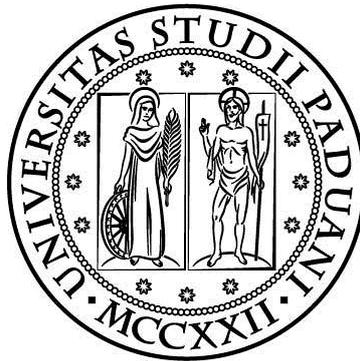


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

TESI DI LAUREA IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

**PRODUZIONE E
CARATTERIZZAZIONE DELLE
LIPOSSIGENASI RICOMBINANTI
LOX2 E LOX7 DA VITIS VINIFERA**

RELATORE: PROF. VINCENZO DE FILIPPIS

CORRELATORI: DR.SSA STEFANIA PILATI, PROF. GRAZIANO GUELLA

LAUREANDO: GIORGIO DE SIMONE

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

TABELLE E ABBREVIAZIONI.....	V
a. Tabella delle Abbreviazioni	V
b. Tabella degli Aminoacidi	VI
RIASSUNTO.....	XI
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Lipossigenasi.....	1
1.2 La via metabolica della Lipossigenasi umana.....	7
1.3 Via metabolica della Lipossigenasi vegetale.....	9
1.4 Inibitori delle lipossigenasi	11
2. OBIETTIVO	15
3. MATERIALI E METODI.....	17
3.1 Materiali	17
3.2 Lipossigenasi 2 – Parametri	21
3.2.1 Il Dominio PLAT di Lox2	24
3.3 Lipossigenasi 7 – Parametri	26
3.3.1 Il dominio PLAT di Lox7	29
3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
3.5 Elettroforesi.....	31
3.5.1 Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE).....	33
3.6 Elettroporazione	35
3.7 Spettrofotometria.....	35
3.7.1 Nanodrop	38

3.8	Sonicazione	39
3.8.1	Spettrofotometro con Piastre a Pozzetti	40
3.9	Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)	41
3.10	High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (HPLC – MS)	45
3.11	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)	46
4.	RISULTATI	49
4.1	TECNICHE PER LA PRODUZIONE DI COLONIE DI <i>ESCHERICHIA COLI</i> MODIFICATE	49
4.1.1	Utilizzo della PCR e Purificazione	49
4.1.2	Digestione e Ligazione.....	54
4.1.3	Ottimizzazione delle procedure atte a produrre cellule competenti per la trasformazione batterica.....	59
4.1.4	Messa a punto di procedure per la crescita e il controllo delle colonie trasformate	61
4.2	ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLE LOX	65
4.2.1	Tecniche di proliferazione batterica e induzione dell'espressione proteica..	65
4.2.2	Isolamento del Pellet e Lisi Batterica.....	68
4.2.3	Purificazione delle Lox2 e Lox7 mediante Cromatografia IMAC	69
4.3	ANALISI DELL'ATTIVITÀ CATALITICA	82
4.3.1	Determinazione del pH ottimale.....	82
4.3.2	Determinazione dell'Efficienza Catalitica di Lox2 e Lox7	85
4.3.3	Determinazione dei Prodotti di Reazione e della Catalisi nel tempo via HPLC - MS - UV	92
4.3.4	Identificazione e Analisi Cinetica della generazione dei prodotti di Reazione con Tecnica NMR.....	98
5.	DISCUSSIONE	99
	BIBLIOGRAFIA	103

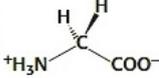
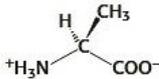
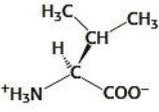
TABELLE E ABBREVIAZIONI

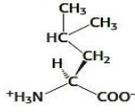
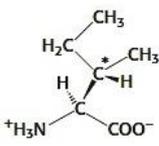
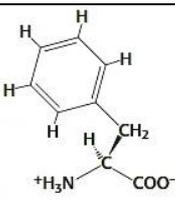
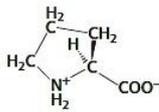
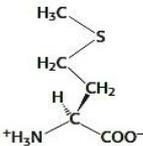
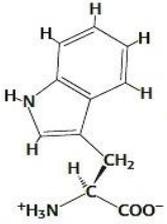
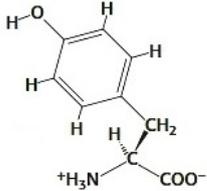
a. Tabella delle Abbreviazioni

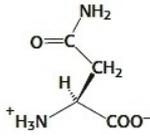
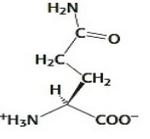
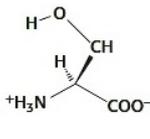
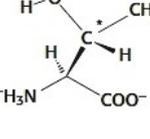
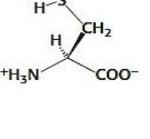
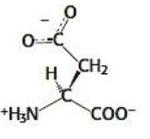
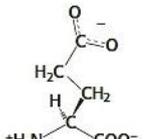
AA	Aminoacidi
Amp	Ampicillina
Bp	Coppie di Basi
BSA	Bovine Serum Albumine
CM	Cloramfenicolo
COX	Ciclossigenasi
DHA	Acido deicosanoico
DNA	Acido Desossiribonucleico
DTT	Ditiotreitolo
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
EPA	Acido eicosapentaenoico
EtBr	Etidio bromuro
EtOH	Etanolo
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HPLC-MS	High performance liquid chromatography – mass spectrum
HPETE	Arachidonic Acid 5-Hydroxyperoxyde
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside
Kan	Kanamicina
LA	Acido linoleico
LB	Luria Bertani (Terreno solido)
LDS	Litio dodecil solfato
LNA	Acido linolenico
LOX	Lipossigenasi
LT	Leucotrieni
MM	Massa Molecolare
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD	Optical density

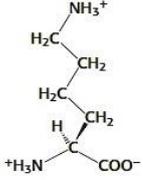
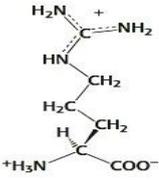
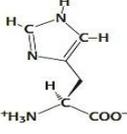
PCR	Polymerase chain reaction
pl	Punto isoelettrico
PLAT	Policistin-1, Lipossigenasi, Alfa-tossina
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid
PVDF	Polivinilidenfluoruro
SDS-PAGE	Sodio Dodecil Solfato-poliacrilamide gel elettroforesi
TAE	Tris acetato EDTA
TBS	Tris buffer saline
TNF	Tumor necrosis factor
UV-VIS	Ultra violetto – Visibile
VSP	Vegetative storage protein

b. Tabella degli Aminoacidi

Aminoacido	Sigla 3 lettere	Sigla 1 lettera	Struttura
Glicina	Gly	G	
Alanina	Ala	A	
Valina	Val	V	

Leucina	Leu	L	
Isoleucina	Ile	I	
Fenilalanina	Phe	F	
Prolina	Pro	P	
Metionina	Met	M	
Triptofano	Trp	W	
Tirosina	Tyr	Y	

Asparagina	Asn	N	
Glutammina	Gln	Q	
Serina	Ser	S	
Treonina	Thr	T	
Cisteina	Cys	C	
Aspartato	Asp	D	
Glutammato	Glu	E	

Lisina	Lys	K	
Arginina	Arg	R	
Istidina	His	H	

RIASSUNTO

Questo elaborato di tesi ha come obiettivo la sintesi, la purificazione e lo studio dell'attività catalitica di due proteine, Lox2 e Lox7. La famiglia di Lipossigenasi interviene in processi di maturazione, segnalazione e apoptosi nella specie *Vitis vinifera* e ha azione perossidante su substrati come acido linoleico e acido linolenico, nonché acido jasmonico, largamente diffuso nel mondo vegetale. All'inizio del percorso sperimentale la sequenza amminoacidica delle due proteine era già nota e la tecnica di produzione era già teoricamente messa a punto; si tratta di utilizzare dei primer a DNA già ottimizzati da un laboratorio esterno per inserirli all'interno di un plasmide (vettore) di *Escherichia coli*. Attraverso la tecnica PCR si è proceduto alla sintesi esponenziale del codice genetico plasmidico modificato che è stato successivamente inserito all'interno di una piccola colonia batterica. Una volta verificata l'effettiva modifica del codice genetico attraverso tecniche come la elettroforesi, si è proceduto alla crescita delle colonie fino a che la duplicazione fosse ancora in una fase esponenziale, per poi indurre molto velocemente la sintesi proteica attraverso lo sblocco dell'*operone lac*. L'idea è stata quella di stressare il batterio in modo da imporgli una rapida sintesi proteica in cui venisse tradotto anche il codice genetico innestato. Una volta saturata la soluzione batterica e proteica si è dunque proceduto con le tecniche di purificazione a partire dalla Sonicazione fino alla IMAC in modo da ottenere un prodotto il più pulito possibile che consentisse il proseguimento dello studio.

Ottenuto il materiale proteico, si sono eseguiti saggi di attività a pH e substrati diversi in modo da identificare quali fossero le condizioni di reazione preferite dalle proteine e quale fosse la loro efficienza catalitica. A sostegno di questi studi sono stati utilizzati strumenti come gli spettrofotometri, lo HPLC-MS e l'NMR.

1. INTRODUZIONE

1.1 Lipossigenasi

Le lipossigenasi sono diossigenasi non-eme che contengono ferro, o manganese nel loro centro catalitico, costituite da una singola catena polipeptidica con una massa molecolare (MM) di 94-104 kD. Presentano un corto dominio N-terminale con struttura β -barrel detta dominio PLAT (Brash, 1999) che è simile in sequenza, grandezza e struttura al dominio C-terminale di alcune lipasi umane (Boyle, 2005).

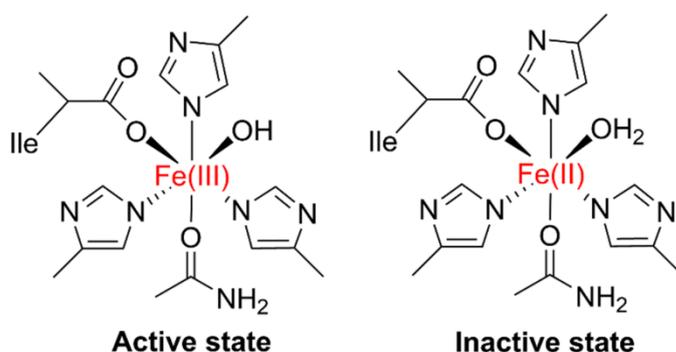


Figura 1: rappresentazione del sito attivo delle lipossigenasi. Il ferro (III), ossidato, è in forma attiva e si riduce a ferro (II) una volta espletata la sua funzione sul substrato. (Singh et al., 2022)

Sono proteine presenti nella maggior parte degli eucarioti e in alcuni procarioti; nel genoma degli *Archea* sono state riscontrate sequenze genetiche compatibili con le LOX, anche se non è confermata l'effettiva attività in questo dominio (Horn et al., 2015).

Le piante contengono numerosi tipi di lipossigenasi citosoliche e cloroplastiche; nello specifico esiste uno studio su Lox13 (Springer et al., 2016) che è una proteina coinvolta nel processo di senescenza della foglia; essa perossida i lipidi di membrana del cloroplasto degradandola e liberando il contenuto dell'organulo. Nel mondo vegetale le Lox sono inoltre coinvolte nella trasformazione di acidi grassi polinsaturi e lipidi per l'iniziazione della produzione

di segnalatori cellulari e di ossilipine che sono modulatori locali e sistemici di difesa (Vicente et al., 2012).

La catalisi enzimatica riguarda l'ossidazione regio e stereo specifica di acidi grassi polinsaturi (dall'inglese PUFA, polyunsaturated fatty acids) in PUFA-idroperossidi-1,3-pentadieni coniugati che possono poi essere processati enzimaticamente da monoossigenasi tipiche e atipiche dei citocromi P450 (Wasternack & Feussner, 2018). In base al carbonio della catena alifatica coinvolto nell'ossidazione, si distinguono due macro-categorie di LOX, le 9-LOX che ossidano il carbonio 9 di acido linoleico/linolenico, e le 13-LOX; sono inoltre suddivise in base al loro pH ottimale, alcalino, o neutro e in base alla loro localizzazione subcellulare, plastidica, o citosolica (Andreou & Feussner, 2009; Liavonchanka & Feussner, 2006).

Le diverse isoforme di LOX, evolvendosi, hanno acquisito funzioni che possono essere ricondotte a quattro macro-categorie (Brash, 1999):

- La sintesi di 9 e 13-HOTrE e HODE (due PUFAs) nelle piante rappresenta il punto d'inizio di una cascata enzimatica altamente ramificata chiamata la via delle ossilipine, che genera una grande varietà di composti chimici eterogenei (Farmer & Mueller, 2013; Mosblech et al., 2009) coinvolti in processi segnalatori in diversi contesti, come alcol volatili e aldeidi, che svolgono ruoli ecologici nella comunicazione fra piante, insetti e animali; tali composti vengono anche detti GLVs (dall'inglese: Green Leaf Volatiles). Altre molecole derivanti da questa prima categoria sono i fitoprostani (Thoma et al., 2003), ciclopentanoni (Christensen et al., 2015) acido jasmonico e molecole più piccole come l'acido azelaico e pimelico (Zoeller et al., 2012), che sono fitoalessine coinvolte nella difesa delle piante.
- Le LOX svolgono una funzione metabolica relativa alla movimentazione dei grassi, come riscontrato nei semi di soia dove l'ossidazione catalizzata da LOX di acidi grassi insaturi esterificati in trigliceridi è implicata nel processo di germinazione.
- È nota la funzione strutturale delle LOX nell'evoluzione della cellula: una 13-LOX di orzo è coinvolta nella formazione di pori nella

membrana del cloroplasto interno per la riallocazione di carbonio e azoto durante l'invecchiamento della foglia (Springer et al., 2016), mentre una 15-LOX di reticolocito (eritrocita non maturo) di coniglio è coinvolta nella degradazione controllata degli organelli durante la maturazione dell'eritrocita (Grüllich et al., 2001; Van Leyen et al., 1998). Entrambe le LOX analizzate nei precedenti studi presentano una marcata azione nei confronti di lipidi di membrana esterificati, significativa associazione alle membrane e formazione di dimeri, o oligomeri in presenza di essi. Un recente studio su cetriolo ha evidenziato un maggior disordine nella morfogenesi dei cloroplasti e nell'organizzazione dei tilacoidi, fino alla comparsa di mutazioni spontanee in presenza di grappoli (cluster) di geni cloroplastici di LOX (Ding et al., 2019).

- La perossidazione di lipidi ad opera di LOX sembra correlata all'accumulo di ossigeno singoletto (1O_2): tale osservazione è stata effettuata inizialmente in vitro (Kanofsky & Axelrod, 1986), e successivamente la diretta connessione fra LOX2 cloroplastiche e l'accumulo di ossigeno singoletto è stata osservata in *Arabidopsis* a seguito di ferite alla pianta (Prasad et al., 2020). La possibilità di un'origine enzimatica controllata di O_2 , potrebbe rappresentare un nuovo metodo di comunicazione fra plastidi e nucleo.

Negli esseri umani le cascate enzimatiche che coinvolgono le LOX portano a derivati dell'acido docosaesaenoico (DHA) e dell'acido arachidonico (ARA) quali neuroprostani, leucotrieni e prostaglandine di ciclopentanone e ciclopentenone coinvolti in crescita, segnalazione e difesa (Funk, 2001; Musiek et al., 2008). Processi fisiologici simili si ritrovano anche nei funghi e nelle piante e coinvolgono PUFA ossidati (ossilipine) come l'acido 12-osso-fitodienoico (12-OPDA, un precursore dell'acido jasmonico), metil jasmonato (MJ), acido traumatico (TA), o GLV (Chen et al., 2015; Djian et al., 2019; Mukhtarova et al., 2020).

Eseguendo analisi filogenetiche e comparazioni strutturali ci si è resi conto che i geni LOX sono estremamente antichi e che hanno subito diverse

trasformazioni evolutive, credibilmente partendo come enzimi agenti su lipidi di membrana, per poi specializzarsi nella catalisi di acidi grassi polinsaturi liberi (Newie, Andreou, et al., 2016).

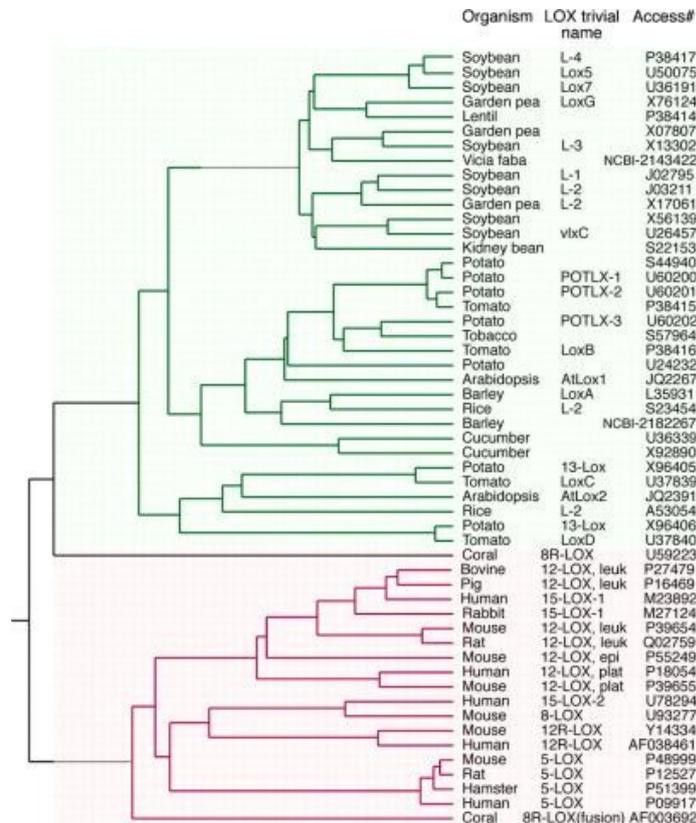


Figura 2: albero filogenetico delle lipossigenasi. I rappresentanti delle LOX di animali e piante sono stati analizzati utilizzando MegAlign (DNASTAR, Inc.). (Brash, 1999).

Si assume che i cianobatteri e le alghe siano stati i primi organismi viventi ad utilizzare ossigeno e PUFA come substrati per le LOX e che la diversificazione delle ossilipine sia stata modulata dall'evoluzione di enzimi catalitici e di recettori delle ossilipine stesse (Horn et al., 2015; Monte et al., 2018). Tali specie solitamente esprimono 9-lipossigenasi (9-LOX) e 13-lipossigenasi (13-LOX), che consistono del centro catalitico delle LOX associato a un dominio PLAT (policistina-1, lipossigenasi, alfa-tossina) che, come detto all'inizio, è una struttura β -barrel N-terminale; purtroppo il ruolo del dominio PLAT e la sua evoluzione rimangono pressoché oscure, tant'è che recenti studi hanno confermato che LOX procariotiche che mancano di tale dominio risultano comunque interamente funzionanti (Horn et al., 2015), come lo sono alcune proteine eucariotiche a singolo dominio PLAT che dimostrano reazioni associate

a stress simili a quelle delle LOX (Savadogo et al., 2021). L'omologia sequenziale dei PLAT-domain è più alta fra isoforme omologhe di diverse specie rispetto che fra differenti LOX nel medesimo organismo; in generale, tale dominio è poco conservato ed è coinvolto in interazioni proteina-lipidi e proteina-proteina. D'altro canto, il dominio catalitico mostra un alto grado di conservazione strutturale nei residui che coordinano il ferro del sito catalitico (Newie, Kasanmascheff, et al., 2016; Springer et al., 2016). La cavità interna delle lipossigenasi è essenzialmente composta di tre ramificazioni (Neau et al., 2014): una tasca estesa, cavità con sagoma a U (a stivale) con una profondità definita; un canale per l'ossigeno e il canale d'entrata del substrato. La profondità della cavità a U, e l'orientazione del substrato si combinano per conferire regio e stereospecificità.

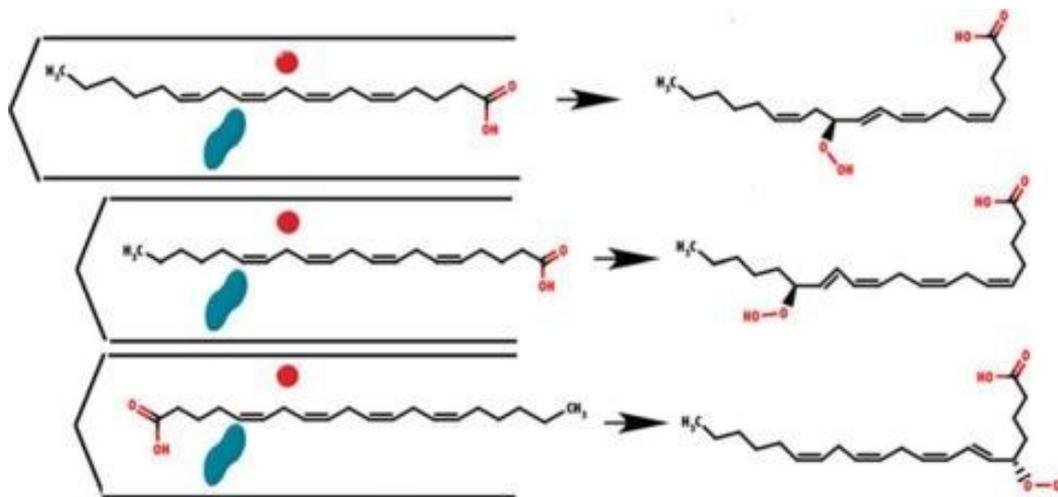


Figura 3: schema del modello attuale di specificità del prodotto per le lipossigenasi. Il substrato deve allinearsi fra il ferro catalitico (la sfera rossa) e il canale O_2 (sagoma blu). Differenze nella profondità della cavità a U e nell'orientazione del substrato determinano l'acido idroperossieicosatetraenoico generato. (Neau et al., 2014).

La reazione lipossigenasica inizia con il distacco di un atomo di idrogeno dal carbonio sp^2 del pentadiene attraverso una molecola di acqua che va a riempire la sfera di coordinazione metallica. Il radicale formatosi si delocalizza lungo la catena polipeptidica e l'ossidazione avviene sul carbonio di attacco; l'eliminazione di idrogeno e l'aggiunta di ossigeno avvengono su lati opposti.

