioni scarse nell'intervallo del visibile, limitando così il loro utilizzo.

## TIPOLOGIE DI WESTERN BLOT

Una delle più importanti variazioni che sono presenti all'interno della tecnica del Western blot è relativa alla fase di incubazione con gli anticorpi e di riconoscimento della proteina. Essa infatti può avvenire in modo diretto o indiretto.

Nel western blot diretto, si utilizza solamente l'anticorpo primario legato direttamente ad un enzima o ad un fluoroforo. L'anticorpo in questo modo è in grado di riconoscere e legarsi specificatamente alla proteina bersaglio.



Nel western blot indiretto invece si utilizzano sia l'anticorpo primario che quello secondario. L'anticorpo primario è specifico per la proteina bersaglio ma non è coniugato. L'anticorpo secondario invece è coniugato ad un enzima o a un fluoroforo e viene utilizzato per riconoscere e legare l'anticorpo primario.



Il western blot diretto è un metodo più semplice e veloce in quanto non necessita del secondo anticorpo e ha un tempo di incubazione minore, quello indiretto offre però una maggiore sensibilità, in quanto permette un'amplificazione del segnale dovuta al legame di più anticorpi secondari su ciascun anticorpo primario. Inoltre risulta più flessibile vista l'ampia disponibilità di enzimi e fluorofori utilizzabili. Infine gli anticorpi secondari coniugati tendono ad essere meno costosi e di più facile reperibilità. Per contro la metodica indiretta ha un maggior rischio di legami non specifici dovuti all'utilizzo di due anticorpi.

Il western blot inoltre differisce nel modo in cui viene rilevato il segnale. Si può utilizzare infatti il western blot in fluorescenza, in chemiluminescenza e colorimetrico.

La metodica di western blot in fluorescenza utilizza un anticorpo secondario coniugato con un fluoroforo, in questo modo non è necessario nessun substrato. Tale sistema è meno sensibile rispetto alla chemiluminescenza e necessita di uno strumento, reperibile in commercio, che sia in grado di catturare la fluorescenza e tradurla in immagine. Consente però, di eseguire saggi multiplex usando fluorofori differenti.

Diversamente invece il western blot in chemiluminescenza sfrutta un anticorpo secondario coniugato con un enzima e un substrato luminescente. I risultati vengono rilevati mediante l'utilizzo di una pellicola radiografica o mediante un sistema di imaging digitale. Tale metodo consente buoni livelli di sensibilità ma i risultati possono essere non lineari e il segnale rilevato è di breve durata.

Un altro metodo per rilevare il segnale è il western blot colorimetrico, che utilizza un anticorpo secondario coniugato con un enzima e un substrato cromogeno per la rilevazione. La sensibilità di questa tecnica è però limitata.

## APPLICAZIONI DEL WESTERN BLOT

Il western blot come già detto in precedenza è un eccellente metodo per la rilevazione e la quantificazione di proteine anche in basse quantità. E' infatti possibili misurare l'abbondanza relativa di una proteina in diversi campioni e monitorare cambiamenti nei livelli di espressione proteica, in risposta a trattamenti sperimentali o condizioni patologiche. Sempre tramite il western blot è possibile effettuare un'analisi delle modifiche post-traduzionali delle proteine, rilevando modifiche chimiche come fosforilazione, glicosilazione e acetilazione.

Poiché il western blot rileva le proteine in base alle loro dimensioni e alla capacità di legarsi all'anticorpo, è appropriato per valutare le espressioni proteiche nelle cellule e per svolgere ulteriori analisi delle frazioni proteiche durante la purificazione delle proteine.

Il western blot è utilizzato nella diagnosi clinica di varie malattie genetiche, virali e autoimmuni. Ad esempio, il test di conferma per l'HIV prevede l'uso del Western blot per la rilevazione di anticorpi anti-HIV nel siero. Inoltre è un metodo fondamentale nella ricerca sulle malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la SLA. Nella ricerca sul cancro, il western blot permette studi approfonditi sulle proteine associate alla metastasi e all'invasione cellulare.