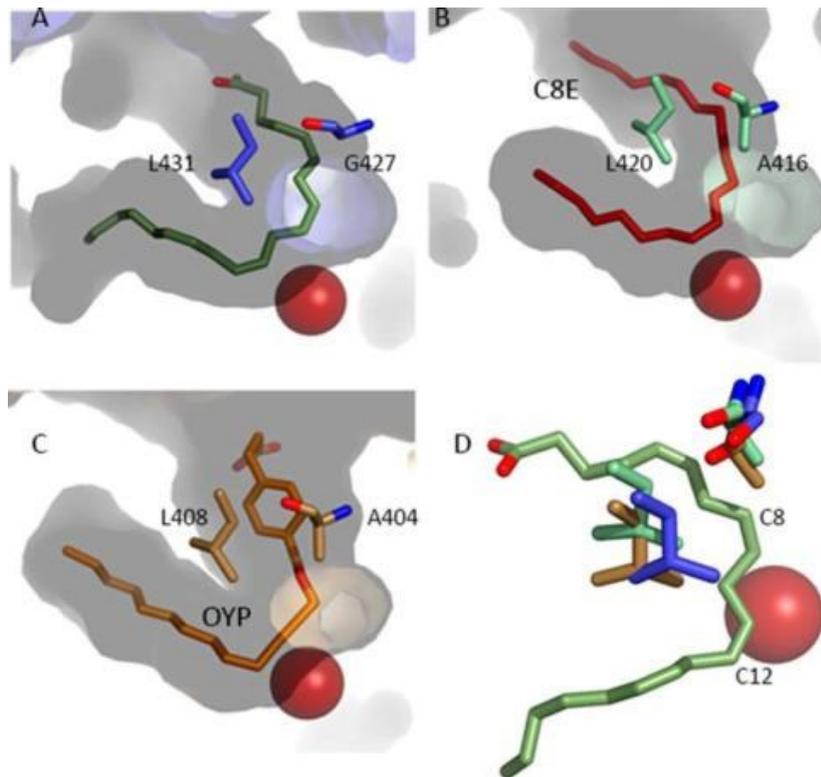


Figura 4: in A è mostrato il sito attivo di 8-R-LOX, in B quello di 15-LOX-2 e in C di 12-LOX. Nella figura viene spiegata la relazione anterofacciale (su lati opposti) tra Fe^{2+} e il canale O_2 . A) Nelle 8R-LOX la direzione del canale è fissata da Gly-427 e dall'orientazione dell'aminoacido di copertura Leu-431. B e C) mostrano canali simili nelle specie 15-LOX-2 e 12-LOX. Da notare la presenza di un'alanina che spinge l'apertura tubulare più a fondo nel corpo dell'enzima. D) Dettaglio della relazione di scambio Gly/Ala e la Leu-431. (Neau et al., 2014)

Anche il dominio PLAT può avere un'influenza sulla regio-specificità della reazione, come ad esempio avviene nella *Cyanotheca* CspLOX1, dove la sua α -elica, o l'allungato β -barrel mediano l'interazione con i liposomi orientando il canale a U direttamente verso i lipidi di membrana (Newie, Andreou, et al., 2016). Altro esempio interessante è quello della *Pseudomonas aeruginosa* Pa-LOX che, pur non disponendo di un dominio PLAT, ha un'inserzione di un centinaio di residui che corrispondono a due eliche antiparallele che formano un coperchio sul canale di legame al ferro (Garreta et al., 2013).

Nella specie *Vitis vinifera* è stata osservata l'azione di una 13-Lox (LoxA), cloroplastica, indotta dal rilascio di acido abscissico durante l'inizio della maturazione dell'acino, responsabile dell'aumento della perossidazione dei galattolipidi (Negri et al., 2011; Pilati et al., 2014, 2017). La degradazione

dell'apparato fotosintetico che si verifica all'inizio della maturazione deve essere estremamente coordinata fra plastidi e nucleo per evitare accumuli di specie radicaliche e perossido di diidrogeno (H₂O₂).

1.2 La via metabolica della Lipossigenasi umana

Le lipossigenasi umane sono gli enzimi che partecipano al metabolismo degli acidi grassi polinsaturi (PUFAs), come acido linoleico (18:2, ω-6) e linolenico (18:3, ω-3) e, soprattutto, acido arachidonico (20:4, ω-6), catalizzandone la perossidazione a tutta una serie di eicosanoidi, i quali fungono da secondi segnalatori con forte impatto sull'omeostasi (redox) umana (Kuhn et al., 2015; Kumari et al., 2018). Tali enzimi sono coinvolti in tutta una serie di affezioni che attivano risposta infiammatoria e partecipano in patologie cardiologiche, renali, neurodegenerative, sindromi metaboliche e partecipano nelle catalisi utilizzate da alcune cellule cancerose. Nell'essere umano e nei mammiferi più in generale, l'attività lipossigenasica è correlata all'azione ciclossigenasica (ad opera di Cox).

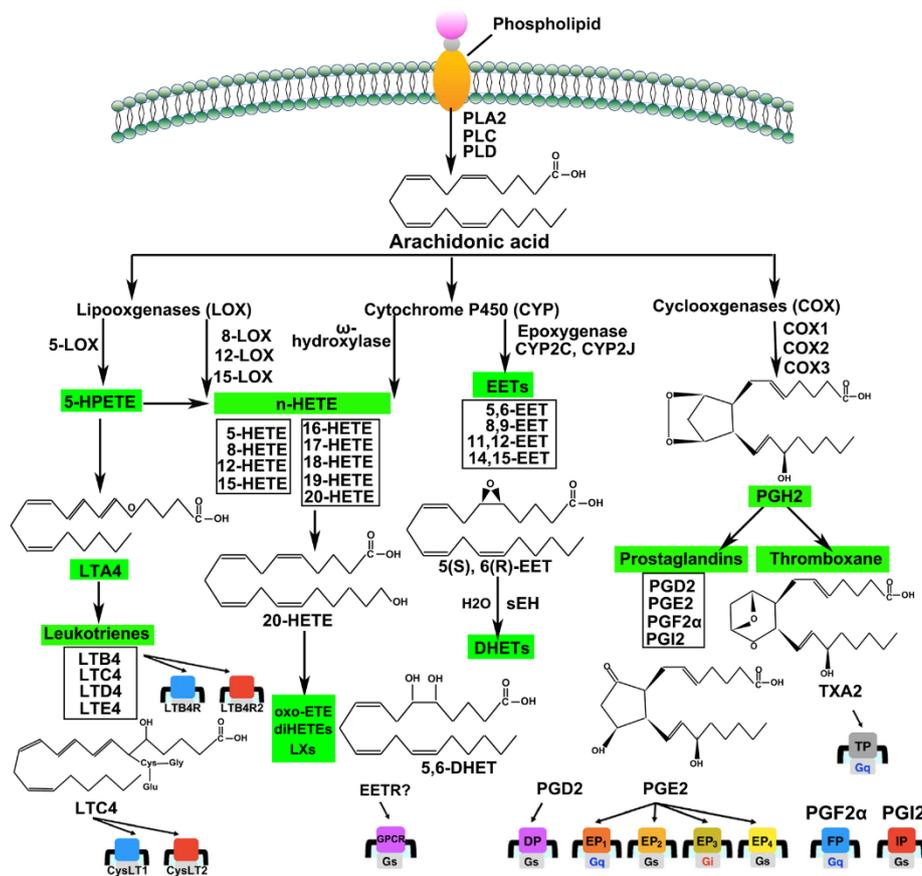


Figura 5: via metabolica dell'acido arachidonico nell'uomo. In evidenza i tre principali enzimi coinvolti in questo tipo di reazioni: Lipossigenasi, Citocromo P450 e Ciclossigenasi. (Wang et al., 2021)

Le molecole così sintetizzate prendono il nome di ossilipine, le quali sono resolvine, metaboliti bioattivi dei lipidi. La loro produzione è il risultato di un danno tissutale (cutaneo, osseo, nervoso) (Jiang et al., 2022; Li et al., 2020; Liu et al., 2022) che innesca un processo di ripristino dell'omeostasi attraverso una attivazione cellulare che libera gli acidi grassi dalla membrana plasmatica verso l'ambiente citosolico e li attiva il metabolismo secondo una delle tre vie menzionate. Gli effetti biologici delle ossilipine libere vengono mediati attraverso interazione con recettori, o effettori intracellulari, oppure possono essere nuovamente esterificate in lipidi. Le ossilipine più studiate in ambito umano sono eicosanoidi derivanti dall'acido arachidonico, mentre altri tipi di ossilipine sono octadecanoidi, derivanti da acido linoleico e acido α – lipoico, oppure eicosanoidi da acido eicosapentanoico (EPA), o acido docosaesaenoico (DHA) (Chavan-Gautam et al., 2018; Rey et al., 2022).

Le lipossigenasi umane sono le 5, 8, 12 e 15-Lox. In particolare, la 5-lipossigenasi, presente nei globuli bianchi, catalizza la conversione di acido arachidonico ad acido 5-idroperossi-eicosatetraenoico (5-HPETE), che poi è convertito a leucotriene-A₄, precursore dei leucotrieni della serie A₄.

1.3 Via metabolica della Lipossigenasi vegetale

Il comportamento delle lipossigenasi nel mondo vegetale è del tutto simile a quello animale, considerando che in questo caso i substrati preferiti saranno acido linoleico (LA, 18:2) e acido α -linolenico (LNA, 18:3). Qui si conoscono sostanzialmente due famiglie di lipossigenasi, le 9-Lox e le 13-Lox.

Le lipossigenasi delle piante ossidano i loro substrati come precursori di inibitori di micotossine, di segnalatori di danno tissutale o patogenico, oppure per indurre apoptosi in cellule non più correttamente funzionanti (Cramer et al., 2014; Springer et al., 2016; Vicente et al., 2012); altri tipi di Lox sembrano essere coinvolte in meccanismi germinativi (semi) e di crescita. Uno studio (Siedow, 1991) dell'Università Nazionale Messicana ha evidenziato tutta una serie di trasformazioni dell'acido linolenico catalizzate da Lox.

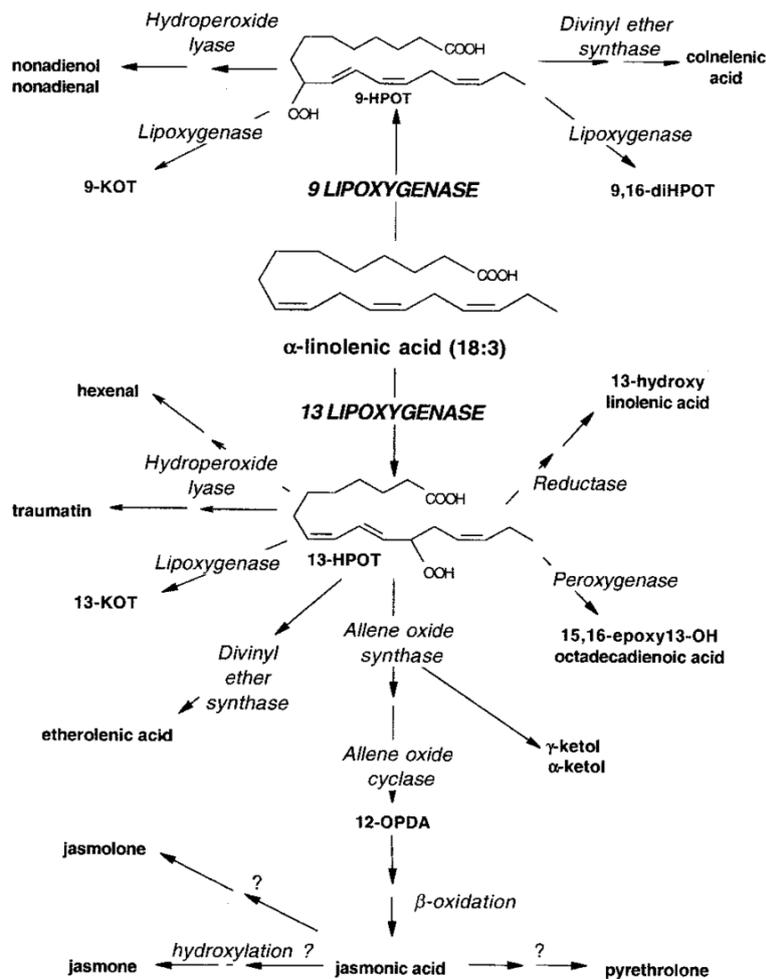


Figura 6: cascata metabolica utilizzando acido α -linolenico come substrato ad opera di 9-Lox e 13-Lox. (Porta & Rocha-Sosa, 2002)

Nelle piante il ruolo delle ossilipine sembra essere quello di protettori enzimatici, che poi possono essere assunte con la dieta dall'essere umano, il cui metabolismo le incorporerà in chilomicroni (Rey et al., 2022). In vivo le ossilipine derivate dall'acido linoleico sono coinvolte nella cascata infiammatoria, nella percezione del dolore e nella barriera protettiva della pelle (Alsalem et al., 2011; Chiba et al., 2016; Kuksis, 2010). La loro formazione, nelle piante, può essere il risultato di autossidazione, oppure di attivazione enzimatica; è stato osservato che 9-Lox e 13-Lox, in base alla loro specificità posizionale, sono in grado di inserire ossigeno molecolare nei PUFAs (LNA e LA) producendo gli idroperossidi acido octadienoico (HPOD) e acido octadecatrienoico (HPOT) che sono substrati di diversi enzimi all'interno della cascata (Göbel et al., 2001).

È stato anche evidenziato, in *Arabidopsis*, come in conseguenza a danno tissutale non vi sia il classico aumento dei livelli di acido jasmonico in caso di carenza di 13-LOX e sono anche deficienti nell'accumulare trascritti di Vegetative Storage Protein (VSP) indotti da ferita (Bell et al., 1995). Viene osservata anche aumentata suscettibilità all'attacco degli insetti in patate transgeniche con livelli diminuiti di 13-LOX (Royo et al., 1999) e nel genere *Arabidopsis* a cui non venissero forniti adeguate quantità di acido Linolenico (Mcconn et al., 1997).

Oltre all'aumentata suscettibilità agli attacchi degli insetti e all'alterata risposta alle ferite, si è osservato che diminuiti livelli di acido linolenico inficiano le difese della pianta nei confronti di patogeni delle radici come *Pythium mastophorum* (Vijayan et al., 1998) e impediscono ai mutanti di *Arabidopsis*, insensibili, o anormalmente sensibili allo jasmonato, di proteggersi correttamente dai patogeni fungini (Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1998).

1.4 Inibitori delle lipossigenasi

Esistono tutta una serie di ricerche di farmaci ad uso umano che siano in grado di inibire l'azione infiammatoria delle Lipossigenasi legata alla cascata dell'acido arachidonico, ma finora solo due di essi sono commercializzati: Zileutone e Masoporocol.

Zileutone è un farmaco inibitore della arachidonato 5 – lipossigenasi e quindi inibisce la formazione di leucotrieni, molecole deputate alla funzione di aumentatori della migrazione dei neutrofilo e degli eosinofili, all'aggregazione di neutrofilo e monociti, adesione dei leucociti, aumento di permeabilità capillare e contrazione del tessuto muscolare liscio, tutti effetti associati a edema, broncocostrizione e secrezione mucosa (Schwartz et al., 1998; Su et al., 2022). Zileutone viene dunque principalmente usato in pazienti soggetti a crisi asmatiche. I leucotrieni la cui produzione viene specificamente inibita sono: LTB₄, LTC₄, LTD₄, and LTE₄. La forma farmaceutica contiene due enantiomeri che risultano ugualmente attivi. Il farmaco a rilascio immediato è stato attualmente ritirato dal mercato statunitense, ma non da quello europeo.

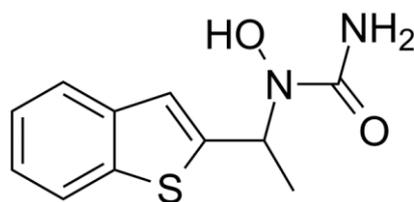


Figura 8: struttura molecolare del Farmaco Zileutone. (Figura presa da: www.medchemexpress.com)

Masoprocol è un farmaco normalmente usato come antineoplastico in quanto antiproliferativo dei cheratinociti (cheratosi solare), è anche un valido inibitore della 5 – lipossigenasi (Olsen et al., 1991); risulta essere anche inibitore di carbossilesterasi e di ciclossigenasi, seppur in forma ridotta. Il suo meccanismo di azione rimane in parte sconosciuto e la sua alta idrofobicità lo rende di difficile assorbimento cutaneo (intorno al 2%), nonostante sia il suo target principale. In ogni caso, il farmaco risulta approvato e in fase di investigazione (farmacovigilanza, fase IV).

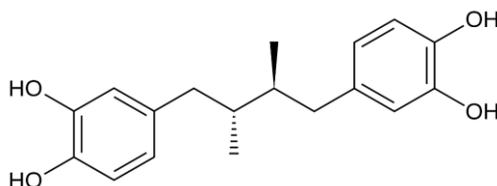


Figura 9: struttura molecolare del Farmaco Masoprocol. (Figura presa da: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00179>)

Anche alcuni polifenoli delle piante come eugenolo, resveratrolo, quercetina fungono da inibitori delle cascate enzimatiche innescate da Cox e Lox. In futuro l'utilizzo di diete mirate potrà portare beneficio in pazienti affetti da patologie infiammatorie croniche e potranno fungere da modello per la sintesi di nuovi farmaci mirati (Yoon & Baek, 2005). I polifenoli vegetali sembrano essere potenti inibitori dell'azione di 5 e 12-lipossigenasi anche con concentrazioni molto basse di IC₅₀ di 1.0-18.7 µM, impedendo quindi l'aggregazione piastrinica e l'eccessiva attivazione chemiotassica che porta ad asma (Laughton et al., 1991). La cosa interessante è che sembra che i polifenoli vegetali siano in grado di

inibire contemporaneamente l'azione di Cox e Lox evitando alcuni effetti tossici legati all'inibizione specifica di ciclossigenasi che porta ad eccessiva attivazione per compensazione di lipossigenasi con conseguente accumulo di leucotrieni e citochine pro-infiammatorie come TNF- α e IL-1 β (Yoon & Baek, 2005).

2. OBIETTIVO

Lo scopo di questa tesi è quello di sintetizzare e caratterizzare due proteine della specie *Vitis vinifera*. Lipossigenasi 2 e Lipossigenasi 7 sono due 13-Lox, enzimi interessati in meccanismi di perossidazione a scopo maturativo, segnalatorio e di apoptosi che perossidano i loro substrati come parte di cascate enzimatiche. È interessante notare come il meccanismo delle Lipossigenasi sia strettamente correlato a quello delle ciclossigenasi (Cox) nella cascata infiammatoria dell'acido arachidonico nei mammiferi e, partendo da questo presupposto, si rivela interessante e importante caratterizzarne più specie possibile per intenderne il meccanismo di catalisi e la funzione su scala sempre più ampia. Nonostante l'origine delle proteine in questo caso non sia animale, esse appartengono comunque al mondo eucariotico e la loro funzionalità, ci si aspetta, non cambia particolarmente da un regno all'altro, motivo per cui molte delle informazioni raccolte dal mondo animale e da quello vegetale sono intercambiabili.

Il filamento di DNA *primer*, all'inizio di questo progetto, era già stato scoperto e sintetizzato e quindi si è partiti dall'amplificazione del codice genetico della pianta con l'inserimento della sequenza nucleotidica su un *vettore* batterico in modo da poter produrre quantità soddisfacenti di materiale polipeptidico. Una volta ottenuta la corretta conformazione delle due proteine l'idea è stata di concentrarsi sulle caratteristiche principali degli enzimi, come il loro ambiente di azione prediletto, il loro substrato specifico e il risultato della loro catalisi, tutte operazioni che si sono andate a delineare e realizzare nel corso dello studio.

Pertanto, lo scopo di questo progetto è stato quello di sintetizzare due proteine ricombinanti di vite per lo studio in vitro della loro struttura quaternaria e dell'attività catalitica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Tutti i materiali sono stati forniti dalla Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (TN), a parte per quanto riguarda gli esperimenti con FPLC – MS e NMR, forniti dalla Università degli Studi di Trento, Dipartimento di Fisica.

Passiamo ora alla lista di tutti i materiali e gli strumenti utilizzati.

I primer per il clonaggio p-Lox2 Fw/Rev e p-Lox7 Fw/Rev sono stati acquistati dalla ditta *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Waltham, Massachusetts, USA).

L'acqua ultrapura (Milli Q) è ottenuta direttamente in sede Fondazione Edmund Mach tramite "Sistema Milli-Q® IQ 7003/05/10/15 per la produzione di acqua pura e ultrapura".

Il Buffer 5x Phusion HF, il dNTPs e la Phusion DNA-polymerase sono distribuiti da *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Waltham, Massachusetts, USA).

Il Termociclatore utilizzato per l'amplificazione del filamento di DNA utilizzato è MPCR-A100/A200 Gradient Thermal Cycler prodotto da *Hangzhou LongGene Scientific Instruments Co.,Ltd.* (China).

I gel di agarosio per elettroforesi sono tutti stati preparati all'1% di agarosio in 50 mL di H₂O, aggiungendo alla miscela, prima del raffreddamento, 4-6 µL di Etidio Bromuro (EtBr), soluzione 10 mg/mL in H₂O. I gel vengono immersi fino all'orlo, nella piastra per elettroforesi, da TAE (Tris – Acetato tampone a pH=8 e EDTA, sequestratore di cationi bivalenti come il Magnesio); la polvere di agarosio e il TAE sono forniti dalla ditta *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Waltham, Massachusetts, USA), mentre l'EtBr si è acquisito dalla ditta *Sigma Aldrich®* (*Saint Louis, MO, USA*).

Nel primo pozzetto del gel per elettroforesi sono sempre stati pipettati 5-10 μL di *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa* sempre distribuito da *Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)*. La stessa ditta distribuisce anche il *Fast Digest Green Ruler 10x* che viene aggiunto al campione nel pozzetto in dosi da 3 μL .

Lo strumento per elettroforesi usato è una *PowerPac™ Basic Power Supply* della *Bio-Rad Laboratories, S.r.l. (Segrate, MI, Italy)*.

Dopo PCR si passa alla purificazione del DNA utilizzando *High Pure PCR Purification Kit* prodotto da *Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, USA)*.

I plasmidi pQE – 30, così come il pET – 30 e i diversi enzimi di Restrizione utilizzati sia a fine di indagine/analisi, che ai fini del clonaggio del plasmide modificato (*SmaI*, *KpnI*, *EcoRI*, *Sall*, *HindIII*) sono prodotti della ditta *Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, USA)*. Così come la stessa ditta produce il Buffer per la digestione, l'enzima ligasi e l'enzima fosfatasi per la defosforilazione del DNA.

Dopo digestione enzimatica il campione viene incubato in *Thermomixer®, Comfort* della *Eppendorf SE (Hamburg, Germany)* e purificato con *High Product Purification Kit* di *Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, USA)*.

I kit di purificazione prevedono tutti dei cicli di centrifugazione, quindi si coglie qui l'occasione per elencare le diverse centrifughe utilizzate, selezionate in base al volume di campione caricabile sui rotori e alla possibilità, o meno, di refrigerare durante il ciclo.

Microcentrifuga non refrigerata a banco da 24 posti D3024 della *Scilogex, LLC (Rocky Hill, Connecticut, USA)*. Volumi fino a 2 mL.

Centrifuga modello 5810 R ad alta velocità, refrigerata, della *Eppendorf SE (Hamburg, Germany)* per volumi fino a 15 mL.

Centrifuga modello DL7M – 12L, refrigerata, per grandi volumi, della *Hunan Kaida Scientific Instrument Co., Ltd (China)* da noi utilizzata per formare il pellet di batteri dopo coltura su grandi volumi, overnight, dei campioni di *E. coli* modificato.

La dialisi è effettuata con membrane semipermeabili *V-series Membrane* della *Merck KGaA (Darmstadt, Germany)* immerse in acqua ultrapurificata nell'ottica di procedere con l'elettroporazione con lo strumento *Gene Pulser Xcell Microbial System* di *Bio-Rad Laboratories, S.r.l. (Segrate, MI, Italy)*.

Tutti i terreni di *LB - Broth* (Luria Bertani – Brodo di Lisogenia), liquidi, sono stati preparati secondo le seguenti proporzioni: 10 g di tryptone, 10 g di cloruro di sodio (NaCl) e 5 g di lievito in un litro di acqua distillata. I Terreni per piastre di Petri *LB - Agar*, solidi, seguono invece le seguenti proporzioni: 10 g peptone 140, 5 g sodio cloruro, 5 g di lievito e 12 g di agar in un litro di acqua distillata. Il Trypton è della *AG Scientific Holdings LLC. (San Diego, California)*. La polvere di agar, il peptone, l'estratto di lievito e il cloruro di sodio sono tutti comprati da *Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, USA)*.

Le materie prime per gli antibiotici utilizzati provengono tutte da *Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, USA)*.

1 g di *Ampicillina* viene sciolto in 10 mL di ddH₂O (acqua bidistillata, o ultra pure water) fino a soluzione limpida e il tutto viene filtrato per sterilizzazione con filtri da 0,22 µm. La concentrazione finale risulta di 100 mg/mL; prodotte 10 aliquote da 1 mL in Eppendorf da 1,5 mL.

340 mg di *Cloramfenicolo* vengono sciolti in 10 mL di Etanolo 70% fino a soluzione limpida, poi filtrati per sterilizzazione con filtri da 0,22 µm. La concentrazione finale risulta di 34 mg/mL; prodotte 10 aliquote da 1 mL in Eppendorf da 1,5 mL.

0,5 g di *Kanamicina* vengono sciolti in 10 mL di ddH₂O fino a soluzione limpida e il tutto viene filtrato per sterilizzazione con filtri da 0,22 µm. La concentrazione finale è 50 mg/mL; prodotte 10 aliquote da 1 mL in Eppendorf da 1,5 mL.

Gli incubatori utilizzati sono gli *HT Double Stack Multitron Incubator Shakers* della *Infors HT (Berlin, Germany)*.

IPTG proviene dalla ditta Lab Alley (*Austin, Texas, USA*),

Per il tampone di lisi vengono usati NaOH, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) e Isopropanolo della *Sigma Aldrich*[®] (*Saint Louis, MO, USA*); della stessa ditta sono anche il DTT e l'LDS per la corsa SDS-PAGE, mentre la RNAse, i gel di poliacrilamide e il marker SeeBlue[™] Plus2 Pre-Stained Protein standard vengono da *Thermo Fisher Scientific Inc.* (*Waltham, Massachusetts, USA*).

L'alimentatore per la SDS è lo stesso utilizzato per l'elettroforesi, cambia solo la vasca in cui il gel viene immerso.

Il sonicatore utilizzato è il Digital Sonifier[®] della *Branson* (*Ashburn, Virginia, USA*)

Tutti i reagenti per utilizzare lo FPLC, Hepes, NaCl e Imidazolo provengono da *Sigma Aldrich*[®] (*Saint Louis, MO, USA*), mentre le colonne (His-Trap, Desalting e Size Exclusion) sono di Fisherbrand[™] (*Waltham, Massachusetts, USA*). Lo strumento in sé, invece, è ÄKTA Purifier 100 (*GE Healthcare, CT, USA*).

Lo spettrofotometro HPLC – MS, utilizzato all'Università di Trento, è UltiMate 3000 RSLC System della *Thermo Fisher Scientific Inc.* (*Waltham, Massachusetts, USA*).

La risonanza magnetica nucleare è stata eseguita all'Università degli Studi di Trento, con il modello 400 MHz, Bruker-Advance (*Bremen, Germany*)

Lo spettrofotometro con cui sono state eseguite le cinetiche enzimatiche è il Synergy 2 della *Agilent Biotek* (*Santa Clara, California, USA*).

3.2 Lipossigenasi 2 – Parametri

La lipossigenasi 2 è stata estratta dalla specie *Vitis vinifera* e il suo genoma sequenziato (Ekblom & Wolf, 2014) grazie a database genomici come *plants.ensembl.org* con il codice Vitvi13g01780.t01 VviLOX2 da cui si è poi stati in grado di generare due primer, uno *Forward* e uno *Reverse* che hanno dato la possibilità di clonare l'intera sequenza di nucleotidi, costituita da 2589 bp che è la seguente:

```
ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCTCTG
CCACTGATGTAAGAGGAGTGGAGACGTCAAGGAGAATGCGGCATCGGTTAAGGCT
GTCGTTAGGGCGGCTGCTGCAGGGTTGCTGTCCGATCTAGGGATTACGAAGCCTCTT
GATGTGTATGCGGATTTGGTTGGGAAAACGCTGCTTTTGGAGCTTGTTAGCGCAGAG
GTCGACTCGGGGACAGGCTTGGAGAAGGGAACAATCAAGGGGTATGCCACAAAAGT
GAGGCATGAAAAGGAGGAGGTGGTATATGAGAGTGAATTCATAGTTCCTGCAGGTTT
TGGAGAGATTGGTGCAATTTTGGTAGAGAATGAACACCACAAGGAGATGTTTCATCAAC
AACATAGTGCTTGATGGATTACACAATGGCCCCATTCATATCAATTGCAGCTCATGGG
TTCATTCCAAGTTTGATAACCCTAAGAAGAGAATCTTCTTCACCAACAAGTCTTACTTG
CCGGACGAGACACCAAGCGGGTTGACGAAGCTAAGGGAGATGGAGTTGGAGAATCT
GCGCGGAAATGGAAAGGGAGAACGCAAGACGTCTGATAGGATCTATGATTACGATAC
TTACAATGATCTTGGGGATCCTGATGATAGTGAGGATCTTGCCCGCCCTATTATTGGC
GGCAAGGATCATCCTTACCCTAGGAGATGCAGAACCGGGCGTCCTAGTTCACAGAAA
GACCCGTTGTGCGAGAAGAGAACCAGCAGTGTGTATGTGCCGAGGGATGAAGCGTTT
GAAGAAGTGAAGCAGATGACATTCTCGACGAAGACGCTGAAATCAGTGCTGCACGCG
CTGCTGCCTCAGGTGGAGATCATGCTGCTGGATCCACACCTTGGATTTCCCTACTTCA
CTGCCATAGACTCACTGTTTCAAGAAGGAGTCCCCTTGCCCAAGAGCAAGAACTTCTT
TCAGTCAATCATCCCAAGACTGGTGAAGACTATAGCTGAAAGAGAAGGAGATATTTTG
CTCTTTGAAACCCCTGCAATGATCGACAGAGATAAATTTGCTTGGTTCAGGGATGAGG
AGTTTTCTCGGCAGGCTCTTGCTGGTCTCAACCCGTATAGCCTACAGTTGGTTACAGA
GTGGCCCTTGAAGAGTGAAGTGGATCCTGAGATCTATGGTCTCCAGAATCATTGATC
ACAGCAGAACTGATCGAGAAAGAGATCAAAGGGGTCATGACTATTGATGAGGCCTTG
AAACAAAAGAAGTTGTTTCATATTGGATTATCATGACCTTCTCTTACCTTATGTGAACAA
AGTGAGGGAGATTGAAGGCACGACATTGTATGGATCTCGAACTCTGTTCTTCCCTAACC
ATGGAGGGCACATTGAGGCCTCTTGCAATCGAGCTAACTAGGCCGCCAGTTGGTGAC
AAGCCGCAGTGAAGCAAGTGTTCACACCAGGCTGGGATGCCACGAGTTGCTGGCT
ATGGAGGCTGGCCAAAACCTCATGTTTGTGCTCATGACTCTGGTTATCACCAGCTTGTT
GTTCACTGGCTAAGGACTCACTGTTGTAAGTACTGAGCCATACATCATTGCAGCTAACCGGC
AACTAAGCGCTATGCACCCAATCTATAGACTCCTGCATCCTCATCTCAGGTACACAAT
```

GGAGATCAATGCTCTTGCTCGGGAAAGCCTCATAAATGCAGGTGGAATCATTGAGAG
CTGCTTCTCGCCGGGCAAGTATGCCATTGAGCTCAGTTCTGCTGCCTATGACCAGCT
CTGGAGATTTGACATGGAAGCTTTGCCTGCTGACCTGATCCGAAGGGGGATGGCAGT
TGAGGATCCAACAGCTGAGCATGGGCTGAAGCTCACCATTGAGGATTACCCTTTTGC
CAACGACGGTCTAGTCCTTTGGGATGCCATCAAGCAGTGGGTTAGGGACTATGTGAA
CCACTACTACCCAGACCCAAGCCTGGTTGAGTCTGATAAGGAGCTACAAGGTTGGTG
GACCGAAGTTCGAACCAAAGGGCATGCAGACAAGAAGGATGAGCCATGGTGGCCTG
TCATGAAAACCCAGAAGATCTAATCCATGTTTTAACCAACCATAATCTGGGTTACAGCA
GGGCACCATGCAGCTGTGAACTTCGGTCAATATGTATATGCCGGGTATTTCCCTAATC
GGCCCACAATAGCTCGAACCAACATGCCAACTGAGGACCCATCAGATGAGGAGTTCA
AGAACTTTCTGCATAAGCCAGAAATTGCCTTGTTAAAGTGCTTCCCTTACAGATTCAA
GCAACAAAATAATGGCAGTTTTGGATGTTCTGTCAAGTCATTCACCAGATGAGGAGT
ACCTCGGTGACCAGATGGAGCCATCCTGGACAGAAAACCCAATCATAAAGGCTGCAT
TCGAACGGTTCAATGGCAGATTGAAGGAGCTTGAGGGGATCATTGATGGGAGGAACA
CCAATTTGAACCTGAAGAACAGAACTGGAGCTGGGGTTGTTCCATATGAACTCTTGAA
GCCATTCTCAAACCAGGGGTACAGGAATGGGAGTTCCTAATAGCATCTCTATCTAA
CCC.

Tale codice genetico, se tradotto in sequenza amminoacidica, restituisce:

MRGSHHHHHHGSACELGTSATDVRGVETSKENAASVKAVVRAAAAGLLSDLGITKPLDVYADL
VGKTLLELVSAEVDSTGLEKGTIKGYAHKVRHEKEEVVYESEFIVPAGFGEIGAILVENEHHK
EMFINNIVLDGLHNGPIHINCSSWVHSKFDNPKKRIFFTNKSYPDETPSGLTKLREMELENLRG
NGKGERKTSDRIDYDYNDLGDPPDSEDLARPIIGGKDHPYPRRCRTGRPSSKKDPLSEKRT
SSVYVPRDEAFEEVKQMTFSTKTLKSVLHALLPQVEIMLLDPLHGFYFTAIDSLFQEGVPLPKS
KNFFQSIIPRLVKTIAREGDILLFETPAMIDRDKFAWFRDEEFSRQALAGLNPYSLQLVTEWPL
KSELDPEIYGPPESLITAEIEKEIKGVMTIDEALKQKLFILDYHDLLLPHYVKNVREIEGTTLYGSR
TLFFLTMEGTLRPLAIELTRPPVGDKPQWKQVFTPGWDATSCWLWRLAKTHVCAHDSGYHQL
VVHWLRTHCCTEPYIIAANRQLSAMHPIYRLLHPLHRYTMEINALARES LINAGGIIESCFSPGKY
AIELSSAAYDQLWRFDMERALPADLIRRGMAVEDPTAEHGLKLTIEDYPFANDGLVLWDAIKQWV
RDYVNHYYPDPSLVESDKELQGWWTEVRTKGHADKKDEPWWPVMKTPEDLIHVLTTIIVWTA
GHHAAVNFGQYVYAGYFPNRPTIARTNMPTEDPSDEEFKNFLHKPEIALLKCFPSQIQATKIMA
VLDVLSHSPDEEYLGDMEPSWTENPIIKAAFERFNGRLKELEGIIDGRNTNLNLKNRTGAGV
VPYELLKPFKPGVTGMGVPNSISI.

Aminoacido	Abbreviazioni	Quantità	%
Alanina	Ala (A)	56	6,5
Arginina	Arg (R)	42	4,9
Asparagina	Asn (N)	30	3,5
Acido Aspartico	Asp (D)	51	5,9
Cisteina	Cys (C)	9	1
Glutammina	Gln (Q)	18	2,1
Acido Glutammico	Glu (E)	70	8,1
Glicina	Gly (G)	56	6,5
Istidina	His (H)	33	3,8
Isoleucina	Ile (I)	52	6
Leucina	Leu (L)	88	10,2
Lisina	Lys (K)	54	6,3
Metionina	Met (M)	17	2
Fenilalanina	Phe (F)	32	3,7
Prolina	Pro (P)	56	6,5
Serina	Ser (S)	50	5,8
Treonina	Thr (T)	51	5,9
Triptofano	Trp (W)	17	2
Tirosina	Tyr (Y)	30	3,5
Valina	Val (V)	49	5,7
Pirrolisina	Pyl (O)	0	0
Selenocisteina	Sec (U)	0	0

Tabella 1: mostra la lista di aminoacidi presenti in Lox2, con la percentuale con la quale essi sono contenuti all'interno della proteina. È interessante far notare l'abbondanza di Leucina (evidenziata in grigio), caratteristica riscontrata in quasi tutte le proteine di origine animale.

Con la sequenza di aminoacidi che compongono la proteina a portata di mano la si può inserire in un software come *ExPASy – Translate Tool* con cui è possibile estrapolare tutta una serie di dati preliminari, che consentono di cominciare a orientarsi con quello che sarà l'oggetto dello studio in questione.

- Numero di aminoacidi: 861
- Peso molecolare: 97415,04

- Punto isoelettrico teorico (pI)¹: 5,75
- Assorbività molare specifica² considerando tutti i residui di Cisteina come ridotti; valore misurato in acqua a 280 nm: 138200 M⁻¹cm⁻¹
- Indice di Instabilità: 39,61 la proteina è considerata stabile, anche se al limite, visto che le sequenze nucleotidiche si considerano stabili se possiedono questo valore inferiore a 40.

3.2.1 Il Dominio PLAT di Lox2

Altra caratteristica interessante di Lox2 è il suo Dominio PLAT (Policystin-1 Lipoxygenase Alpha Toxin) (Bateman & Sandford, 1999). Tale sequenza amminoacidica, detta β – sandwich (Kister et al., 2006), si costituisce di due foglietti β antiparalleli formati da quattro filamenti β ognuno ed è stata riscontrata in tutta una serie di proteine, soprattutto lipossigenasi associate a membrane, o a lipidi.

Il dominio PLAT di Lox2 è il seguente:

146 - YESEFIVPAGFgEIGAILVENEHH-----KEMFINNIVLD-GLHNGPIHINCSSWVHSKF
DNPKKRIFF - 208

Dove 146 e 208 sono l'aminoacido di partenza e di arrivo nella sequenza amminoacidica totale della proteina. Anche qui possiamo estrapolare tutta una serie di parametri come è stato fatto per la proteina intera.

¹ Punto Isoelettrico: è il valore di pH al quale una molecola presenta una carica netta uguale a 0. Tale valore, per le proteine, è calcolato sulla base della costante acida (pKa) di ciascuno dei gruppi amminici e carbossilici degli aminoacidi che le compongono secondo la formula:

$$pI = pKCOO^- + pKNH_3 + 2$$

² Assorbività Molare Specifica, o Coefficiente di Estinzione Molare, indica l'Assorbanza di una specie chimica in soluzione a concentrazione molare unitaria, ad una lunghezza d'onda specifica (per le proteine a 280 nm), attraverso una cella di lunghezza ottica unitaria e viene calcolata come:

$$\varepsilon = A * C * l \frac{1}{M * cm}$$

Dove A è l'Assorbanza, C la concentrazione e l la lunghezza del cammino ottico che, come spiegato, sarà di grandezza unitaria.

Aminoacido	Abbreviazioni	Quantità	%
Alanina	Ala (A)	2	3,2
Arginina	Arg (R)	1	1,6
Asparagina	Asn (N)	6	9,5
Acido Aspartico	Asp (D)	2	3,2
Cisteina	Cys (C)	1	1,6
Glutammina	Gln (Q)	0	0
Acido Glutammico	Glu (E)	6	9,5
Glicina	Gly (G)	5	7,9
Istidina	His (H)	5	7,9
Isoleucina	Ile (I)	8	12,7
Leucina	Leu (L)	3	4,8
Lisina	Lys (K)	4	6,3
Metionina	Met (M)	1	1,6
Fenilalanina	Phe (F)	6	9,5
Prolina	Pro (P)	3	4,8
Serina	Ser (S)	4	6,3
Treonina	Thr (T)	0	0
Triptofano	Trp (W)	1	1,6
Tirosina	Tyr (Y)	1	1,6
Valina	Val (V)	4	6,3
Pirrolisina	Pyl (O)	0	0
Selenocisteina	Sec (U)	0	0

Tabella 2: la conta amminoacidica del dominio PLAT e la distribuzione percentuale in Lox2. Salta subito all'occhio come qui sia Isoleucina l'aminoacido più abbondante, il quale ha caratteristiche apolari e non è carico.

Anche qui possiamo estrapolare tutta una serie di informazioni sul dominio della proteina, che andremo ad elencare qui di seguito:

- Numero di aminoacidi: 63
- Peso molecolare: 7237,24
- Punto isoelettrico teorico: 5,88
- Numero totale di residui carichi negativamente (Asp + Glu): 8
- Numero totale di residui carichi positivamente (Arg + Lys): 5
- Assorbività Molare considerando tutti i residui di cisteina come ridotti; valore misurato in acqua a 280 nm: $6990 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Indice di Instabilità: 49,52 questo valore perde di senso, visto che stiamo parlando solo di un dominio della proteina e non del suo insieme, quindi è una componente che in ogni caso non sussisterebbe di per sé stessa.

3.3 Lipossigenasi 7 – Parametri

Anche Lox7 è stata estratta dalla specie vegetale *Vitis vinifera* e caratterizzata grazie ai database di Ensemble con il codice Vitvi06g00155.t01 VviLOX7 da cui si sono generati i primer che hanno consentito di produrre la sequenza di basi costituita da 2662 unità:

```
ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCGCAA
CCCAGAATCCAGAAATGCTCCAGACTCAATTCCACCAGCCACACCTTGGCCGGACCT
CCTTACCCCACGAAGCAGTAGCAGCTGGAACCAACAGCTCCATTTCTGTAAAGGCAA
CTGTTACCGTGAAATTAAGTATGATGGAGGGTGCTCCTCCTGCTTGTAGGGTTGTGTA
TCCGCTCGATAATATATCGGACTTGCTTGGTAAATCACTCCTCTTAGAGCTTGTAGTG
CAGAGCTTGATCCTCAGACGGGATTGGAGACAAGACCGATTAGCCGGTATGCTCATC
GAGTAGGCCAAGAGGATGGGGATGTGATTTACGAATCAGAATTTGTGATTCCTGGTG
ACTTTGGGGAGATTGGTGCGGTTCTACTGCAGAATGAATACCGCAGCGAGATGTTCC
TCAAGTATATTGTCCTCAATGGCCTCCCCAGTGGCCCTATTGCATTCAACTGCGATTC
ATGGGTTCAAGTAAAGTTTGTGATCCTGAGAAGAGGATCTTTTTTCAGCAACAAGTCA
TATTTACCATCACAAACGCCAGAGGCCTCAAGGATTTGAGAGAAAAAGAACTTGCAA
ATTTGCGAGGTAACGGTGAAGGAGAACGCAAGACCTCCGATAGAATATATGATTATGA
TGTTTATAATGATCTGGGTAACCCTGATAGCAAGTCTGAATTGGGGCGACCAGTACTA
GGTGGCAATGAAAATTATCCATATCCTAGACGATGCAGAACTGGACGTCCACCGTGT
CAGACTGATCCTCTTTTCGGAGACAAGGAGTGGCAGCTTCTATGTGCCAAGGGATGAA
GAATTTTCTGAGGTGAAGGAGGCATCATTATAACAAAGACAGTAGACTCGGTGTTGC
ATGCTTTAAACCGTCCCTAGAGACATCCCTACTTGACAGTAATCTTGGATTTCCACTC
TTCTCAGATATAGACCAATTATACTATCAAGGAATCACCATTCCCTAAGCTTAAAAATCC
AGGGCTTTTGCAACGTATACTGCCAGACTAGTGAAGGCCGTTTCTGATGCTAAAGAT
CGTCTCCTGAAATTTGAAACCCCTGCAATGTTTCTCAAGGACAAGTTTTCTTGGCTTC
GGGATGAGGAATTCTCACGCCAAACTCTTGCTGGTGTTAACCCGTATAGTATAAAGTT
GGTTATGGAATGGCCGTTGAAAAGCGCATTGGATCCTGATGTCTACGGTCCACCTGA
ATCGGCAATCACCAAGAGTTGGTCGAGCGGGGATAAAAGGCTTCATGACAGTAGA
CGAAGCATTAGAACAGAAGAACTATTCATCATAGATTACCATGACTTGTTATTACCAT
ATGTGAGCAAAGTAAGGCAGATCGAAGGGACAACACTATATGGCTCCAGGGCACTTT
TCTTCTAACCCCTGATTGCACCTTGAAGCCTCTAGCCATTGAGCTCACTCGCCACC
GATGGATGGAAAGCCACAGTGAAGCAAGTTTTACGCCCGGCTTGAAGCTACAGA
TCACTGGCTTTGGAAGTTTGCCAAAACCCATTTCTTGCTCATGACTCCGGTTATCAT
GAGCTTGTTAGTCACTGGTTAAGAACTCACTGTGCAACAGAACCTTACGTGATTGCAA
CAAATCGGCAACTCAGTGTGATGCACCCAATCTATAAACTATTACATCCTCATTACCG
TATACAATGCAGATCAATGCTCTTGCTAGAGAAGCTCTCATCAATGCGGATGGGATCA
```