Un'altra rilevante applicazione del western blot è data dal suo utilizzo per l'analisi di differenti biomarcatori come ormoni, citochine e fattori di crescita.

Infine, il western blot interviene anche nello studio dell'immunologia, permettendo il rilevamento di anticorpi specifici per l'identificazione di risposte immunitarie e la validazione di anticorpi monoclonali o policlonali sviluppati per applicazioni diagnostiche o terapeutiche.

Il Western blot quindi, grazie alla sua capacità di rilevare e quantificare proteine specifiche con alta precisione e specificità, si è rivelato uno strumento cruciale in molte aree della ricerca biomedica e della diagnostica.

## VANTAGGI E SVANTAGGI

La tecnica del Western blot, come qualsiasi altra tecnica presenta una serie di vantaggi e di svantaggi. Uno dei vantaggi principali è senza dubbio la sua sensibilità, che gli permette di individuare anche le proteine meno abbondanti. Altro importante vantaggio è dato dalla specificità che consente di rilevare in maniera univoca una proteina di interesse in presenza di una miscela complessa di altre proteine.

Il western blot, inoltre, si presenta come una tecnica estremamente flessibile e versatile, rendendo possibile l'analisi di campioni provenienti da una vasta gamma di fonti biologiche, che vanno da cellule a tessuti o fluidi biologici. Inoltre, se adeguatamente standardizzato, il western blot permette di quantificare la quantità relativa di proteina tra campioni diversi.

Per contro però il western blot si presenta come una tecnica lunga e complessa, che necessita infatti di una serie di passaggi, ciascuno dei quali dev'essere eseguito con cura e precisione. Inoltre, è sensibile alle contaminazioni da parte di altre proteine durante la preparazione del campione o durante l'analisi stessa.

L'interpretazione dei risultati del western blot dipende anche dalla corretta esecuzione della tecnica e da un'analisi appropriata delle bande proteiche.

Nonostante, come detto prima, il western blot possa essere utilizzato per la quantificazione relativa di una proteina, non è possibile ottenere una quantificazione assoluta a causa della variazione nella resa della colorazione e della linearità del rilevamento.

Infine, il Western blot richiede l'acquisto di reagenti e attrezzature specifiche che possono rendere la tecnica costosa rispetto ad altre tecniche di analisi proteica.

## MIGLIORIE APPORTATE ALLA TECNICA

Considerando l'importanza crescente della tecnica del Western blot negli anni, la ricerca sta continuamente cercando di apportare miglioramenti per ridurre la durata del processo, minimizzare gli errori e aumentare l'efficienza.

Un primo miglioramento è dato dallo sviluppo di gel pre confezionati, che permettono di ridurre drasticamente i tempi della tecnica fornendo gel già pronti per essere utilizzati. Un altro importante miglioramento che è stato introdotto per il western blot nel 2016 è l'elettroforesi capillare e microchip. Vengono caricate su un microchip iniezioni multiple dello stesso campione, trasferite poi su una membrana di PVDF tramite immunoassay e poi rilevate. Questo è un ibrido tra il blotting convenzionale e l'elettroforesi capillare per SDS-PAGE, permette una maggiore risoluzione e sensibilità andando a rilevare più proteine contemporaneamente nello stesso campione.

Relativamente invece alle tecniche di trasferimento delle proteina da gel a membrana di nitrocellulosa ad esempio, sono stati inoltre sviluppati diversi strumenti che permettono un netto miglioramento nell'efficienza e nella velocità rispetto alla tecnica classica. Un esempio è il sistema Tran-Blot Turbo che è un metodo estremamente rapido (3-10minuti) per trasferire proteine dal gel alla membrana senza l'uso del metanolo. Prende il nome di tecnologia "semi-dry" perché, a differenza del western blot, non richiede l'immersione in un tampone ma utilizza carta da filtro imbevuta di buffer all'interno del sandwich.