TTGAGACTTCATTCTCAACCCGCAAGTATTCTATGGAGCTTAGCTCTGCCGCTTATGA
CCAGCAGTGGCGGTTTTGATAGGGAAGCCCTGCCAGCAGACCTAATAAACAGGGGAAT
TGCTGTTGAGGATCCAAGTGCTTCCCATGGCCTAAAGCTACTGATCGAAGACTATCCT
TTTGCCAACGACGGTCTTATATTATGGGATGCCTTGAAACAATGGGTTGCAGACTATG
TCAATTACTACTACAAGGACGCGAGCATGGTACAGTCTGATCCAGAGCTCCAAGCAT
GGTGGACAGAAATCCGAACCAAAGGTCATGAGGATAAAAAAGATGAACCATGGTGGC
CAGTCCTCCAAACACCAGAAGACCTCATTGGAATTATCGCAACAATAGCTTGGGTGGC
CTCCGCTCATCATTGACCGTCAATTTTGGACAATATGCTTTTGGCTGCTTACTTCCCA
ATAGGCCTACCATCGCTAGAACCAATATGCCCTCTGAGGACCCAACAAGTGAAGGAT
GGAAACGATTTTTGGACAATCCCGATTTTGGAGCTCTTGGTATGCTTCCCTTACAGGT
TCAAGCAACAAAAGTTATAGCTATTTTAGATGTGCTATCCAATCATTCTCCGGATGAGG
AGTATATAGGGGAATATATGGAGCCAGCATGGGGTGAAGAACCAGATATAAAGGAAG
CATTGAAAGGTTTTCTGCGAGGTTAAAGGAACTCGAAGTAATTATTGATGCTAGGAA
TGCAGACAATAGTTTGAAGAACAGAGGCGGAGCTGGGGTGGTTCCATATGAGCTCTT
GAAGCCATTTTCTGAAGCTGGGGTGACAGGAAAGGGAGTTCCTTACAGCATCTCCAT
CTGAG

La sequenza di basi azotate viene tradotta in aminoacidi dall'enzima
Trascrittasi Inversa come segue:

MRGSHHHHHHGSACELGTATQNPEMLQTQFHQPHLGRSLPHEAVAAGTNSSISVKATVT
VKLTDGGCSSLGLGNCPLDNISDLLGKSLLELVSAELDPQTGLETRPISRYAHRVGQED
GDVIYESEFVIPGDFGEIGAVLLQNEYRSEMFLKYIVLNLPSGPIAFNCDSWWQSKFDDP
EKRIFFSNKSYLPSQTPRGLKDLREKELANLRNGEGEKTS DRIYDYDVYNDLGNPDSK
SELGRPVLGGNENYPYPRRCRTGRPPCQTDPLSETRSGSFYVPRDEEFSEVKEASFITKT
VDSVLHALKPSLETSLLDSNLGFPLFSDIDQLYYQGITIPKLKNPGLLQRILPRLVKAVSDAK
DRLLKFETPAMFLKDKFSWLRDEEFSRQTLAGVNPYSIKLVMWPLKSALDPDVYGPPE
AITKELVERGIKGFMTVDEALEQKKLFIIDYHDLPLPYVSKVRQIEGTTLYGSRALFFLTPDC
TLKPLAIELTRPPMDGKPQWKQVFTPGLEATDHWLWKFAKTHFLAHD SGYHEL VSHWLR
THCATEPYVIATNRQLSVMHPIYKLLHPHLRYTMQINALAREALINADGIIETSFSSTRKYSME
LSSAAYDQQWRFDREALPADLINRGIAVEDPSASHGLKLLIEDYPFANDGLILWDALKQWV
ADYVNYYYKDASMVQSDPELQAWWTEIRTKGHEDKKDEPWWPVLQTPEDLIGIATI AWV
ASAHHS AVNFGQYAF AAYFPNRPTIARTNMPSEDPTSEGWKRFLDNPDFELLVCFPSQV
QATKVIAILDVLSNHSPDEEYIGEYMEPAWGEEPDIKEAFERFSARLKELEVIIDARNADNS
LKNRGGAGVVPYELLKPFSEAGVTGKGVPYISIS

Aminoacido	Abbreviazioni	Quantità	%
Alanina	Ala (A)	60	6,8
Arginina	Arg (R)	44	5
Asparagina	Asn (N)	31	3,5
Acido Aspartico	Asp (D)	57	6,4
Cisteina	Cys (C)	10	1,1
Glutamina	Gln (Q)	29	3,3
Acido Glutammico	Glu (E)	65	7,3
Glicina	Gly (G)	55	6,2
Istidina	His (H)	26	2,9
Isoleucina	Ile (I)	46	5,2
Leucina	Leu (L)	97	10,9
Lisina	Lys (K)	48	5,4
Metionina	Met (M)	13	1,5
Fenilalanina	Phe (F)	36	4,1
Prolina	Pro (P)	60	6,8
Serina	Ser (S)	65	7,3
Treonina	Thr (T)	46	5,2
Triptofano	Trp (W)	17	1,9
Tirosina	Tyr (Y)	35	4
Valina	Val (V)	46	5,2
Pirrolisina	Pyl (O)	0	0
Selenocisteina	Sec (U)	0	0

Tabella 3: tabella che mostra la lista di aminoacidi presenti in Lox7, con la percentuale con la quale essi sono contenuti all'interno della proteina.

Anche qui, grazie alla sequenza di aminoacidi, inserendo i dati nel software ExPasy è possibile ricavare informazioni preliminari sulla proteina da studiare:

- Numero di aminoacidi: 886
- Peso molecolare: 100008,29
- Punto Isoelettrico teorico: 5,39
- Numero totale di residui carichi negativamente (Asp + Glu): 122
- Numero totale di residui carichi positivamente (Arg + Lys): 92
- Assorbività Molare considerando tutti i residui di Cisteina come ridotti; valore misurato in acqua a 280 nm: $145650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Indice di Instabilità: 35,03 la proteina sembra piuttosto stabile, anche più di Lox2.

3.3.1 Il dominio PLAT di Lox7

In questo sotto capitolo verranno illustrate le caratteristiche del dominio PLAT di Lox7, la cui funzione, come per la precedente, è quella di coniugazione con membrane plasmatiche; quella che segue è la serie amminoacidica che lo compone:

109 - YESEFVIPGDFQEIGAVLVQNEYR-----SEMFLK YIVL—NGLPNGPIAFNCG SWVQ
SKFDDPEKRIFF - 171

Aminoacido	Abbreviazioni	Quantità	%
Alanina	Ala (A)	2	3,2
Arginina	Arg (R)	2	3,2
Asparagina	Asn (N)	4	6,3
Acido Aspartico	Asp (D)	3	4,8
Cisteina	Cys (C)	1	1,6
Glutamina	Gln (Q)	2	3,2
Acido Glutammico	Glu (E)	6	9,5
Glicina	Gly (G)	6	9,5
Istidina	His (H)	0	0
Isoleucina	Ile (I)	5	7,9
Leucina	Leu (L)	4	6,3
Lisina	Lys (K)	3	4,8
Metionina	Met (M)	1	1,6
Fenilalanina	Phe (F)	7	11,1
Prolina	Pro (P)	4	6,3
Serina	Ser (S)	4	6,3
Treonina	Thr (T)	0	0
Triptofano	Trp (W)	1	1,6
Tirosina	Tyr (Y)	3	4,8
Valina	Val (V)	5	7,9
Pirrolisina	Pyl (O)	0	0
Selenocisteina	Sec (U)	0	0

Tabella 4: composizione amminoacidica del dominio PLAT di Lox7 e percentuale di distribuzione. Come si può notare il dominio è ricco in Phe (evidenziato in grigio), aminoacido non polare a carattere idrofobico, facendo supporre una probabile distribuzione nel bilayer fosfolipidico.

Con la sequenza di aminoacidi possiamo, come sempre, estrarre i parametri teorici del dominio:

- Numero di aminoacidi: 63
- Peso molecolare: 7223,2
- Punto isoelettrico teorico: 4,44
- Assorbività Molare considerando tutti i residui di cisteina come ridotti; valore misurato in acqua a 280 nm: $9970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Indice di Instabilità: 31,62 il dominio è stabile ma, anche qui, questo è un valore che perde di importanza, essendo solo un frammento non a sé stante della proteina.

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR è una tecnica basata su cicli termici (Solanki, 2012), largamente usata, che consente di ottenere da milioni a miliardi di copie di una sequenza di DNA in poco tempo, consentendo ai ricercatori di amplificare piccole quantità di DNA, o pezzi di esso in modo da averne a sufficienza per poter essere studiato. Questa tecnica è stata inventata nel 1983 ed è valsa al biochimico statunitense Kary Mullis (1944-2019) e al chimico inglese Michael Smith (1932-2000) il premio Nobel per la chimica nel 1993.

La PCR impiega tre reagenti principali per funzionare, i *primers* (piccoli filamenti singoli di DNA noti come oligonucleotidi, che sono regioni complementari del DNA che si vuole ottenere), i 4 nucleotidi e una *DNA-polimerasi*. I primers sono di due tipi, un *primer forward* e il *primer reverse*, che sono complementari rispettivamente alla regione a monte sul filamento senso e alla regione a valle sul filamento antisenso, e sono necessari per innescare la sintesi dei due filamenti, che procede dal 5' al 3'.

Attraverso cicli termici diversi e ripetuti di riscaldamento e raffreddamento si ottengono differenti reazioni temperatura dipendenti, come la separazione (denaturazione) del doppio filamento, o l'azione di catalisi enzimatica e quindi replicazione.

La prima fase, ad alta temperatura, consente la denaturazione del doppio filamento. Nella seconda fase, abbassando la temperatura, si ottiene l'appaiamento dei primers al filamento complementare; da qui i due nuovi filamenti singoli di DNA fungeranno da stampo per la DNA-polimerasi che assemblerà il nuovo filamento di DNA dai nucleotidi liberi. Progredendo, i nuovi filamenti assemblati di DNA fungeranno essi stessi da stampo per creare nuovo DNA, consentendo un'esponenziale amplificazione del DNA originale.

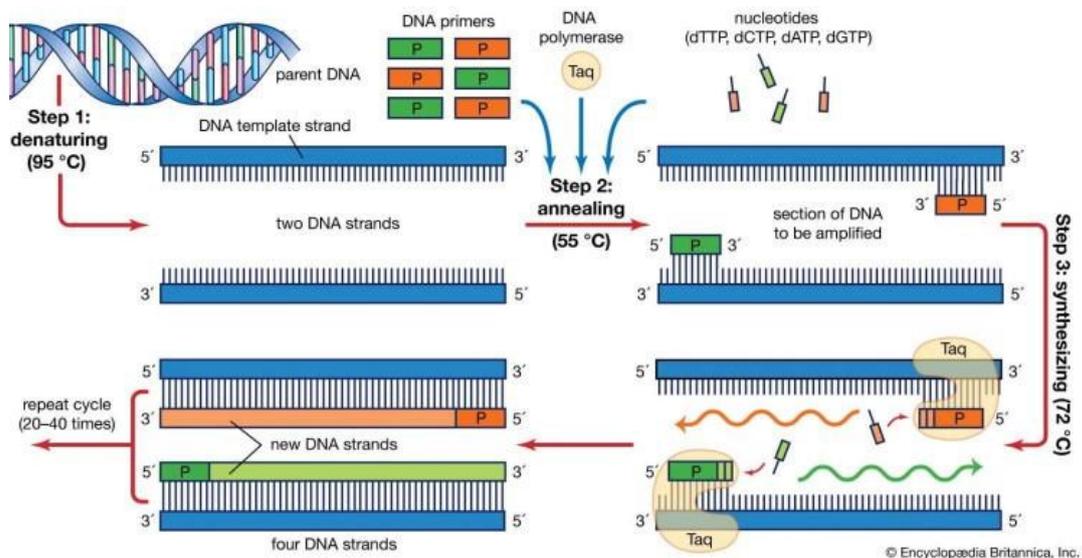


Figura 10: rappresentazione grafica degli step di una reazione polimerasica a catena. (Figura presa da: Encyclopædia Britannica).

3.5 Elettroforesi

L'elettroforesi (Ishtiaq et al., 2023) è una tecnica che sfrutta la diversa massa molecolare e carica di acidi nucleici, o proteine e che consente di valutarne la qualità e la quantità. Gli acidi nucleici sono carichi negativamente, quindi ci si aspetta che migrino verso il polo positivo della piastra con velocità e distanze diverse in base al loro peso molecolare e in base al grado di avvolgimento; molecole circolari avvolte migrano più facilmente.

Nel caso si stiano studiando acidi nucleici, si prepara un gel di agar allo 0,8% utilizzando 0,8 grammi di agarosio su 100 millilitri di TAE 1x (Tris-Acetato-

EDTA³). Normalmente si utilizzano gel all'1%, ma trattandosi di molecole molto grandi (2500 bp plasmide originale e 3500 bp plasmide modificato), si diluisce di più per avere una migliore separazione.

La miscela viene riscaldata fino a limpidezza, lasciata raffreddare quanto basta e aggiunta di etidio bromuro, che ha la funzione di frenare la corsa degli acidi nucleici e, essendo fluorescente, di renderli visibili alla lampada UV; è carico positivamente, quindi migra nel senso opposto rispetto alle molecole di studio. Il bromuro di etidio è un intercalante di acidi nucleici, infatti si innesta nel solco maggiore del DNA, srotolando leggermente l'elica, cambiandone la conformazione e la carica e ciò lo rende una sostanza pericolosa per la salute dell'operatore, cancerogena e che ne obbliga l'utilizzo sotto cappa aspirante, muniti di guanti e di giusta attenzione.

La miscela omogenea così ottenuta viene quindi colata in una piastra comprensiva di un pettine che lascia aperti dei pozzetti in cui si pipettano le soluzioni da studiare. Dopo completa asciugatura il gel può essere sistemato nella piastra da elettroforesi a bagno in una soluzione di TAE 1x. A questo punto 5 μ L di soluzione di studio vengono aggiunti su 3 μ L di Fast Digest Green Buffer 10x (composto da una tintura blu che migra con frammenti di DNA di 3 – 5 kb (base * 1000), e una gialla che migra più velocemente di un frammento di 10 basi di DNA) e l'intera miscela versata nei pozzetti.

Se il metodo di indagine prevede lo scoprire il peso molecolare della catena inserita, in uno dei pozzetti (tendenzialmente il primo) viene inserito un marker molecolare (Fast Ruler Middle Range è il più utilizzato per i nostri scopi) che permette di identificare molecole che vanno da 100 bp (base pairs, coppie di basi) a 5000 bp.

La corsa viene effettuata impostando il voltaggio tra i 120 e i 150 V (\approx 400 mA) conclusa la quale si pone il gel sotto una lampada a ultravioletti e si osservano le distanze percorse dai campioni in relazione al peso molecolare indicato dal Marker e si tirano le somme.

³ EDTA: Acido Etilendiamminotetraacetico, un agente chelante.

Un'altra indicazione che dà l'elettroforesi, seppur in maniera piuttosto grossolana, è sulla quantità di campione che è contenuto nella soluzione esaminata, come viene mostrato nell'immagine che segue.

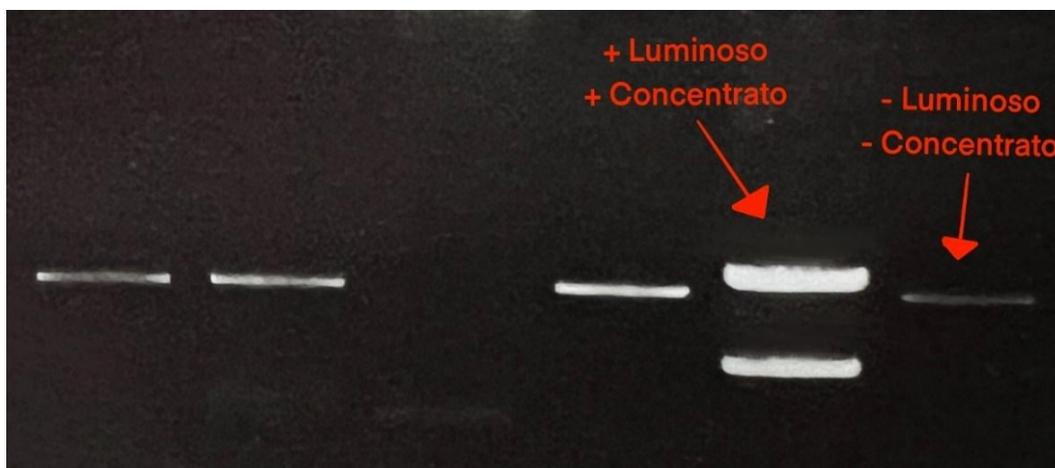


Figura 11: in questa immagine è rappresentata la foto di un gel di elettroforesi a fine corsa visto sotto lampada a ultravioletti. Come è possibile notare, l'intensità delle bande cambia in base al pozzetto che si osserva. La teoria a riguardo dice che, a parità di peso molecolare dei campioni in soluzione, se il numero di moli del primo è 10 volte tanto quello del secondo, anche la luminosità deve essere 10 volte più intensa. Di conseguenza, seppur la stima ad occhio nudo non sia particolarmente precisa, l'operatore sarà comunque in grado di farsi un'idea sulla concentrazione relativa del proprio campione in rapporto al controllo, o ad altre molecole di pari, o simile, Peso Molecolare.

3.5.1 Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE)

La SDS – PAGE (Manns, 2011; Nybo, 2014; Roy & Kumar, 2014) è una tecnica elettroforetica normalmente utilizzata per separare proteine di massa molecolare compresa fra 5 e 250 KDa. L'analisi avviene immergendo un gel di poliacrilammide nella vasca per elettroforesi riempita con sodio dodecil solfato (anche detto Sodio Lauril Solfato, o SLS), composto anfifilico con azione detergente, e facendo passare una corrente di 100 – 180 Volt.

Il campione proteico va preparato prima di poter essere inserito nei pozzetti del gel aggiungendo:

- DTT (ditiotreitolo) 5-10 mM (millimolare), composto a forte azione riducente che qui riduce i ponti disolfuro delle proteine
- Acqua bidistillata
- LDS Buffer 4x⁴ (Litio Dodecil Solfato), un riducente, pre – colorato con Blu di Coomassie⁵ per consentire di vedere la corsa delle proteine. Ne viene aggiunto quanto basta (X) per ottenere OD (Densità Ottica) = 0,1 in 15 µL di Volume (l'ampiezza del pozzetto del gel) secondo la proporzione:

$$OD_{4h} : X = 0,1 OD : 15 \mu L$$

Il valore di densità ottica deriva da una prova allo spettrofotometro impostato per lettura a 600nm del campione a 4 ore dall'induzione dell'espressione proteica (tecnica che verrà largamente discussa nella sezione Materiali e Metodi di questa tesi). Una volta aggiunto il campione della miscela lo si sposta immediatamente in incubatore a 70 °C per 10 minuti e infine portato a temperatura ambiente prima dell'utilizzo. Si ottiene così una soluzione viscosa (maggiore il contenuto proteico, maggiore la viscosità) con proteine completamente denaturate, pronte per essere poste nel gel di poliacrilato.

Nel primo pozzetto del gel viene inserito un marker per controllare il peso molecolare delle proteine di interesse; eventualmente, il marker viene aggiunto anche nell'ultimo pozzetto, se questo non è riempito di campione, per evitare traslazione della corsa verso l'esterno, viene utilizzato come una sorta di confine.

Una volta in possesso del gel le bande non sono ancora visibili, è quindi necessario applicare un protocollo di colorazione su gel che è attuato come segue.

Il gel utilizzato in laboratorio si trova all'interno di un "sandwich" di plastica che va aperto avendo cura di non danneggiare il polimero. Esso viene quindi lavato tre volte con 100 mL di acqua distillata per eliminare SDS e sali del buffer

⁴ LDS Sample Buffer 4x: un riducente utilizzato per il controllo delle proteine su SDS – PAGE; è così composto: 40 % glicerolo, 4 % litio dodecil solfato (LDS), 4 % Ficoll™400, 0,8 M trietanolammina-Cl pH 7,6 con 0,025 % phenol red, 0,025 % coomassie G250, 2 mM EDTA disodico.

⁵ Blu di Coomassie: reagente colorante con azione riducente composto dal 45% di metanolo, il 10% di Acido Acetico glaciale, un altro 45% di acqua e 3 g/L di Coomassie Brilliant Blue R250.

che potrebbero interferire con il successivo legame del colorante alle proteine. A questo punto si immerge il gel in 100 mL di colorante (Invitrogen™ SimplyBlue™ SafeStain) in modo da coprirlo interamente e lo si lascia agire per un'ora a temperatura ambiente sotto gentile agitazione. Qui le bande delle proteine cominceranno ad apparire, ma la qualità migliore si ottiene con il processo di decolorazione, che consiste nell'immergere il gel in 100 mL di acqua bidistillata per 1-3 ore; il gel si conserva in acqua anche per giorni senza perdere di sensibilità. Se si ha fretta e non si necessita di una risoluzione troppo alta questi ultimi due passaggi si possono velocizzare facendo sobbollire rapidamente il colorante e, successivamente l'acqua, in forno a microonde.

3.6 Elettroporazione

L'elettroporazione è una tecnica di trasformazione genetica che consente di integrare un plasmide modificato ad hoc all'interno di una cellula di E. coli (Green & Sambrook, 2020; Haberl Meglič et al., 2020; Morrison, 2001; Sambrook & Russell, 2006).

L'elettroporatore è uno strumento che espone le cellule a campi elettrici pulsanti con l'intento di destabilizzare membrana e parete batterica creando dei pori della grandezza di qualche nanometro che consentano il passaggio di molecole di DNA verso l'interno del citosol. La miscela cellulare viene messa in soluzione insieme ai plasmidi modificati e il tutto viene accuratamente posto all'interno di una cuvetta che, una volta sistemata nell'elettroporatore, subisce un impulso di 25 microfarad per 4,6 millisecondi. La resa di tale operazione è piuttosto alta, si è infatti in grado di ottenere 10^9 cellule modificate per microgrammo di soluzione.

3.7 Spettrofotometria

Lo spettrofotometro UV – VIS (Ultravioletto – Visibile) (L.C. Passos & M.F.S. Saraiva, 2019; Pratiwi et al., 2021) è uno strumento utilizzato in quella branca della scienza detta spettrofotometria che consente di compiere misure quantitative delle proprietà di riflessione, o di trasmissione di un materiale in

funzione della lunghezza d'onda. Il dispositivo consente di irradiare nelle lunghezze d'onda (λ) dell'ultravioletto (UV), comprese fra 190 e 380 nanometri (nm) e della luce visibile, fra 380 e 900 nm. Grazie ad esso è dunque possibile impostare una lunghezza d'onda di assorbimento per misurare la quantità di luce assorbita con valore di *densità ottica*, o *assorbanza*. In questa sede si è soprattutto utilizzato lo strumento per quantificare la crescita di una coltura batterica, oppure per quantificare la concentrazione di proteine all'interno di una miscela.

La Trasmittanza e la Trasmittanza percentuale sono calcolate come:

$$T = \frac{\Phi_t}{\Phi_0}$$

$$T\% = 100 * T$$

dove Φ_t è il flusso luminoso incidente e Φ_0 è il flusso luminoso emesso. Spesso in laboratorio, come è accaduto nel caso in essere, viene però usato un altro valore per orientarsi nelle procedure di studio; tale valore è l'*assorbanza (A)*, o *densità ottica (OD)* ed è espressa in funzione della Trasmittanza con la seguente formula:

$$A = -\log_{10}T = \varepsilon * c * l$$

L'Assorbanza ottica è un fenomeno che si verifica quando gli elettroni di una molecola incontrano un fotone con sufficiente energia da promuoverlo allo stato eccitato (E_{fin}) secondo la legge di Planck:

$$E_{fin} - E_{in} = h * \nu$$

dove h è la costante di Planck, che vale $6,626 * 10^{-34} \frac{J}{Hz}$. Quattro sono le possibili combinazioni fra Stato Fondamentale (S_0) e Stato Eccitato (S_1): $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$, ma solo le transizioni $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ possono avvenire con le energie fornite da uno strumento UV – VIS. Ogni molecola, data una lunghezza d'onda in cui l'assorbimento è massimo, possiede comunque un range di λ (verso

valori maggiori e minori) nel quale assorbe via via di meno e ciò è dovuto al fatto che ogni molecola possiede tutta una serie di livelli energetici vibrazionali e rotazionali e ciò porta alla transizione di un elettrone piuttosto che un altro, i quali assorbono più, o meno energia. Le molecole in grado di assorbire la luce sono dette cromofori e fra questi incontriamo anche tutta una serie di solventi (tamponi) utilizzati per tenere le proteine in soluzione. Riferendosi a quest'ultima cosa bisogna fare caso al fatto che un solvente polare aumenta l'energia dello stato eccitato e diminuisce il valore di λ_{\max} (lunghezza d'onda massima) e un solvente apolare diminuisce l'energia dello stato eccitato e aumenta la λ_{\max} .

Tipicamente le proteine assorbono in un range tra 190 e 220 nm, risultato delle variazioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, mentre invece gli aminoacidi aromatici, come Tyr, Trp e Phe assorbono intorno ai 280 nm per via dei loro doppi legami coniugati che delocalizzano gli elettroni dello stato π^* . Fra questi tre, sicuramente il triptofano è il cromoforo proteico più interessante a livello analitico.

L'assorbanza delle proteine viene normalmente misurata a 280 nm (A_{280}) per calcolarne la concentrazione in soluzione con la Legge di Lambert – Beer e per fare ciò è necessario conoscere la sequenza proteica per poter applicare la seguente formula, ottenuta secondo il principio per cui l'Assorbanza è una grandezza additiva⁶:

$$\epsilon_{280}^{Protein} = n_{Trp} \epsilon_{280}^{Trp} + n_{Tyr} \epsilon_{280}^{Tyr} + n_{s-s} \epsilon_{280}^{S-S}$$

ϵ_{280}^{Trp} , ϵ_{280}^{Tyr} e ϵ_{280}^{S-S} indicano i coefficienti di estinzione molare a 280 nm di triptofano, tirosina e cistina (legame disolfuro), mentre n indica il numero di aminoacidi, del tipo indicato, nella sequenza proteica.

⁶ L'Assorbanza è una grandezza additiva nel senso che tutte le parti di una molecola contribuiscono alla somma finale che è il suo valore.

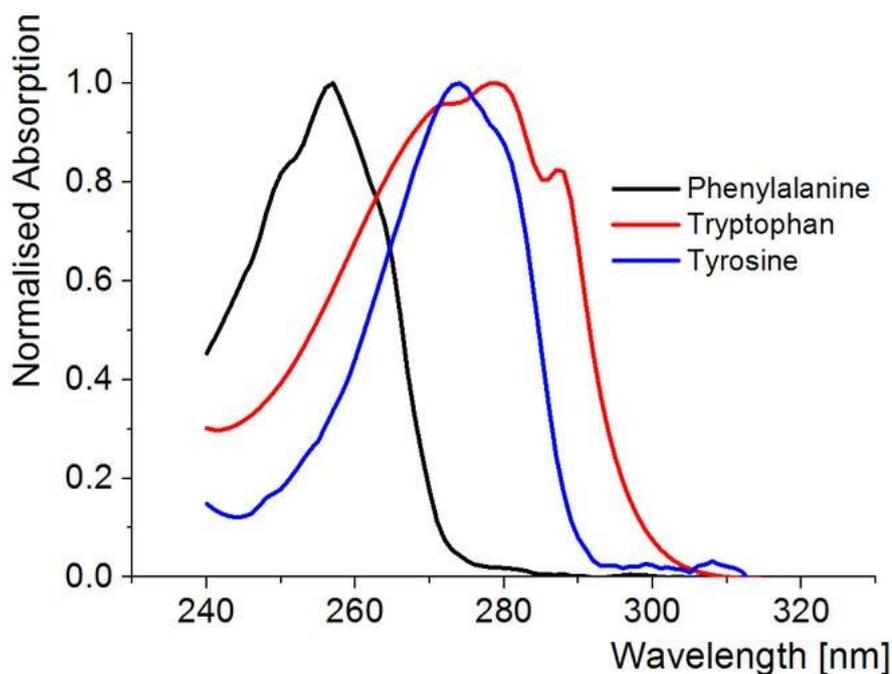


Figura 12: qui vengono rappresentati i valori di assorbanza dei tre aminoacidi aromatici e dei ponti disolfuro della Cistina, correlati ai valori di lunghezza d'onda massima e coefficiente di estinzione molare, tutte informazioni fondamentali per il calcolo dell'Assorbanza additiva delle proteine di analisi. (Russell, 2017)

3.7.1 Nanodrop

Lo strumento Nanodrop (Desjardins & Conklin, 2010) è uno Spettrofotometro con il quale si possono effettuare misurazioni di assorbanza a lunghezze d'onda nell'UV-visibile esattamente come si farebbe con un altro Spettrofotometro, ma con la differenza che qui la quantità di campione misurabile sta nell'ordine dei 2 microlitri.

È un dispositivo molto utile in caso si abbiano scarse quantità di materiale, oppure quando se ne voglia sprecare il meno possibile; un esempio calzante è proprio quello di questo progetto, in cui dopo svariate ore di lavoro ci si ritrova con quantità di proteina nell'ordine dei 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e in cui bisogna far contare ogni piccola quantità per non dover ripartire da capo ogni volta con la sintesi proteica.

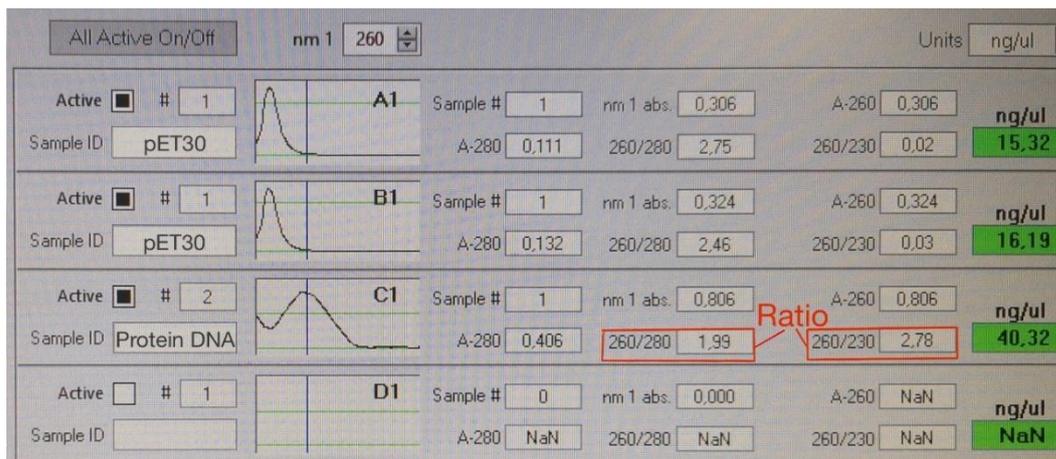


Figura 13: questa analisi al Nanodrop riguarda, nell'ordine: il plasmide non modificato, il plasmide modificato e il DNA che codifica per la proteina. Come è possibile notare, si possono ricavare tutta una serie di informazioni da un unico ciclo di analisi come la concentrazione in soluzione, espressa qui in nanogrammi su microlitri, il Ratio 260/280, che riguarda un rapporto di assorbimento alle due lunghezze d'onda che si utilizza per definire la purezza di una soluzione e il Ratio 260/230, che è un altro rapporto utilizzato allo stesso fine. Secondo letteratura, un buon Ratio 260/280 è intorno a 1,8 e in questo caso ci troviamo sulla soglia di una buona purezza del campione, per lo meno per quanto riguarda il DNA proteico. Un Ratio 260/230, invece, è considerato buono a valori leggermente più alti (2 – 2.2).

3.8 Sonicazione

La sonicazione è uno dei metodi utilizzati per la lisi cellulare (Islam et al., 2017) che prevede di applicare energia sonora (onde) a un campione per eccitare le cellule al suo interno o, come nel nostro caso, per rompere parete e membrana batterica di E. coli per poi poter estrarre solo la componente proteica della miscela.

Lo strumento è costituito da:

- Base per il controllo delle impostazioni di sonicazione, quali l'intensità delle onde, il tempo di applicazione, la temperatura massima di utilizzo e il numero di cicli da applicare. Questa è anche la parte dello strumento che trasforma la normale corrente alternata a 220 Volt e 50 Hz in corrente a 1000 Volt e 20 kHz, quindi nel range degli ultrasuoni.

- Sonda collegata alla base di controllo che viene immersa nel campione e che, oltre a controllare la temperatura, è lo strumento che amplifica le onde sonore; esistono sonde di grandezza e spessore diverso, a seconda delle esigenze.
- Copertura insonorizzata in cui viene posto il campione in cui è immersa la sonda, utile per minimizzare le onde sonore all'esterno; l'operatore, in ogni caso, è fornito di cuffie antirumore.

Per le sperimentazioni di questo studio si sono mantenute sempre le medesime impostazioni per la sonicazione: 5 cicli di applicazione, intervallate da mescolata del campione per risospendere eventuali cellule precipitate sul fondo, con un'intensità impostata al 50% per 10 secondi. Il campione veniva portato all'interno di una Falcon da 50 mL immersa in ghiaccio e acqua per mantenere la temperatura il più bassa possibile, visto che la sonicazione è un processo che produce molto calore e invece il campione proteico è estremamente sensibile ai cambi di temperatura.

3.8.1 Spettrofotometro con Piastre a Pozzetti

Questo tipo particolare di spettrofotometro (Powers et al., 2007) risulta specialmente utile in caso si stia studiando la cinetica di proteine/enzimi. L'operatore è in possesso di una piastra a pozzetti (Microplate) 12x8 in cui si può pipettare un volume massimo di 200 μ L di campione. L'idea è di preparare diversi tipi di reazione, modificando una volta la concentrazione di enzima, un'altra la concentrazione di substrato, un'altra ancora il pH, per poi far avvenire la reazione all'interno dello strumento, che può essere programmato per testare l'assorbanza in un intervallo di lunghezze d'onda e di tempo. Il risultato dell'esperimento è un grafico di assorbanza nel tempo che dà l'idea dell'andamento della reazione, consentendo all'operatore di avere un riscontro su quali siano le concentrazioni migliori di enzima e substrato per ottenere la massima resa.

3.9 Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

La tecnica IMAC è realizzata tramite Fast Protein Liquid Chromatography (Prajapati et al., 2021) ed è un tipo di cromatografia liquida che viene principalmente usata per analizzare, o purificare, miscele proteiche. La purificazione è possibile in quanto le proteine hanno diverse affinità per due componenti fondamentali del cromatografo, la *Fase Mobile* e la *Fase Stazionaria*.

La *Fase Mobile* è un liquido in continuo movimento, mantenuto normalmente a pressione costante e che può variare di composizione durante il ciclo di utilizzo aggiungendo altre soluzioni da differenti cisterne contenitore. La miscela utilizzata è una miscela acquosa e prende il nome di Buffer.

La *Fase Stazionaria* è una resina porosa composta da particelle discrete, normalmente agarosio cross – linkato, impaccata in una colonna cilindrica di vetro, o plastica.

Nel corso di questo studio sono state utilizzati tre diversi tipi di colonna:

- His – trap (His-tag purification column): Colonna da 5 mL costituita da una resina di nichel e agarosio⁷ che è in grado di intrappolare (complessare) il tag di istidina posto sulla proteina oggetto di studio.

⁷ Colonna Nichel – Sepharose™: colonna di istidina brevettata con una forma di Agarosio più Nichel chiamata, appunto Nichel – sepharose.

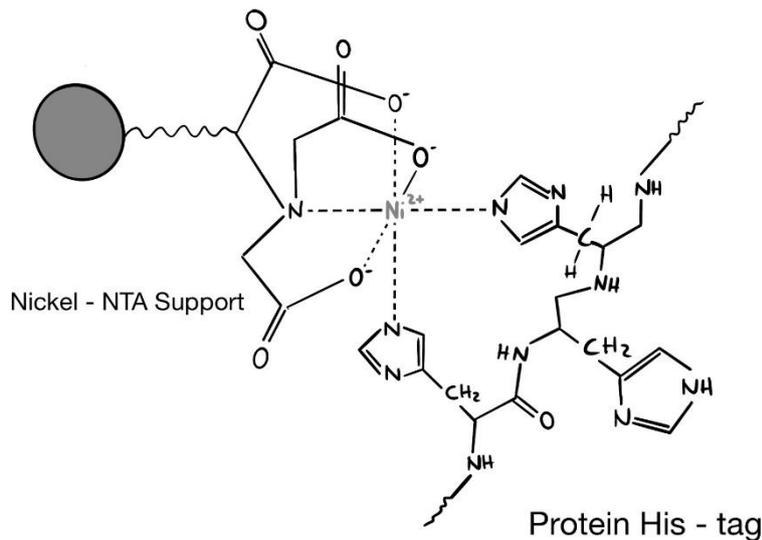


Figura 14: rappresentazione grafica dell'His – tag della proteina legata allo ione di Nichel presente nel Sepharose (nome commerciale per una forma reticolata di perline di Agarosio) (GE Healthcare, 2015) alla colonna His – trap. Maggiori saranno le istidine legate al segmento terminale della catena nucleotidica (di norma 5-6), più forte è il legame con la colonna per FPLC.

- Desalting column: colonna utilizzata per la purificazione di proteine e per desalinizzare l'ambiente in cui esse sono immerse. Sono composte da una resina super fina che intrappola gli ioni e lascia andare le macromolecole.
- Size –Exclusion column: colonna utilizzata per l'analisi e la purificazione di proteine. È composta di particelle porose che lasciano andare molecole di diverso peso molecolare a tempi diversi; le più grandi per prime, perché non vengono intrappolare nei pori della resina, le più piccole per ultime. Attraverso delle rette di taratura si è poi in grado di stabilire il peso molecolare delle molecole passanti in base al tempo di ritenzione.

Lo strumento utilizza principalmente tre buffer propri per funzionare, chiamati per comodità A, B e C e verranno qui di seguito illustrati:

- **Buffer A:** 20 mM Hepes⁸ + 500 mM NaCl; regolato a pH 7,5 con KOH.

⁸ Hepes: 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid. Sostanza organica usata come tampone, soprattutto utile per prevenire cambi di pH in sostanze sottoposte a congelamento, ma non solo. La sua pKa è di 7,55 a 20 °C il che lo rende utile in fase di purificazione all'HPLC, perché lavora ottimamente nel range di pH richiesto dallo strumento e dalle colonne.

È il buffer di equilibratura di tutto il sistema FPLC ed è anche il tampone⁹ in cui rimarrà poi sempre immersa la Pompa A.

- *Buffer B*: 20 mM HEPES + 500 mM NaCl + 500 mM Imidazolo; regolato a pH 7,5 con KOH.

È il tampone in cui verrà immersa la pompa B ed è necessario per competere con l'aderenza della proteina alla colonna His – Trap.

- *Buffer C*: 20 mM HEPES + 150 mM NaCl; regolato a pH 7,5 con KOH.

Tampone utilizzato durante le operazioni di desalinizzazione delle soluzioni contenenti proteine.

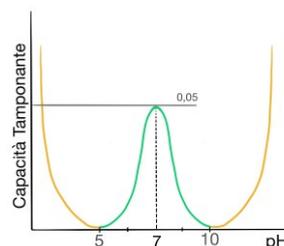
Prima di cominciare con la purificazione vera e propria è bene ricordare che lo strumento e le colonne, soprattutto se non in funzione da un po', vanno dapprima equilibrati molto bene secondo la seguente procedura:

- Lo strumento si trova in EtOH al 20%, solvente che ne mantiene intatte le caratteristiche tecniche quando non in funzione; la prima cosa da fare, quindi, è spostare entrambe le sonde delle pompe in acqua microfiltrata e decantata per non inserire bolle d'aria nello strumento.
- *Pump Wash Purifier* di entrambe le pompe A e B: è un protocollo insito nel software dello strumento che scollega le colonne dal circuito e fa correre 10 mL/min del tampone in cui sono immerse le sonde delle pompe.
- Collegare le colonne His – Trap e Desalting, quest'ultima più a valle del circuito e far passare acqua purificata con un flusso di 3,5 mL/min fino a

⁹ Soluzione Tampone: anche detto buffer, è una soluzione acquosa che consiste nella miscela di un acido debole con la sua base coniugata, o viceversa. La caratteristica di un tampone è quella di essere in grado di mantenere stabili i livelli di pH in un certo intervallo; la sua Buffer Capacity (β) è misurata con le formule seguenti, rispettivamente per l'aggiunta di basi, o di acidi, alla soluzione:

$$\beta = dC_b / d(\text{pH})$$

$$\beta = -dC_a / d(\text{pH})$$



Qui sopra è rappresentato il grafico della capacità di mantenere il pH di un Tampone 0,1 M che possiede $pK_a = 7$.

Come è ben visibile, il massimo nella capacità tamponante si raggiunge quando $\text{pH} = pK_a$.

far passare almeno 5 volumi di colonna di H₂O in entrambe; sono colonne da 5 mL l'una.

- Scollegare la colonna Desalting e spostare le pompe: la A finisce nel Buffer A, la B nel Buffer B contenente Imidazolo. Altro giro di Pump Wash Purifier per entrambe le pompe, poi si ferma la pompa B e si esegue l'equilibratura della colonna con il tampone A con almeno 5 volumi di colonna.

La procedura soprastante va eseguita ad ogni attivazione in quanto lo strumento e le colonne non possono rimanere nei Buffer molto a lungo, a fine giornata si deve comunque mettere nuovamente il tutto in acqua o, se il periodo di inattività risulta superiore alle 12 ore, in etanolo 20%. Dunque, da qui in poi, si può effettivamente procedere alla purificazione proteica come segue.

Si imposta un flusso di 3,5 mL/min della pompa A, con il sistema impostato su *LOAD* (caricamento), si inietta il lisato batterico nel sistema e si continua a lavare con il Buffer A fino a che l'Assorbanza non raggiunge livelli intorno allo 0, quindi si sposta il sistema su *INJECT* (inietta) fino a svuotamento del *Superloop*¹⁰ e si sposta nuovamente su *LOAD*. Dopo qualche minuto comincerà a passare il Soluble Flow Through (residuo solubile) e, volendo, si può raccogliere in provetta nel caso potesse risultare utile durante la fase di controllo con SDS – PAGE.

Si predispone quindi un gradiente da 0 a 50 mM di imidazolo in 10 minuti (0-10% Buffer B in 10 min) gestito dalla Pompa B dello strumento; questo passaggio, chiamato *WASH* (lavaggio) si esegue nel tentativo di liberarsi del cosiddetto aspecifico e cioè di quelle proteine che presentano sequenze di istidine nel loro codice, ma che non siano legate in maniera tanto forte quanto le Lipossigenasi sintetiche, che ne contengono 5 di fila nell'His – Tag. Anche qui si possono raccogliere aliquote da 1,5 mL da utilizzare come controllo.

Superati i 10 minuti si attende che l'indice UV si abbassi il più possibile (circa 0,002) e si procede con un gradiente istantaneo di imidazolo a 250 mM (Buffer B

¹⁰ *Superloop*: è uno strumento utilizzato per l'iniezione di sostanze nel circuito degli FPLC, consiste in un pistone che viene riempito della soluzione da analizzare e che poi è in grado, per differenza di pressione, di rimandarla in circolo facendola passare per le colonne di frazionamento. Non è chiaramente l'unica tecnica di iniezione possibile ma, insieme all'iniezione diretta in colonna di Desalting, è quella che è stata utilizzata a fini della ricerca in discussione.

al 50% in 0 min) prestando attenzione all'innalzamento dell'indice UV, iniziando a raccogliere aliquote da 1 mL quando si è rivelata palese la formazione di un picco di assorbimento; questa fase è definita *ELUTION*, eluizione.

L'ultimo step, in cui si porta il gradiente a 500 mM, quindi al 100 % in tempo zero serve per il lavaggio della colonna, per liberarla dai vari residui prima del riutilizzo.

3.10 High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (HPLC – MS)

Questa tecnica consente di accoppiare due misurazioni all'interno dello stesso esperimento, infatti la cromatografia liquida, come spiegato nel punto precedente, è in grado di separare e purificare piccole molecole, mentre la Spettrometria di Massa è in grado di misurare il rapporto massa su carica (m/z) delle molecole presenti in un campione, analisi utile per sapere precisamente la massa molecolare degli elementi in gioco e la loro abbondanza nel campione.

Uno spettrometro di massa consiste di tre elementi fondamentali:

- *Sorgente di Ionizzazione*: le molecole vengono convertite in ioni in fase gassosa, caricati positivamente, o negativamente, in base alle esigenze; le molecole così trasformate vengono fatte passare per un ugello di 10-15 μm .
- *Analizzatore di Massa*: qui le molecole vengono selezionate e separate in base al loro rapporto m/z . Tale processo è strettamente accoppiato al seguente.
- *Sistema di Rilevazione degli Ioni*: qui i dati sul rapporto massa su carica delle varie molecole viene elaborato e sistemato in uno spettro di massa correlandolo alla relativa abbondanza delle diverse particelle.

Nel corso di questo studio l'HPLC – MS è stato utilizzato per calcolare l'abbondanza dei vari prodotti della reazione catalitica delle lipossigenasi tenendo in considerazione i tempi di catalisi, la diversità dei prodotti e la migliore specificità degli enzimi a un substrato piuttosto che a un altro.

Al fine di avere risultati ancora più precisi, si è adottata anche la tecnica MS-MS, o spettrometria di massa tandem, che è una tecnica di ri-

frammentazione su ioni-frammenti già analizzati. Essa viene utilizzata per esaminare più da vicino i frammenti dell'analisi iniziale in modo da avere dati ancora più precisi sui legami spezzati e sull'effettiva composizione della molecola in esame.