Un altro strumento che ha apportato importanti miglioramenti è lo SNAP, strumento estremamente veloce che permette l'esecuzione del blotting e dell'immuno-incubazione in soli 22 minuti.

# MIOPATIA DI BRODY E PESUDOMIOTONIA BOVINA

La miopatia di Brody è una rara malattia congenita, autosomica recessiva, contraddistinta da mutazioni missenso a carico del gene ATP2A1 codificante per la Ca-ATPasi muscolare scheletrica, detta SERCA1. Essa si manifesta generalmente durante l'infanzia ed è caratterizzata da una compromissione del rilassamento muscolare durante l'esercizio fisico che si esprime come rigidità muscolare principalmente a livello degli arti soprattutto inferiori, delle palpebre e delle mascelle.

In studi precedenti è stata descritta in due razze bovine, la Chianina (2008) e la Romagnola, la presenza di una malattia denominata Pseudomiopia (PTM) caratterizzata da una sintomatologia molto simile a quella della miopatia di Brody umana e causata anch'essa da mutazioni missenso della proteina SERCA1.

Nei bovini di razza chianina questo disturbo si verifica solo nel momento in cui gli animali vengono forzati ad effettuare movimenti veloci e improvvisi, come una camminata a passo sostenuto, oppure movimenti dovuti a stress da trasporto o ad uno spavento improvviso. Di seguito a questi fenomeni l'animale presenta un'andatura rigida e scoordinata data da un irrigidimento temporaneo del muscolo. Inoltre, se l'esercizio viene eseguito ad alte intensità per un periodo prolungato di tempo la contrazione provoca la caduta a terra dell'animale. Nonostante ciò, dopo pochi secondi di inattività le capacità motorie vengono pienamente riacquisite.

## PROTEINA SERCA

La proteina SERCA1 è una proteina di membrana di 110kDa situata nel reticolo sarcoplasmatico, che trasporta 2 ioni  $Ca^{2+}$  dal citoplasma al lume del RS sfruttando l'energia derivata dall'idrolisi di una molecola di ATP. Presenta due siti conformazionali E1 ed E2. La prima conformazione E1 è caratterizzata da un'affinità elevata per il  $Ca^{+}$ , essa ha infatti il compito di legare i due ioni nel citosol e una molecola di ATP. Successivamente all'idrolisi dell'ATP la proteina cambia la sua conformazione in E2 che presenta un'affinità per il calcio minore. Questo cambiamento di conformazione e di conseguente affinità provoca il rilascio dei due ioni  $Ca^{+}$  nel lume del reticolo sarcoplasmatico. Infine, SERCA1 ritorna nella conformazione iniziale E1 e ricomincia il suo ciclo.

Nel caso della Pseudomiopia bovina nella razza Chianina, la proteina SERCA1 presenta una mutazione missenso nell'esone 6 del gene ATP2A1,

dovuta alla sostituzione di una singola coppia di basi che determina la sostituzione dell'amminoacido arginina con l'istidina in posizione 164. Tale mutazione comporta una sotto espressione della proteina SERCA1 nelle membrane del RS che si esprime con una più prolungata presenza degli ioni Ca nel citoplasma portando ad un legame actina-miosina prolungato che impedisce il rilassamento muscolare. Nella Romagnola invece, oltre alla mutazione missenso nell'esone 6 del gene ATP2A1, si sono riscontrate altre due mutazioni missenso nell'esone 8 che comportano la sostituzione dell'amminoacido glicina in valina in posizione 211 e 286.

Infine, anche nel caso della miopatia di Brody è stato identificato ad oggi un unico gene coinvolto, ATP2A1, la mutazione di tale gene comporta anche in questo caso una diminuzione dell'attività Ca-ATPasica.