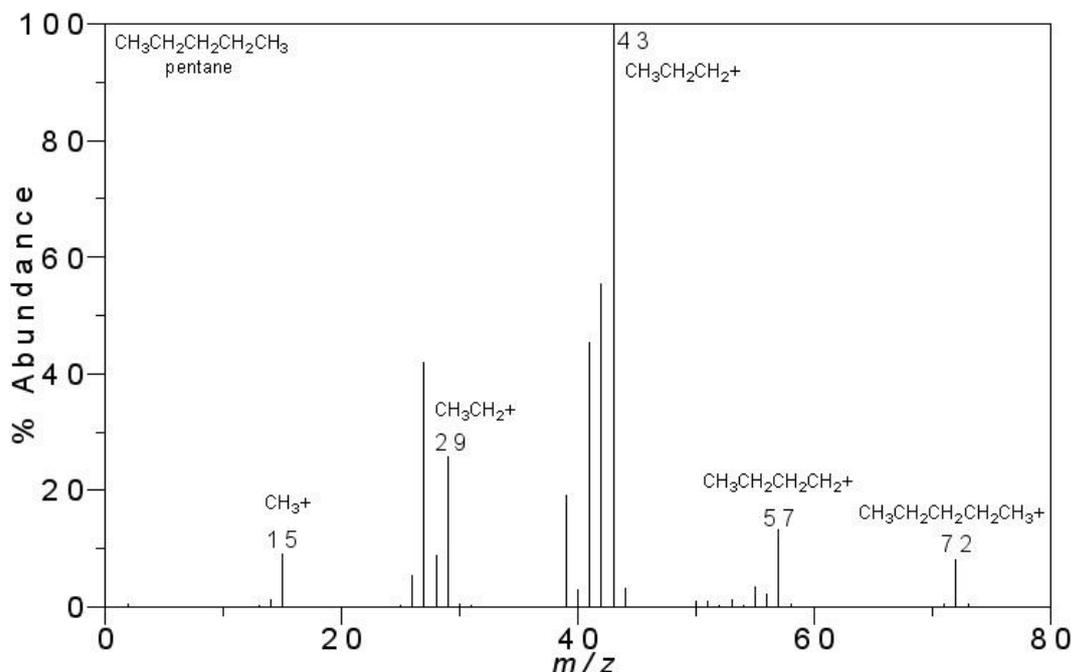


Figura 15: esempio del risultato di un'analisi con HPLC – MS. Come è possibile vedere, in ascissa va il valore di massa su carica dell'elemento che sta passando al dato tempo di ritenzione, mentre in ordinata si pone il valore di Abbondanza percentuale/relativa. Ai fini di questo studio il grafico è stato costruito per individuare quale fosse il prodotto di reazione lipossigenasica preferito dalle due proteine in esame; metodo che, come vedremo in seguito, ha messo le basi per la comprensione di quale sia il doppio legame interessato nella perossidazione di 18:2 e 18:3. (www.chimicamo.org/chimica-analitica/interpretazione-di-uno-spettro-di-massa).

3.11 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

La Risonanza Magnetica Nucleare (Mlynárik, 2017) è una tecnica spettroscopica che consente di osservare il campo magnetico locale intorno al nucleo di un atomo. Tale tecnologia è basata sulla misurazione dell'assorbimento di onde elettromagnetiche nel range delle radiofrequenze, fra i 4 e i 900 MHz. Sono tre gli step fondamentali di questo tipo di analisi:

- Allineamento, o Polarizzazione, degli Spin magnetici nucleari attraverso l'imposizione di un campo magnetico costante detto B_0 .
- La perturbazione di questo campo attraverso degli impulsi di radio – frequenza.
- Rilevazione e analisi delle onde elettromagnetiche emesse dal nucleo del campione come risultato della perturbazione del campo magnetico.

L'NMR è una tecnica che consente l'identificazione di proteine e altre molecole complesse, della loro struttura dinamica, stato reattivo e ambiente chimico. Purtroppo non è uno strumento estremamente sensibile, se non ad alte frequenze, per cui è difficile distinguere le impurezze di un campione.

Per lo studio in questione si è tentato di utilizzare la spettroscopia nucleare magnetica per individuare i prodotti della reazione enzimatica delle lipossigenasi.

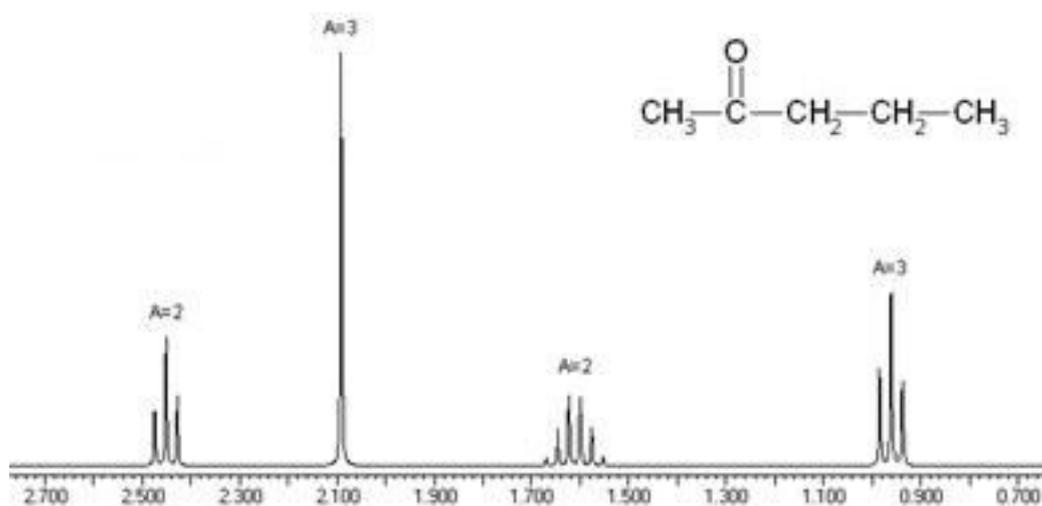


Figura 16: esempio di un grafico NMR. Data la formula bruta di una molecola, è possibile risalire alla sua struttura chimica attraverso la vibrazione dei nuclei che la compongono analizzando le relazioni che ogni nucleo mantiene con il suo intorno magnetico. (Figura presa da: www.pianetachimica.it/NMR/problemi/guida_nmr.htm).

4. RISULTATI

4.1 TECNICHE PER LA PRODUZIONE DI COLONIE DI *ESCHERICHIA COLI* MODIFICATE

In questa prima sezione dei risultati vengono mostrati i dati relativi alla trasformazione di *E. coli* in modo da renderlo in grado di sintetizzare le proteine Lox2 e Lox7.

4.1.1 Utilizzo della PCR e Purificazione

La PCR, come spiegato nel capitolo sulle Metodologie, consente l'amplificazione di patrimonio genetico in maniera esponenziale.

Si preparano 4 soluzioni, una per ogni primer *forward* e *reverse* delle lipossigenasi; in 4 Eppendorf da 1,5 mL si inseriscono 180 μ L di acqua Milli-Q.

Nome sull'etichetta	Milli-Q (μ L)	Primer (Fw-Rev) (μ L)
LOX2 Forward	180	20
LOX2 Reverse	180	20
LOX7 Forward	180	20
LOX7 Reverse	180	20

Tabella 5: dosaggi dei primer per ogni tipologia e per ciascuna Lox. La concentrazione della soluzione preparata è 10 μ M.

A questo punto si preparano 2 Mix Solutions valide per 3 reazioni alla PCR ognuna. Si prepara il corrispettivo per 3 reazioni, nonostante in macchina ne finiscano solo 2, per evitare di dover pescare dal fondo della Eppendorf e di avere quantitativi inferiori.

I primi 4 passaggi per la creazione delle mix sono identici, mentre il 5° passaggio si distingue per i primer inseriti.

Sequenza di Aggiunta		Volum e (μ L)	* 3 Reazioni (μ L)
1	Milli-Q: 17,5	17,7	51,3
2	Phusion Buffer (Soluzione tampone, salina) 5X	6	18
3	dNTPs (miscela nucleotidi per formare nuovi filamenti di DNA)	2,4	7,2
4	Phusion DNA pol (DNA polimerasi di Thermus aquaticus)	0,5	1,5
5a	Primer LOX2 Forward	1,5	4,5
	Primer LOX2 Reverse	1,5	4,5
5b	Primer LOX7 Forward	1,5	4,5
	Primer LOX7 Reverse	1,5	4,5
TOTALE		29,4	87

Tabella 6: lista degli elementi che compongono il campione che viene inserito nel termociclatore per l'amplificazione del codice genetico.

Di queste 4 Mix Solutions si sono trasferiti 29 μ L in 4 Eppendorf da PCR, due per Lox2 e due per Lox7. Due di queste sono diventate soluzioni di controllo negativo per la successiva Elettroforesi, arricchite di 1 μ L di Milli-Q, mentre le altre due sono state aggiunte, rispettivamente, di 1 μ L di cDNA preparato da RNA estratto da foglia di vite.

Stadio	1	2			3		4
N° di Cicli	1	5			30		1
°C	98	98	58	72	98	72	72
Tempo	30''	10''	15''	45''	10''	55''	5'

Tabella 7: impostazioni per i cicli di amplificazione di Lox2. I gradi centigradi evidenziati in rosso indicano il punto in cui tutti i filamenti di DNA risultano singoli (separati), mentre la polimerasi rimane attiva e in grado di copiare. È un punto critico della procedura di amplificazione, in quanto ci si deve trovare nel corretto range perché le due condizioni espresse si verifichino senza intoppi. Per questo motivo è indispensabile utilizzare enzimi termostabili.

Stadio	1	2			3		4
Numero di Cicli	1	5			30		1
°C	98	98	65	72	98	72	72
Tempo	30''	10''	15''	45''	10''	55''	5'

Tabella 8: Impostazione per i cicli di amplificazione di Lox7. Anche qui, il valore in rosso (65 °C) indica la temperatura di appaiamento dei primers, l'annealing, mentre a 98 °C si ha totale denaturazione e separazione dei filamenti di DNA, pur mantenendo la polimerasi termoresistente attiva.

Il Termociclature utilizzato possiede 12 linee di carico per le Eppendorf, divise a due a due e ciò consente di svolgere contemporaneamente PCR con differenze di temperature non superiori ai 10 °C; di conseguenza si è potuto procedere parallelamente all'amplificazione del codice genetico di Lox2 e Lox7.

Un'alternativa all'utilizzo dell'enzima *Phusion Polymerase*, enzima *proof reading* con correzione di bozze, è quella di utilizzare la *Taq polymerase*. Il concetto non cambia, le differenze sono che questo tipo di polimerasi contengono già al loro interno i dNTPs e il Buffer, ma non sono *proof reading*, quindi sono meno precise e sicure. Con la *Taq* polimerasi i dosaggi per la PCR diventano i seguenti:

Sequenza di Aggiunta	Ingredienti	Volume (μL)
1	Milli-Q	19
2a	Primer LOX2 Forward	2
	Primer LOX2 Reverse	2
3b	Primer LOX7 Forward	2
	Primer LOX7 Reverse	2
4	Taq Polymerase mix 2X	25
5	Template	2
	TOTALE	50

Tabella 9: elenco in ordine di aggiunta degli ingredienti per preparare il campione per il Termociclatore, utilizzando una soluzione contenente Taq – polymerase e dNTPs.

Una volta terminato il ciclo alla PCR ci si ritrova con una miscela che va mantenuta in ghiaccio e che contiene il DNA amplificato più tutta una serie di prodotti di scarto, come nucleotidi non utilizzati, sali ed enzima esausto; è quindi opportuno operare una purificazione utilizzando un kit (*High Product Purification Kit*) dal protocollo ben preciso, che segue:

- 500 μ L di *Binding Buffer*¹¹ vengono aggiunti a 100 μ L di prodotto della PCR e ben mescolati assieme.
- Il campione viene inserito in un tubo filtrante e centrifugato per 45 secondi a 13000 G mantenendo la temperatura a 4 °C.
- Si scarta la soluzione che ha superato il filtro e si aggiungono 500 μ L *Washing Buffer*¹² al campione rimanente.
- Si centrifuga per 1 minuto a 13000 G e si scarta ciò che ha superato il filtro.
- Si ripete il lavaggio, questa volta con 200 μ L di *Washing Buffer*, quindi si scarta il filtrato.

¹¹ *Binding Buffer*: 3 M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, 5% ethanol (v/v), pH 6,6 (25 °C).

¹² *Washing Buffer*: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C); questa soluzione arriva così come descritto, sarà premura dell'operatore, la prima volta che la si utilizza, di aggiungerla di EtOH assoluto, in proporzione 1:4.

- Si cambia il tubicino di raccolta con uno nuovo, sterile e si aggiungono 50 μ L di *Elution Buffer*¹³ al campione rimanente. Qui è meglio aspettare almeno un minuto prima di procedere con il passaggio successivo per far sì che il tampone agisca in maniera ottimale.
- Si centrifuga quindi per un minuto alla medesima accelerazione di sempre e si raccoglie il prodotto nella Eppendorf pulita.

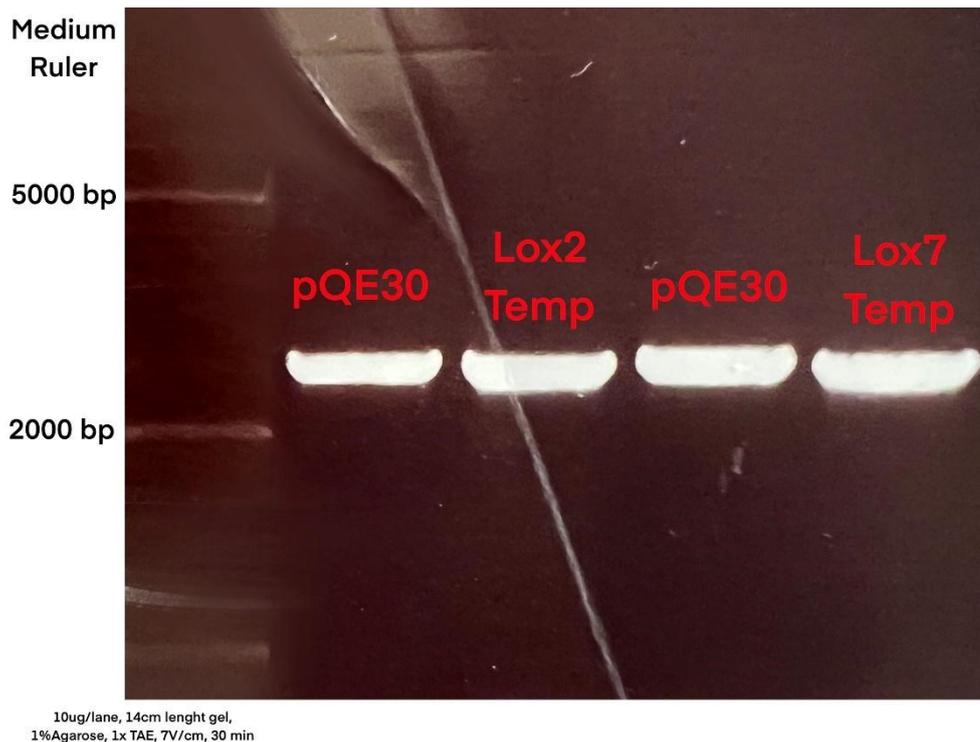


Figura 17: elettroforesi eseguita per il controllo della corretta riuscita della Polymerase Chain Reaction. Come riscontrabile, la corsa del plasmide originale è solo leggermente più corta rispetto ai Templati di DNA delle due proteine, infatti fra le due sequenze di basi c'è solo una differenza di circa 700 bp in favore del plasmide. Altra cosa riscontrabile dalla foto di questo gel è la buona luminosità delle bande, indice che le concentrazioni sono apprezzabili.

¹³ *Elution Buffer*: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (25 °C).

4.1.2 Digestione e Ligazione

Con il prodotto ottenuto dal punto precedente ci si deve dunque preoccupare di rendere compatibili il DNA dell'inserto con quello del plasmide di *E. coli*. Esistono una serie di fasi preparatorie prima di procedere alla ligazione vera e propria e vengono spiegate qui di seguito.

Innanzitutto ci si deve occupare di creare delle *Sticky Ends*, concetto già spiegato nell'introduzione di questa tesi, sia sul DNA inserto, che su quello plasmidico, avendo cura che i tagli risultino compatibili. Kpn e Sall producono effettivamente *Sticky Ends*, mentre SmaI taglia producendo *Blunt Ends*, quindi la ligazione successiva sarà meno precisa, ma comunque soddisfacente. Questo processo è definito *digestione* e si tratta di incubare il DNA da tagliare insieme a degli Enzimi di Restrizione; non tutti gli enzimi a disposizione del laboratorio recavano la dicitura *Fast Digest* (Digestione Rapida), si è quindi proceduto con una digestione durata più di due ore in bagno a 37 °C.

Di seguito le due tabelle con quantità e ingredienti utilizzati nella miscela di digestione, divise per il DNA di LOX2 e di LOX7.

Step	Lipossigenasi-2		Plasmide pQE-30 per Lox-2	
	Componente	Dosaggio (µL)	Componente	Dosaggio (µL)
1	MilliQ	20	Buffer 10x	6
2	Buffer 10x	5	pEQ - 30	48
3	DNA Lox2	20	Kpn	3
4	Kpn	2,5	Sma	3
5	Sma	2,5		

Tabella 10: dosaggi della reazione di digestione per Lox2. L'ordine di aggiunta non è casuale, si consideri infatti che le operazioni vengono fatte in ghiaccio per poi spostare il tutto a 37 °C, ma solo una volta che gli enzimi, piuttosto delicati, vengono aggiunti alla soluzione. Inoltre c'è anche una coerenza di volume, infatti più esso è grande, più si dà priorità all'ingrediente in questione.

Step	Lipossigenasi-7		Plasmide pQE30 per Lox-7	
	Componente	Dosaggio (µL)	Componente	Dosaggio (µL)
1	MilliQ	10	Buffer 10x	6
2	Buffer 10x	5	pQE - 30	48
3	DNA Lox7	2,5	Kpn	3
4	Kpn	2,5	Sall	3
5	Sall	30		

Tabella 11: dosaggi della reazione di digestione per Lox7. Come è possibile notare, è stato aggiunto un volume maggiore della soluzione contenente il DNA proteico perché, da un'indagine elettroforetica precedente, si è notata una concentrazione inferiore in soluzione e si è dunque tentato di compensare.

Una volta completato il processo digestivo si mettono in ghiaccio i prodotti e si attua un secondo processo di taglio solo sui due plasmidi per eliminare il gruppo fosfato dalle due estremità appiccicose appena createsi, con le proporzioni riportate nella seguente tabella.

Step	Componente	Dosaggio (µL)
1	MilliQ	8
2	Buffer N1 ¹⁴	1
3	Enzima N2 (fosfatasi) ¹⁵	1
4	Plasmide tagliato (Lox7 e Lox7)	60

Tabella 12: digestione per eliminare i gruppi fosfato dai filamenti terminali dei plasmidi per Lox2 e Lox7.

Le soluzioni vengono quindi esposte a bagno a 37 °C per 30 minuti; quasi allo scadere del tempo si riscalda il Thermomixer a 75 °C. Le due soluzioni plasmidiche vengono dunque messe nell'agitatore a 300 rpm per 2 minuti con lo scopo di inattivare, denaturandolo, l'enzima fosfatasi. È opportuno, a questo punto, far fare un ciclo di purificazione alle due soluzioni, utilizzando *High Product Purification Kit* come spiegato nel capitolo 4.1.1 di questo testo.

¹⁴ *Buffer N1*: è il tampone del kit Rapid Alkaline Phosphatase ed è composto di dietanolamina.

¹⁵ *Enzima N2*: è l'enzima vero e proprio del kit Rapid Alkaline Phosphatase (Roche). La fosfatasi è una idrolasi che taglia il fosfato terminale del DNA, producendo un fosfato (P₀₄₃-) e un alcol.

Si è ora in possesso di tutti gli elementi per mettere insieme i due plasmidi modificati. Si sono preparate quattro soluzioni, due di effettiva ligazione e due di controllo secondo le indicazioni riportate nella tabella che segue.

Lipossigenasi-2				
<i>Ligazione</i>			<i>Controllo</i>	
Step	Componente	Dosaggio (µL)	Componente	Dosaggio (µL)
1	MilliQ	4,5	MilliQ	14,5
2	Tampone 10x	2	Tampone 10x	2
3	Lox2 Kpn Sma	10	Lox2 Kpn Sma	0
4	pQE-30 Kpn Sma	2,5	pQE-30 Kpn Sma	2,5
5	T4 - Ligasi	1	T4 - Ligasi	1
Lipossigenasi-7				
<i>Ligazione</i>			<i>Controllo</i>	
Step	Componente	Dosaggio (µL)	Componente	Dosaggio (µL)
1	MilliQ	4,5	MilliQ	14,5
2	Tampone 10x	2	Tampone 10x	2
3	Lox7 Kpn Sall	10	Lox7 Kpn Sall	0
4	pQE-30 Kpn Sall	2,5	pQE-30 Kpn Sall	2,5
5	T4 - Ligasi	1	T4 - Ligasi	1

Tabella 13: Proporzioni per le soluzioni delle Reazione di Lox 2 e Lox7 con le relative soluzioni di controllo che torneranno poi utili per la verifica con Elettroforesi.

Alla fine del processo di digestione e ligazione, la miscela è stata dializzata e utilizzata per trasformare delle aliquote congelate di cellule competenti di E. coli e distribuire tali cellule su piastre Petri contenenti terreno LB con Ampicillina 400 mg/mL e Kanamicina 200 mg/mL. Dopo una incubazione notturna di 12 ore (*overnight*) delle piastre a 37 °C, alcune colonie sono state inoculate in LB liquido e utilizzate per estrarre il DNA plasmidico e verificare la presenza dell'inserto. Si è eseguito un doppio taglio enzimatico con enzimi di restrizione scegliendo sulla base della configurazione dei plasmidi modificati, come mostrato nella figura seguente.

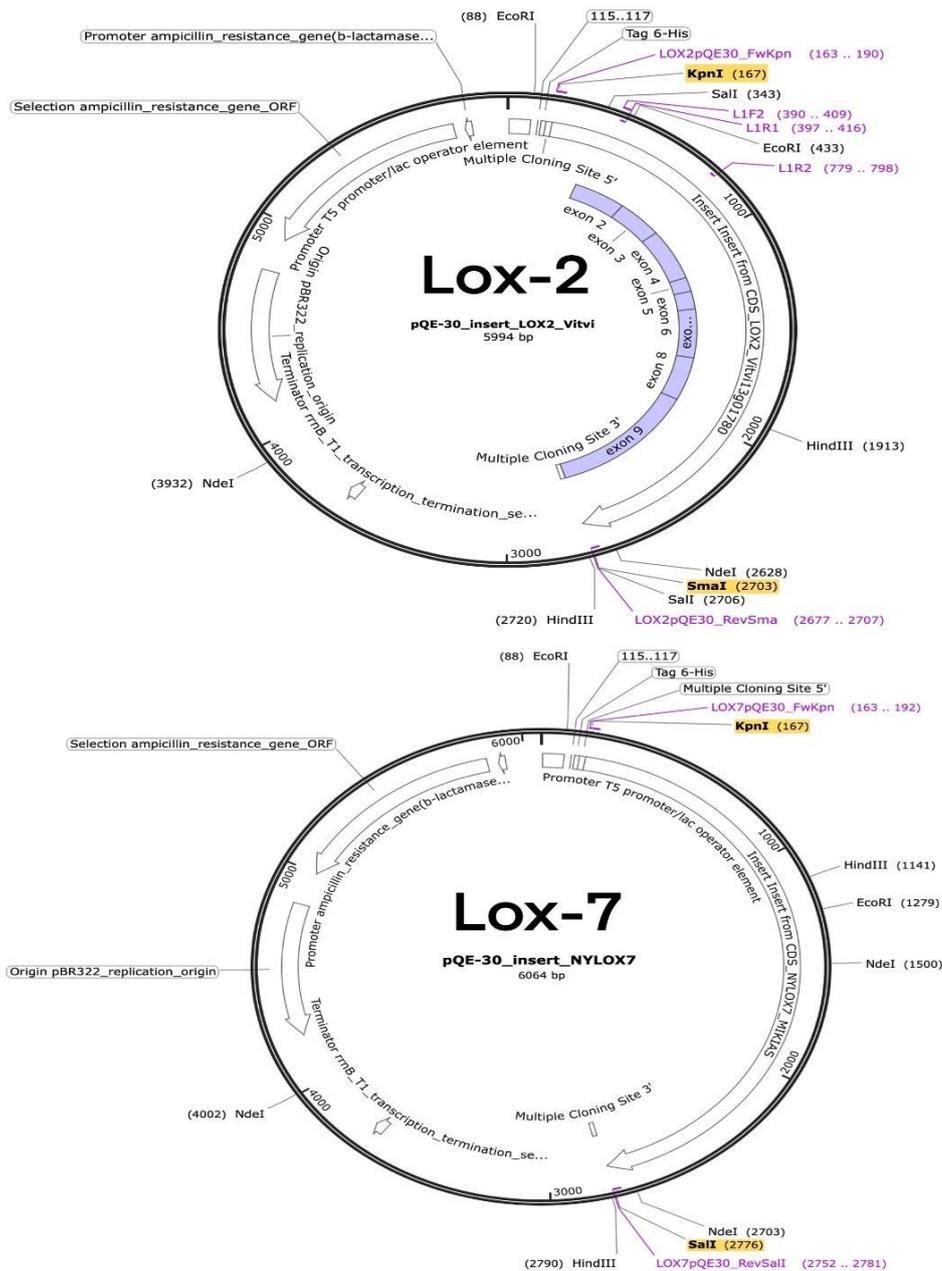


Figura 18: il DNA dei due plasmidi modificati, necessario per decidere le linee guida della digestione di controllo che, in fin dei conti, non è altro che un taglio enzimatico ad opera degli stessi enzimi di restrizione che sono stati utilizzati per produrre Sticky e Blunt Ends sul finale dei due patrimoni genetici che si sono andati a riunire in seguito per ligazione. I motivi di tutto ciò sono principalmente due; il primo risiede nel fatto che entrambi gli enzimi tagliano “una volta sola” il patrimonio genetico e il secondo motivo è che i tagli avvengono dividendo il DNA in due parti quasi uguali e pesanti la metà del plasmide intero, cosa che, in fase analitica, risulta particolarmente comodo. La digestione qui operata è stata fatta utilizzando 0,5 μ L di enzima, 1 μ L di Buffer Fast Green, già fluorescente e comodo per l'elettroforesi, 5 μ L della soluzione di DNA e 3 μ L di acqua bidistillata, il tutto a 37 °C per un'ora.

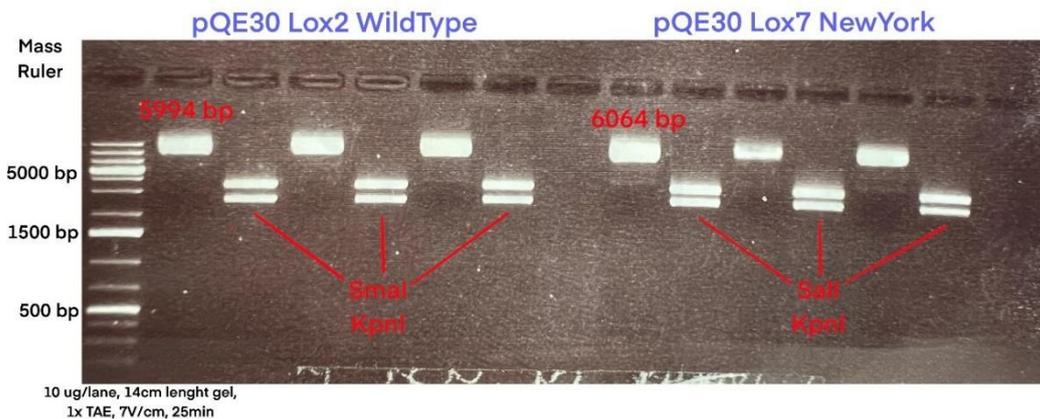


Figura 19: il risultato di questa elettroforesi si è rivelato un ottimo successo, infatti, come è apprezzabile, tutte e tre le repliche per entrambe le lipossigenasi presentano lo stesso esito. Si è effettuato un taglio con due enzimi di restrizione, SmaI e KpnI per Lox2 e Sall e KpnI per Lox7 che si trovano, come spiegato anche nella figura precedente, in posizione strategica per questa analisi: il taglio, infatti, produce due frammenti quasi di pari peso e di dimensioni dimezzate rispetto all'intero plasmide modificato.

4.1.3 Ottimizzazione delle procedure atte a produrre cellule competenti per la trasformazione batterica

Rendere le cellule di *E. coli* competenti significa fare in modo che le cellule batteriche internalizzino nel loro citosol i plasmidi modificati dall'operatore, quelli che provengono dal processo di ligazione poc'anzi spiegato. Affinché il plasmide, una volta entrato nelle cellule batteriche, venga anche replicato e mantenuto nelle cellule figlie, viene dotato di un marcatore di selezione, in questo caso un gene che conferisce resistenza alla kanamicina. L'idea alla base di questo concetto, appunto, è quella di rendere vantaggioso per il batterio la replicazione del plasmide e contro-selezionare le cellule che non lo contengono.

4.1.3.1 Elettroporazione

Prima di poter effettuare l'elettroporazione, è indispensabile liberare la soluzione di quanti più sali possibile per evitare drastiche diminuzioni nell'efficienza del processo. Tale processo prende il nome di *dialisi*, che dà la possibilità di purificare soluzioni per differenza di concentrazione ed è svolto nella

seguinte maniera: si prende una piastra di Petri e la si riempie di acqua bidistillata sulla cui si pone a galleggiare una membrana semipermeabile; dunque si prende il prodotto di reazione di ligazione (10 μ L) e lo si pipetta sulla membrana badando di aver cura di non farla immergere. Una volta passata una mezz'ora si recupera il campione e si passa all'elettroporazione.

Questa tecnica è stata usata su un ceppo di cellule detto 10 – beta competenti, cellule sensibili agli shock elettrici.

5 μ L di soluzione priva di sali vengono disposti in una cuvetta per elettroporazione, la quale presenta due bande metalliche che fungono da conduttori e di altri due lati trasparenti dove verrà posizionato il campione. Si posiziona con cura il campione su un lato della cuvetta (poco volume, l'idea è di farlo attaccare alla parete) e si versano 950 μ L di Brodo di Lisogenia contenente cellule di E. coli. La cuvetta riempita viene posta all'interno del Gene Pulser Xcell e lo strumento rilascia una scossa controllata di 10 – 20 kV/cm per un periodo di circa 300 μ s. Lo shock elettrico così effettuato fa sì che le pareti batteriche, per qualche istante, si riempiano di pori, favorendo l'internalizzazione del DNA plasmidico modificato.

4.1.3.2 Heat Shock

Altra tecnica per rendere le cellule competenti che questa volta consiste in uno shock termico; le cellule utilizzate in questo caso sono state quelle del ceppo che poi ha accompagnato per tutti gli studi successivi, BL21 – Codon Plus (DE3) – RIPL.

50 μ L di cellule immerse in LB vengono unite a 3 μ L di DNA plasmidico modificato e lasciato per almeno 20 minuti in ghiaccio per far aderire bene il plasmide alla parete batterica; il tutto viene quindi posto a 42 °C per 30 secondi. Allo scadere del tempo, si preleva la provetta e la si mette in ghiaccio per 2 minuti, si aggiunge 1 mL di LB e la si dispone per un'ora in miscelatore a 37 °C.

Anche qui, come per l'elettroporazione, si fa sì che le cellule di E. coli si trovino in un ambiente estremamente variabile e sfavorevole e questo stimola aperture nella parete cellulare e l'internalizzazione di nutrienti e sali, ma anche di DNA.

4.1.4 Messa a punto di procedure per la crescita e il controllo delle colonie trasformate

Indipendentemente dalla tecnica che si sceglie per rendere le cellule competenti, il passaggio che segue non varia. Il prodotto viene piastrato su capsula di Petri preventivamente preparata con terreno LB+Agar solido e gli antibiotici adatti: 200 mg/L di Ampicillina più 100 mg/L di Kanamicina per Lox7 e 200 mg/L di Ampicillina più 100 mg/L di Kanamicina per Lox2; la concentrazione di antibiotici, si fa notare ora, è doppia rispetto a quella che viene utilizzata nei brodi di lisogenia (liquidi), come convenzione per la preparazione di LB agar. Il senso di inserire gli antibiotici nella piastra è quello di favorire la crescita delle colonie di *E. coli* che hanno internalizzato i plasmidi modificati e che quindi presentino resistenza per entrambi gli antibiotici. Le piastre sono quindi state poste in forno a 37 °C per tutta la notte (overnight, o/n).

La mattina seguente si prelevano le piastre e si controllano le colonie cresciute.

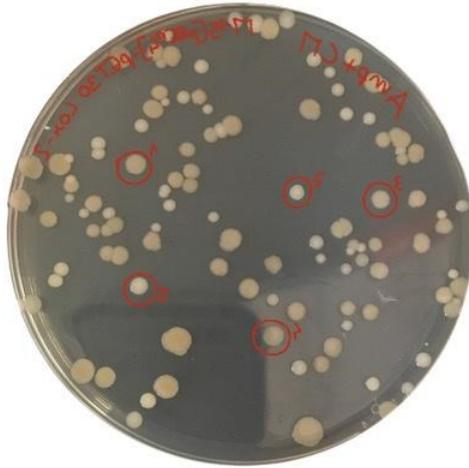


Figura 20: foto di una piastra di Petri a rappresentazione del metodo di elezione delle colonie per le successive sperimentazioni; si prelevano le colonie più omogenee e ben separate per poi farle proliferare e controllare. Il terreno solido di Luria Bertani qui rappresentato è stato così prodotto: per 1 L di LB, aggiunti 10 g di triptone, 5 g di lievito, 10 g di NaCl e 10g di Agar; quindi trasferimento in autoclave, aspettato raffreddamento (circa 40 °C), spostamento sotto cappa sterile, aggiunti gli antibiotici secondo le proporzioni date nel testo soprastante, colata in piastre di Petri e attesa della asciugatura. Infine si sono piastrati 200 μ L di coltura batterica concentrata e si è lasciato in stufa overnight.

Una volta individuate le colonie migliori si deve aver cura di segnalare il numero della colonia e la provetta di arrivo prima di poter passare al prelievo delle colonie scelte, che vengono risospese in 3 mL di LB con Amp 100 mg/mL + CM 50 mg/mL per Lox2 Kan 50 mg/mL per Lox7 in Falcon da 15 mL poi disposte in stufa a 37 °C. Quando la Densità Ottica raggiunge un valore di 0,8 le cellule sono pronte per la successiva fase, cioè la produzione di *Minipreparazioni* secondo il protocollo che segue:

- Le provette contenenti le cellule vengono centrifugate a 11000 g per 10 minuti e il brodo di lisogenia viene eliminato lasciando giù un pellet cellulare.

- Ogni pellet viene risospeso (vortexando, o pipettando) con 200 μ L di Tampone per la risospensione contenente 100 μ g/ml RNase¹⁶ + 50 mM Tris-HCl pH 8.0 e 10 mM EDTA. Si inverte 4 – 6 volte per mescolare.
- Si aggiungono 200 μ L di tampone di lisi composto da NaOH 200 mM e SDS all'1% e si inverte 4 – 6 volte.
- Si aggiungono 200 μ L di HSS¹⁷ per riequilibrare il pH, si mescola e si mette in ghiaccio per 5 minuti
- Si centrifugano i campioni a 11000 G per 10 minuti a 4 °C e si trasferisce il surnatante in Eppendorf da 1,5 mL a cui sono stati aggiunti 600 μ L di isopropanolo per ottenere precipitazione del DNA.
- Si mescola e si centrifuga a 7500 G per 5 min a T_{amb} (Temperatura ambiente), si toglie e butta il surnatante e si aggiunge 1 mL di EtOH 70% per eliminazione dei sali in eccesso.
- Si centrifuga a T_{amb} a 7500 G per 5 minuti e si butta nuovamente il surnatante.
- Si lascia seccare il pellet e si risospende con 50 μ L di Tris 50 mM a pH 7.5, oppure con acqua bidistillata.

¹⁶ RNase: nucleasi deputate all'idrolisi dell'RNA.

¹⁷ High Salt Solution: utilizzata come tampone per riequilibrare il pH di una soluzione.



Figura 21: elettroforesi di controllo delle Minipreparazioni delle colonie 11 e 12 coltivate in piastra di Petri o/n. Si è operata una digestione enzimatica con le seguenti proporzioni: 5 μ L di DNA, 1 μ L di Green Buffer, 1 μ L di enzima (oppure 0,5 + 0,5 μ L se si opera un doppio taglio) e 3 μ L di MilliQ; il tutto a 37 °C per un'ora. Basandosi sul codice genetico del plasmide modificato, si è deciso dove e come operare il taglio aspettandosi un numero di bande per ogni digestione come segue. Per HindIII una banda a 5200 bp più una a 5200 bp, per SmaI una banda a 6000 bp, KpnI una a 6000 bp, SmaI + KpnI una banda a 3500 bp e una a 2600 bp, per EcoRI 5600 bp più 350 bp e per NdeI una a 4700 bp e una a 1300 bp. Si può notare sin da ora che i tagli prodotti sono compatibili con le previsioni fatte, seppur non con una rilevanza del 100% e si è dunque deciso di procedere con le sperimentazioni per poi tornare in un secondo momento sull'editing del DNA, cercando di avere risultati più sostanziosi, come mostrato in Figura 18 in cui sono rappresentati effettivamente i due codici genetici che poi hanno portato alla produzione delle proteine utilizzate per i vari saggi.

Selezionate le colonie buone per Lox2 e per Lox7 ci si appresta a preparare due campioni cellulari che vengono conservati in freezer a -80 °C per le sperimentazioni future. Nello specifico, si prelevano delle aliquote di cellule dalle piastre di Petri avendo accortezza di sceglierle in base ai test appena effettuati e le si risospendono in 200 mL di LB già aggiunto degli antibiotici corretti (Lox2: Amp 100 mg/mL + CM 50 mg/mL e Lox7: Amp 100 mg/mL + Kan 50 mg/mL) avendo cura di lavorare sotto cappa sterile con la massima accuratezza e di sistemare le due soluzioni in Beute precedentemente autoclavate da almeno 1 L che consentano il libero scambio di ossigeno per i batteri. Le beute vengono quindi coperte con della carta stagnola e disposte in incubatore miscelato a 37 °C e controllate varie volte allo spettrofotometro per l'indice di Densità Ottica. Quando l'OD arriva a 0.1 vuol dire che le cellule batteriche hanno raggiunto la fase esponenziale durante la quale raddoppiano il loro numero e la loro Densità

Ottica (OD) una volta ogni 20 minuti. Dopo circa un'ora si arriva a circa 0.8 OD momento in cui si procede con purificazione e conservazione.

I 200 mL di soluzione vengono divisi in 4 Falcon da 50 mL e messi in centrifuga a 4000 G per 15 minuti, passati i quali il surnatante, composto principalmente da LB e antibiotici, viene eliminato. Il precipitato è ripreso con 40 mL di acqua bidistillata e nuovamente centrifugato a 4000 G per 15 minuti. Un nuovo ciclo di purificazione, questa volta riunendo il contenuto in una sola Falcon con 20 mL di acqua. Si centrifuga e si elimina il surnatante, quindi si aggiungono 20 mL di glicerolo al 10% e si centrifuga un'ultima volta, sempre con le medesime impostazioni. Il precipitato viene quindi risospeso con 2 mL di glicerolo al 10%, ottenendo una concentrazione di almeno 3×10^3 cellule/mL.

Si preparano aliquote da 60 μ L che vengono immediatamente congelate in azoto liquido e poi portate in freezer a -80 °C.

Alla fine di queste procedure ci si ritrova con una buona serie di aliquote di cellule modificate, competenti per la produzione delle proteine di nostro interesse, che potranno essere conservate a lungo e che permetteranno agli operatori di lavorare su una aliquota alla volta senza interferire con le altre, rischiando di danneggiarle.

4.2 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLE LOX

In questo capitolo ci si occuperà di spiegare il metodo utilizzato per indurre le cellule batteriche a sintetizzare le proteine di nostro interesse e di come è poi stato possibile purificarle e isolarle per gli studi di attività.

4.2.1 Tecniche di proliferazione batterica e induzione dell'espressione proteica

Dalla fase precedente ci ritroviamo con la possibilità di recuperare le cellule sia dalle aliquote poste in glicerolo a -80 °C, sia dalle piastre di Petri prelevando dalle colonie notoriamente trasformate. Di norma una piastra di Petri è utilizzabile per qualche giorno (non più di una settimana) dopo l'avvenuta

proliferazione, altrimenti le colonie vanno rinfrescate e fatte proliferare o/n per il giorno dopo, mentre la conservazione in glicerolo è estremamente più stabile nel tempo.

Indipendentemente dalla sorgente scelta, per procedere all'induzione, si ha bisogno di volumi cellulari molto più grandi ed è dunque necessaria una proliferazione su larga scala.

Per cominciare si preleva una aliquota di cellule e la si sospende in 5 mL di LB già additivato dai corretti antibiotici alla corretta concentrazione, come esplicitato nel capitolo precedente; la sospensione viene posta in Falcon sterile da 15 mL e sistemata in miscelatore a 37 °C per un tempo non inferiore alle 3 ore. Non tutte le colonie proliferano alla medesima velocità, ma in questa fase non è particolarmente importante, perché l'obiettivo è quello di ottenere una soluzione sovrassatura; non bisogna comunque aspettare troppo per la procedura che segue, in quanto si preferiscono cellule di E. coli che siano ancora nella loro fase esponenziale.

Una volta che l'OD ha raggiunto valori compresi fra 0.6 e 0.8 si possono prendere le soluzioni concentrate e diluirle, sempre sotto cappa sterile, in volumi di 500 mL ognuna, con le giuste quantità di antibiotici, per poi sistemarle in miscelatore a 37 °C. Ora il controllo dell'OD diventa importante, infatti si vuole procedere all'induzione dell'espressione proteica quando il valore è compreso fra 0.4 e 0.8. Intorno a 0.6 si prelevano le beute e le si sistemano tra i 20 e i 25 °C per qualche tempo in modo da raffreddare la soluzione, rallentando la proliferazione, infatti con la fase successiva si stimolano le cellule solo per l'espressione proteica, impedendogli, o almeno rallentandogli la capacità proliferativa.

Passata circa un'ora è importante misurare esattamente la Densità Ottica della soluzione per poter eseguire dei calcoli che servono alle successive indagini con SDS – PAGE. Il senso di questa leggera digressione è quello di avere come campione per la corsa anche un controllo sulle proteine eventualmente in soluzione subito prima dell'induzione, indicato come $t = 0$.

Utilizzando lo spettrofotometro a 280 nm si segnano le OD della colonia Lox2 = 0,618 e di Lox7 = 1,206 e si calcola il volume di SDS da aggiungere secondo la proporzione:

$$OD_{sperimentale}:x = 0,1 OD: 15\mu L$$

Dove X è il volume di LDS Buffer 4x da aggiungere e 15 μ L è il volume di campione totale che verrà fatto correre su gel. Al sodio dodecil solfato si aggiungono 5 mM di DTT e acqua a volume e si pone il tutto a 70 °C per 10 minuti e infine in freezer in attesa di essere analizzata una volta preparati i campioni successivi.

- Volume LDS per Lox2 = 92,7 μ L
- Volume LDS per Lox7 = 180,9 μ L

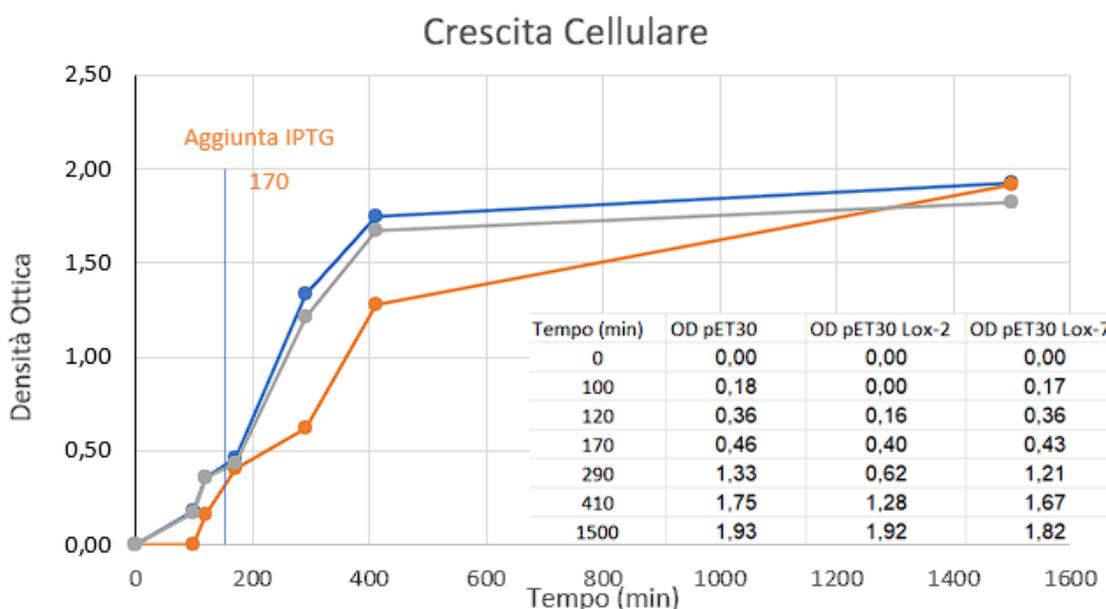


Figura 22: crescita nel tempo effettuata a gennaio 2023 con prelievi e controlli costanti della Densità Ottica. Come visibile le colonie per Lox2 crescono più lentamente, fatto riscontrato ogni volta che si procedeva ad una nuova proliferazione. Di positivo c'è che poi le crescite tendono a stabilizzarsi piuttosto bene, soprattutto per il momento dell'induzione con IPTG.

Completata la preparazione del campione $t = 0$ si può infine passare alla vera e propria induzione aggiungendo alla sospensione cellulare la seguente miscela:

- 2% di EtOH assoluto per stimolazione delle chaperonine¹⁸
- 1mM di IPTG¹⁹ per sblocco dell'operone *lac*
- 50 μ M di $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (solfato ferroso ammonico esaidrato²⁰) per la formazione del centro catalitico; per Lox7, in una fase successiva, si è anche tentato di utilizzare $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in quanto sembra che il centro catalitico possa essere gestito da uno ione manganese, invece che ferro.