La proteina SERCA1 si trova localizzata, nel reticolo sarcoplasmatico, nelle fibre muscolari scheletriche a contrazione rapida di tipo 2. Tale proteina è una Ca-ATPasi muscolare e come tale ha il compito di catalizzare il trasferimento del calcio contro gradiente elettrochimico, sfruttando l'energia libera generatisi dall'idrolisi dell'ATP, dal sarcoplasma verso il lume del reticolo sarcoplasmatico.

La proteina SERCA1 agisce come pompa e ha la funzione di riportare il calcio ai suoi livelli basali presenti prima della contrazione muscolare, essa tende a variare la sua attività nel corso dell'intero processo contrattile. SERCA1 entra in gioco nella fase di rilassamento del muscolo, essa infatti viene attivata da concentrazioni elevate di calcio all'interno del sarcoplasma che si riscontrano durante l'apice dell'atto di contrazione. La pompa permette il re-uptake del Calcio verso il reticolo sarcoplasmatico andando a ridurre la concentrazione dello ione fino al raggiungimento dei livelli presenti prima della contrazione.

Le mutazioni a carico del gene ATP2A1 hanno come effetto una diminuzione dell'espressione della proteina SERCA che porta come conseguenza ad una riduzione e rallentamento nella capacità di Re-uptake del Calcio.

L'espressione ridotta della proteina SERCA è dovuta alla presenza di mutazioni che portano a delle sostituzioni amminoacidiche nella struttura primaria della proteina determinando una modificazione della struttura tridimensionale. La proteina, di conseguenza, non riesce ad assumere la sua corretta conformazione spaziale e viene per questo riconosciuta dal complesso ubiquitina-ligasi che la poliubiquitina. Questo comporta l'invio della proteina mutata al proteasoma per la degradazione.

Questo fenomeno porta ad una minor presenza della proteina SERCA1 nel reticolo sarcoplasmatico rispetto alla condizione fisiologica, che provoca

una scorretta ricaptazione del calcio da parte del reticolo. Il tempo richiesto per riportare il calcio ai suoi livelli basali nel lume del reticolo sarcoplasmatico è, di conseguenza, significativamente più lungo. Perciò, la fase di rilassamento del ciclo contrattile sarà molto più prolungata, causando così un prolungato stato di contrattura delle fibre muscolari che si manifesterà a sua volta con un irrigidimento muscolare esteso.

Degli studi condotti nel 2014 hanno confermato che le mutazioni a carico della proteina SERCA non inficiavano la capacità intrinseca della pompa di trasportare il calcio, ma influivano invece sul numero di proteine esposte nella membrana del reticolo sarcoplasmatico. Si è quindi capito che, ad avere un ruolo centrale nella riduzione dei livelli di espressione di proteina SERCA nei muscoli dei bovini affetti da Pseudomiopia, è il complesso Ubiquitina-Proteasoma. In studi successivi si è poi verificato che utilizzando un inibitore del Proteasoma era possibile ristabilire una densità di proteina SERCA1 sufficiente sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico, ripristinando la corretta capacità delle fibre muscolari di riassorbire il calcio. Infatti, in presenza di questo inibitore le proteine mutate pur trovandosi poliubiquitinate, non venivano degradate e potevano quindi essere indirizzate verso le membrane del RS esplicando il medesimo ruolo della proteina Wild-type.

Il fatto che le caratteristiche funzionali della proteina non venissero alterate in seguito alle mutazioni ha portato allo sviluppo di un farmaco in grado di offrire una terapia efficace contro la Miopia di Brody. Si sono infatti individuati dei correttori del CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) progettati inizialmente come farmaci per la fibrosi cistica, il cui compito consiste nel correggere la conformazione mutata della proteina CFTR in modo da renderla irrecognoscibile per il complesso ubiquitina-ligasi. Si è quindi pensato di utilizzare i correttori CFTR anche nel caso della miopia di Brody recuperando la SERCA1 mutata e andando in questo modo a ripristinare i livelli fisiologici di espressione della proteina.

# WESTERN BLOT APPLICATO ALLA PSEUDOMIOTONIA

Per dimostrare quanto la tecnica del western blot risulti importante in tutti gli studi che comportano la presenza di proteine useremo come esempio uno studio fatto nel 2022 nell'università di Padova. Questo studio è stato effettuato con lo scopo di verificare quale delle due mutazioni riscontrate nel gene ATP2A1 nella razza Romagnola, che portano alla sostituzione dell'amminoacido glicina in valina in posizione 211 e 286 (G211V e G286V) fosse responsabile della riduzione dell'espressione della proteina SERCA1 nelle fibre muscolari scheletriche estratte da muscoli semimembranosi di bovini di razza Romagnola affetti da PMT.

Lo studio si è posto come obiettivo quello di verificare se entrambe le mutazioni in ugual modo o solo una delle due, causassero la riduzione dell'espressione della proteina SERCA1 e se successivamente al trattamento con inibitore del proteasoma, MG132 su cellule, si otteneva un aumento nei livelli di espressione di SERCA1 mutata a livello del reticolo endoplasmatico.

Per eseguire il western blot il primo passaggio necessario è stato fare una trasfezione di cellule eterologhe (HeLa ed HEK293) con un plasmide di espressione che portava l'informazione per la proteina SERCA WT e mutata o con la mutazione G211V e G286V. Le stesse cellule, dopo trasfezione col plasmide, sono state incubate con la molecola MG132 per bloccare l'eventuale effetto del proteasoma sulla proteina SERCA1. Da queste cellule dopo trasfezione si è poi ottenuto un omogenato, con l'utilizzo in maniera delicata di un pestello, dal quale si è andati ad isolare la "frazione di proteine totali" nella quale si è studiato l'espressione della proteina SERCA mutata.

Successivamente si è andati a calcolare la concentrazione proteica delle frazioni di proteina totale tramite il metodo dell'acido bicinoninico BCA. Determinata la concentrazione proteica dei campioni di interesse si è potuti passare all'utilizzo del gel elettroforesi (SDS-PAGE) per separare le proteine presenti all'interno della soluzione sulla base del loro peso molecolare. Nel caso particolare di questo studio si è utilizzato un gel di poliacrilamide usando un sistema a tampone discontinuo formato dallo stacking gel e dal resolving gel. Una volta caricati i campioni e fatta eseguire la corsa si è potuti passare alla fase del Western Blot nella quale si è attuato il trasferimento delle bande, dal gel ad una membrana di nitrocellulosa. Terminato il trasferimento è stato effettuato un controllo tramite l'utilizzo di un colorante rosso "Ponceau Red" che ha permesso di verificare che il

trasferimento fosse avvenuto correttamente, colorando di rosso le bande contenenti macromolecole proteiche. Si sono poi eseguiti diversi lavaggi prima di passare alla fase di saturazione con BSA.

In questo studio si è deciso di utilizzare un western blot indiretto sfruttando la presenza di due anticorpi. L'anticorpo primario è stato aggiunto subito dopo il trattamento con BSA e si è legato esclusivamente alle molecole di SERCA1. L'anticorpo primario, infatti, è un "anti-SERCA1" in grado di riconoscere specificatamente SERCA1. La membrana è stata successivamente incubata overnight a 4° per fare in modo che le molecole di anticorpo primario si legassero al rispettivo antigene.

Infine, dopo ripetuti lavaggi con TTBS si è proseguito aggiungendo l'anticorpo secondario in grado di legarsi specificatamente con il primario. L'anticorpo secondario utilizzato in questo caso risultava coniugato all'enzima HRP in grado di catalizzare, in presenza di acqua ossigenata, delle reazioni di ossidazione colorimetriche a carico di uno specifico substrato DAB. La reazione di ossidazione ha portato alla formazione di un intermedio ossidato, insolubile, color marrone visibile ad occhio nudo.

## CONCLUSIONI

I risultati dimostrano che la ridotta quantità di SERCA1 è una conseguenza della mutazione G211V, mentre la mutazione G286V è benigna, e che il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) è coinvolto nella riduzione dell'espressione della SERCA1 mutata.

Dopo aver bloccato il proteasoma con un inibitore dello stesso, è stato riscontrato che il mutante G211V si accumula nelle cellule a livelli paragonabili a quelli di SERCA WT. La presenza di una banda caratterizzata da un peso molecolare poco superiore ai 100kDa, ricordando che la proteina SERCA ha un peso pari a 110kDA si può dedurre con assoluta sicurezza che quella banda corrisponda alla nostra proteina di interesse. La conclusione è stata pertanto che le mutazioni G211/286V presumibilmente si originano in una proteina SERCA1 con difetti di ripiegamento, riconosciuta e deviata verso la degradazione dell'UPS, anche se ancora cataliticamente funzionale, e che il ruolo principale è svolto dalla mutazione G211V. L'inibizione del proteasoma ha rivelato che il coinvolgimento del sistema ubiquitina-proteasoma nella degradazione della proteina mutante G211V, suggerendo che il misfolding della proteina porta al suo riconoscimento e successiva eliminazione da parte del sistema di controllo del proteasoma.

E' quindi possibile ipotizzare che il recupero della SERCA1 mutata, se funzionante, nella membrana del reticolo sarcoplasmatico possa ristabilire la concentrazione citosolica a riposo del  $Ca^{2+}$  e prevenire la comparsa di segni patologici, aprendo la strada a un possibile approccio terapeutico contro la malattia di Brody.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sule, R., Riversa, G., & Gomes, A. V. (2023). Western Blotting (immunoblotting): History, Theory, Uses, Protocol and Problems. *BioTechniques*, 73(3), 99-114.  
<https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>
2. Immagine 1 → Sule, R., Riversa, G., & Gomes, A. V. (2023). Western Blotting (immunoblotting): History, Theory, Uses, Protocol and Problems. *BioTechniques*, 73(3), 99-114.  
<https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>
3. Immagine 2,3 →  
<file:///C:/Users/seref/Downloads/Western%20Blot.pdf>
4. Anupama Sapkota, Sagat Aryal <<Western Blot: Principle, Steps, Results, Applications >> *Microbe Notes*, 28 maggio 2023  
<https://microbenotes.com/western-blot/>
5. Cord Drögemüller, Michaela Drögemüller, Tosso Leeb, Francesco Mascarello, Stefania Testoni, Marco Rossi, Arcangelo Gentile, Ernesto Damiani, Roberta Sacchetto. <<Identification of a missense mutation in the bovine ATP2A1 gene in congenital pseudomyotonia of Chianina cattle: An animal model of human Brody disease >> *Genomics* 92, fasc.6 (dicembre 2008): 474-77
6. Francesco Centorrino <<Western Blotting: una competizione fino all'ultima banda >> *Microbiologia Italia* , 2 gennaio 2023
7. Roberta Sacchetto, Eylem Emek Akyurek, Giovanni Pastrello. <<Analisi dei livelli di espressione di proteina SERCA1 mutata in fibre muscolari scheletriche di bovini affetti da Pseudomyotonia trattate con i correttori del CFTR>> 20222/2023
8. Akyürek EE, Busato F, Murgiano L, Bianchini E, Carotti M, Sandonà D, Drögemüller C, Gentile A, Sacchetto R. Differential Analysis of Gly211Val and Gly286Val Mutations Affecting Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA1) in Congenital Pseudomyotonia Romagnola Cattle. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 15;23(20):12364. doi: 10.3390/ijms232012364. PMID: 36293223; PMCID: PMC9604440.