Si mescola bene il contenuto agitando la beuta (le condizioni di sterilità dovrebbero ancora essere mantenute per evitare la proliferazione di altri microrganismi che potrebbero rovinare l'esperimento) e si sistema il tutto in incubatore a 20 °C per tutta la notte.

4.2.2 Isolamento del Pellet e Lisi Batterica

La mattina seguente si vanno a recuperare le beute dagli incubatori a 20 °C e si trasferisce il contenuto (500 mL) in 3 tubi da 200 mL e si centrifuga a 5000 G per 15 minuti. Questo ciclo di centrifuga serve a far precipitare le cellule. Una volta recuperato il pellet, si esegue un lavaggio con 50 mL di H₂O bidistillata, riunendo il campione in un unico tubo. Il pellet viene quindi tenuto in ghiaccio e si risospende in 25 ml *Buffer di Lisi* (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM DTT²¹,

¹⁸ *Chaperonine*: sono proteine, chaperons molecolari, implicate nel corretto ripiegamento delle proteine. Vengono qui stimolate soprattutto perché la proteina che vogliamo andare a sintetizzare è di grandi dimensioni e un corretto ripiegamento, come noto, è fondamentale per la corretta azione catalitica.

¹⁹ *IPTG*: isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside. È una molecola che funge da analogo dell'allolattosio e che, quindi, quando si trova in concentrazioni sufficienti (1mM) in una sospensione contenente E. coli, induce il battere allo sblocco dell'operone lac e alla traduzione del codice genetico presente sul plasmide compresa, in questo caso, la proteina di nostro interesse.

²⁰ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: solfato ferroso ammonico esaidrato, o Fe(II) ammonio solfato. È stato inserito all'atto dell'induzione dell'espressione proteica per fornire la miscela di quantità sufficienti di ferro per costituire il centro eme della proteina.

²¹ *DTT*: ditiotreitolo. Un tiolo estremamente solubile in acqua dal caratteristico odore di uova marce che viene utilizzato come riducente; è in grado di rompere i ponti disolfuro di proteine e dei composti organici in generale. Nella lisi batterica viene aggiunto quando si ha a che fare con proteine redox – sensibili.

200 μL di DMSO²² con Inibitori delle Proteasi²³). La sospensione viene trattata con il sonicatore, apparecchio che, come spiegato nel capitolo *Metodologie*, ha lo scopo di rompere le pareti cellulari batteriche e permettere la fuoriuscita del contenuto cellulare, tra cui le proteine.

La sonda del sonicatore viene posta nella soluzione e si operano 5 step di sonicazione di 10 secondi ad una potenza del 50%, invertendo 2 o 3 volte il lisato fra una sonicazione e l'altra. Il lisato viene quindi centrifugato per 30 minuti a 15000 g e si recupera il surnatante. La soluzione è stata quindi equilibrata aggiungendo NaCl per pareggiare la concentrazione del Buffer A delle sperimentazioni all'FPLC, secondo la proporzione seguente:

$$150 \frac{mM}{L} * 0,025 L + 5000 \frac{mM}{L} * x = 5000 mM * 0,025 L$$

*Molarità NaCl nel lisato * Volume lisato + Molarità stock **

** Quantità da aggiungere = Molarità stock * Volume lisato*

Se da questo punto si passasse invece direttamente al Western Blot non sarebbe necessaria l'aggiunta di cloruro di sodio in questo momento.

4.2.3 Purificazione delle Lox2 e Lox7 mediante Cromatografia IMAC

Da questo punto in poi si procede con uno dei tre metodi di purificazione che sono stati utilizzati nel corso della sperimentazione, tenendo conto che

²² *DMSO*: dimetilsolfossido. È un solvente inodore se puro e fresco, aprotico, miscibile in molti solventi, tra cui acqua in qualsiasi proporzione. Viene qui usato per sciogliere le membrane cellulari.

²³ *Inibitori delle Proteasi*: questi enzimi sono direttamente aggiunti nella soluzione di DMSO e sono utili per preservare l'integrità proteica in miscele contenenti lisati cellulari, in cui le proteasi potrebbero aggredire e tagliare le strutture polipeptidiche. Recentemente si è sentito parlare molto degli Inibitori delle Proteasi per contrastare le infezioni virali, essi sono infatti in grado di interrompere la formazione delle vescicole dei virioni, inibendo la capacità replicativa del microorganismo.

certamente la tecnica IMAC è stata quella più utilizzata e quindi meglio ottimizzata.

Alla fine della purificazione lo strumento restituisce un grafico come quello qui sotto riportato e con tutta una serie di aliquote che verranno messe in ghiaccio per essere accuratamente selezionate.

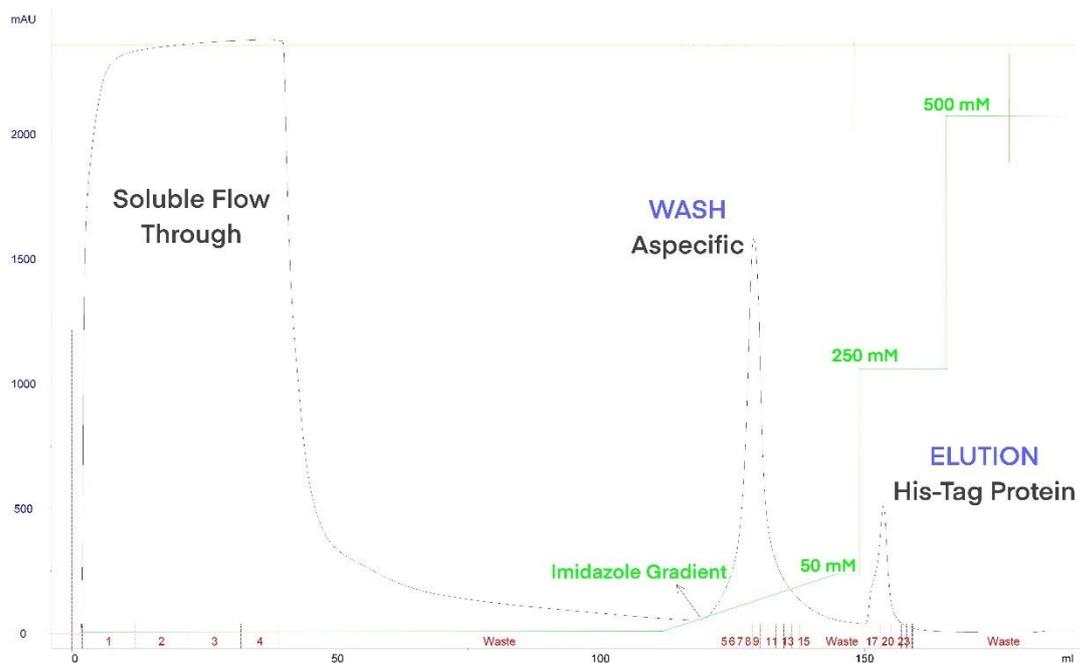


Figura 23: l'immagine mostra il grafico che si ottiene dopo un ciclo di purificazione con FPLC. Si possono chiaramente individuare tutte le fasi salienti della purificazione, come indicato in figura, inoltre è possibile farsi un'idea di quali siano le frazioni migliori da selezionare per l'analisi alla SDS – PAGE che seguirà. Prendendo il grafico ad esempio, le frazioni migliori da selezionare potrebbero essere: la 2 per la parte solubile, la 5 e la 15 per l'inizio e la fine del Wash e la 17, 20 e 23 per l'inizio, il picco e la fine dell'eluizione.

Quando il picco della Lipossigenasi risulta tanto soddisfacente, si può passare direttamente al seguente step di purificazione, cioè quella dei sali grazie a 5-mL His-Trap™ FF Desalting Column, riunendo le frazioni da 21 a 31. La purificazione dei sali viene fatta equilibrando il sistema con il Buffer C attraverso un Pump Wash e poi impostando un flusso di 5 mL/min. una volta che lo strumento, la colonna e le pompe sono equilibrate, si inserisce il purificato della His – Trap direttamente nella Desalting Column e velocemente si raccoglie il picco che va a formarsi.

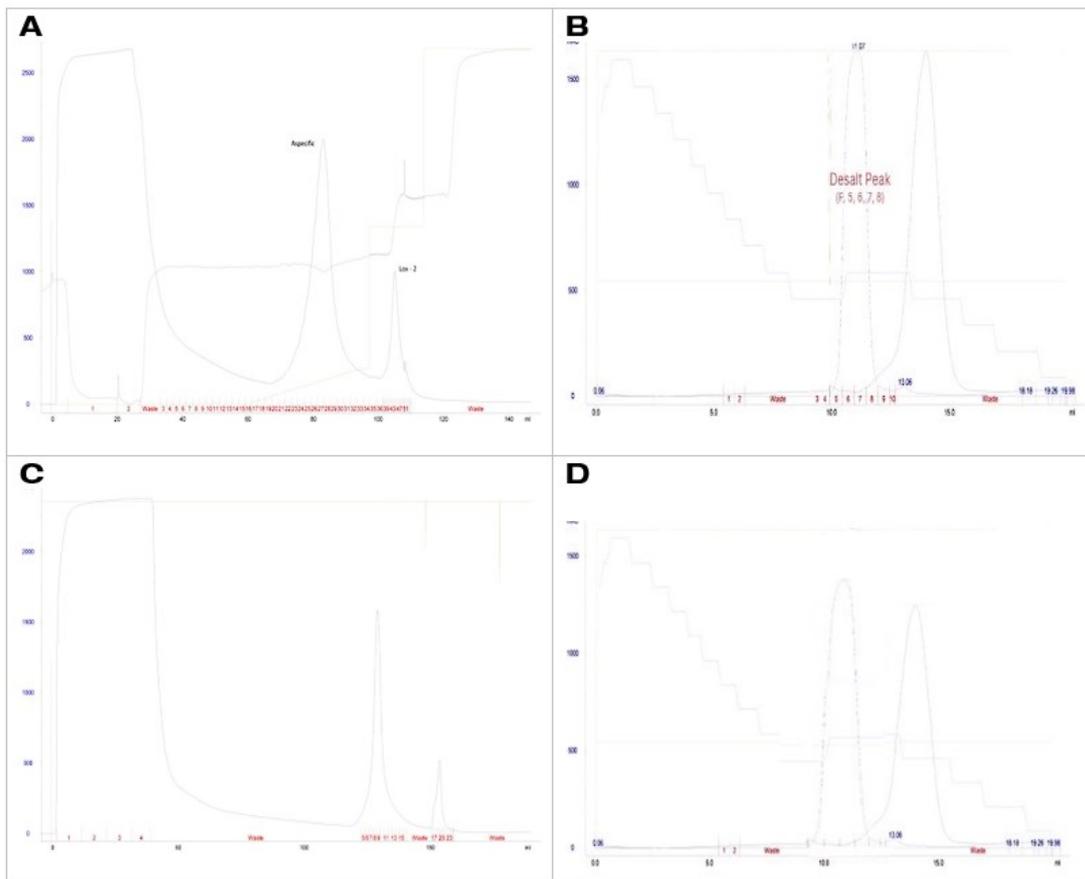
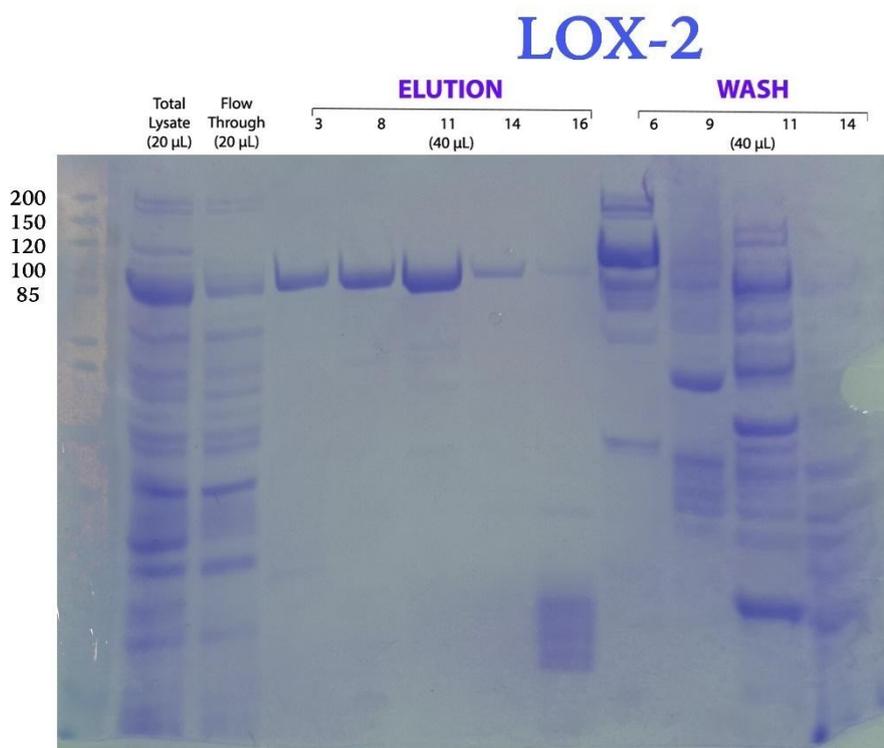


Figura 24: in figura sono rappresentati i grafici restituiti dallo strumento FLPC AKTA Purifier in seguito alle colonne a trappola di Istidina e dopo le colonne di Desalting. In ordine osserviamo (A) La His – Trap di Lox2, (B) La Desalting di Lox2, (C) La His – Trap di Lox7, e (D) La Desalting di Lox7. Due cose sono facilmente visibili; primo, la purificazione di Lox – 2 abbia dato risultati migliori e secondo, entrambe le purificazioni presentano una banda di proteine specifiche decisamente più intensa rispetto che a quella delle proteine di ricerca; ciò è dovuto, probabilmente, a una scarsa efficienza dell’Histidine – Tag.

Ottenute le frazioni di proteine arriva dunque il momento per una fase di controllo con SDS – PAGE. Si inizia preparando il Mix per la SDS e le frazioni scelte per la corsa sul gel. Il Mix LDS per 2 mL è così composto: 1 mL Buffer 4x + 10 µL DTT + 990 µL MilliQ.

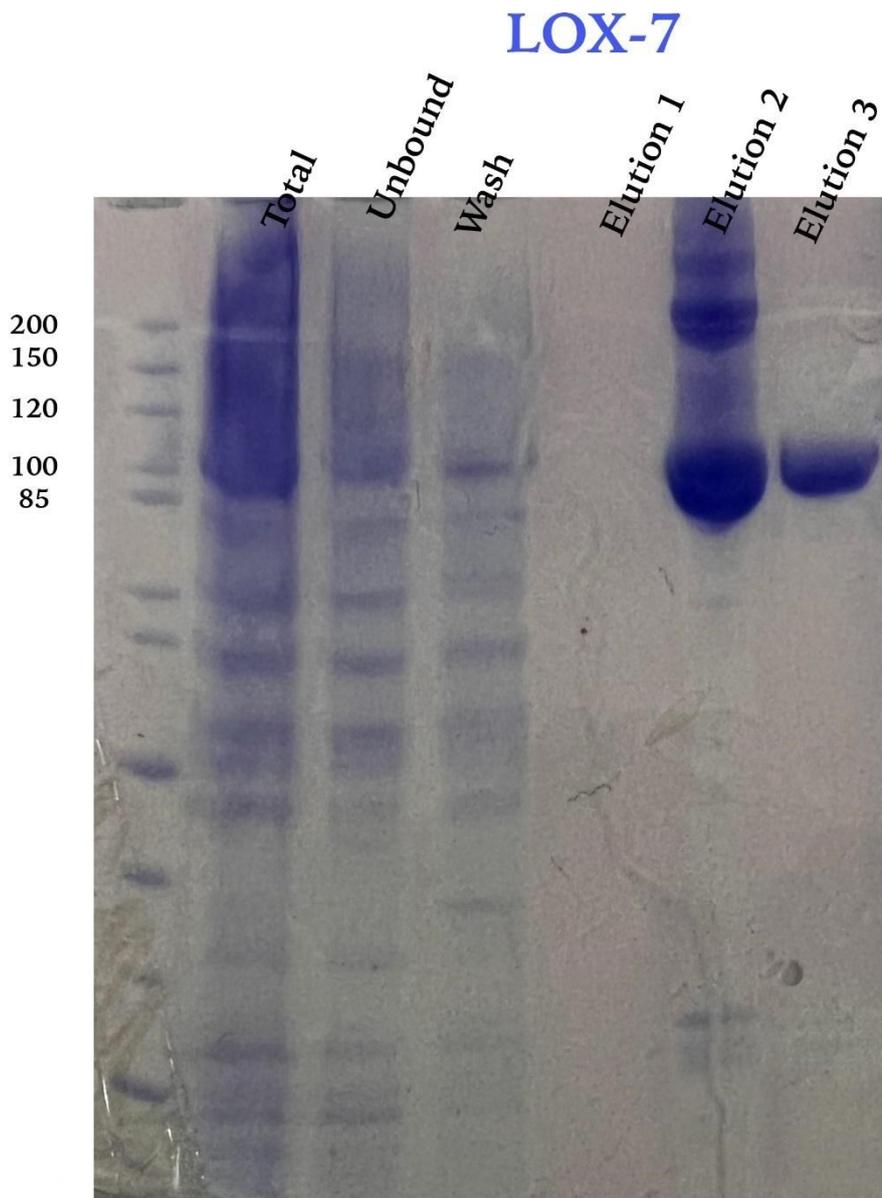
Si prelevano quindi 15 µL delle frazioni da analizzare (10 µL per i lisati totali e il solubile perché sicuramente molto più concentrati) e le si immergono in 5 µL di mix LDS; la soluzione ottenuta viene immediatamente posta a 70 °C miscelati per 10 minuti e lasciata infine raffreddare a temperatura ambiente. Si

monta lo strumento per l'elettroforesi immergendo un gel allo 8% da 12 pozzetti in Running Buffer Bolt® 1 x e si fa partire la corsa a 120 V, per circa un'ora, finché la linea del Buffer non ha raggiunto la fine del gel.



20/40 µL/lane, 8x10 cm gel,
Tris, glicina, SDS, 120 V, 1 ora.

Figura 25: profilo di purificazione di Lox2. Nel gel si sono fatti correre i prelievi dei diversi step della purificazione. Il Total Lysate (Lisato Totale) rappresenta la soluzione proteica dopo la fase di lisi batterica al sonicatore, il Flow Through (non legato) rappresenta la frazione che non interagisce con la colonna e viene immediatamente defluito. Il Wash (lavaggio) rappresenta la parte aspecifica della purificazione, è quell'ammasso proteico che presenta sequenze di Istidine, ma non tante quante la proteina di interesse e che si lega parzialmente alla colonna, ma che viene lavato a concentrazioni di imidazolo anche piuttosto basse (50 mM). La parte di Elution rappresenta il distacco e la raccolta della proteina studiata, che avviene al 50 % del gradiente imidazolico. Come è possibile notare la fase di Lavaggio è piuttosto pulita e le bande principalmente intense sono nella fascia 100 – 85 kDa, più spostata verso i 100, come ci si aspetta (Lox2 pesa intorno ai 97 kDa). La concentrazione finale di Lox2 è stata di 2 mg/mL.



40 uL/lane, 8x10 cm gel, Tris,
glicina, SDS, 120 V, 1 ora.

Figura 26: profilo di purificazione di Lox7. Anche qui nella fase di eluizione vediamo delle bande molto intense sulla fascia dei 100 kDa (Lox7 pesa 100 kDa) con particolare enfasi proprio sulla punta e verso la fine del picco, per scomparire quasi del tutto all'inizio del picco; ciò potrebbe significare una buona adesione del His – Tag al nichel della colonna. La concentrazione finale di Lox7 è stata di 0,8 mg/mL.

Le differenze che si riscontrano fra i due gel sono dovute all'esposizione delle foto, al tempo passato fra la fine della corsa e lo scatto e al meccanismo di colorazione del gel, che può variare, anche se di poco, di volta in volta; per questo un confronto diretto fra le due corse non ha molto senso.

Una volta controllato il gel si può stabilire quali siano le frazioni che contengono la proteina in maggiore quantità e in forma più purificata, quindi si decide di riunirle e di concentrarle. Le proteine non possono stare in una soluzione troppo diluita perché ciò ne compromette la stabilità ai processi di congelamento e scongelamento; si vuole arrivare almeno a una concentrazione di 1 mg/mL. Al Nanodrop si controlla la concentrazione attuale della soluzione proteica e si calcola il volume di tampone da eliminare per arrivare alla concentrazione desiderata; per fare ciò si utilizzano dei tubi Millipore per concentrazione da 10 kDa e li si sottopone a cicli di centrifuga da 5000 g per 10 – 15 minuti. Una volta conclusa l'operazione ci si ritrova con circa 200 µL di soluzione concentrata, che viene divisa in aliquote da 30 µL e sistemata in freezer a -80 °C.

La concentrazione finale di Lox2 ottenuta è stata di 2 mg/mL, quella di Lox7 è stata di 0,8 mg/mL, effettivamente un po' bassina, ma è stato il risultato di svariati processi di concentrazione e continuare su quella strada avrebbe probabilmente significato perdita di materiale e anche di qualità dello stesso.

4.2.3.1 Colonna Size Exclusion

Per Size Exclusion si intende quella tecnica cromatografica per cui si è in grado di separare macromolecole in base alla loro Massa Molecolare. Per far ciò si è disposto di un AKTA FPLC Purifier e di una colonna SEC per Size Exclusion. Il Buffer utilizzato è così composto: *Hepes* 20 mM + NaCl 150 mM a pH 7.5, filtrato e degasato. Nel nostro caso l'esperimento è stato effettuato per controllare la Massa Molecolare della Lipossigenasi-2 e dunque tutta questa parte della dissertazione si rivolge a questo esempio specifico.

La prima operazione è stata quella di tarare l'analisi utilizzando un mix noto di proteine così composto:

PROTEINE	MM (kDa)	Volume Campione (µL)	Volume Eluizione (mL)	log(MM)
Aprotinin (10 mg)	6500	15	16.8	3,81
Ribonuclease A (50 mg)	13700	15	15.25	4,13
Carbonic anhydrase (15 mg)	29000	15	13,93	4,46
Ovalbumin (50 mg)	43000	20	12,67	4,63
Conalbumin (50 mg)	75000	15	12,4	4,87
Lox2 Monomero	129000	100	11,43	5,11
Aldolase (50 mg)	158000	20	11,15	5,19
Lox2 Dimero	254000	100	10,27	5,4
Ferritin (15 mg)	440000	5	9,63	5,64

Tabella 14: dati del grafico di Taratura per la colonna di Separazione delle Masse Molecolari. I dati relativi alla Lipossigenasi non fanno chiaramente parte della retta di taratura, sono anzi il risultato dell'esperimento, ma sono stati qui inseriti per chiarezza d'insieme.

Il Buffer è stato fatto passare lungo la colonna con un flusso di 0.5 mL/min per un totale di circa 30 mL. Come risultato si è ottenuto il seguente grafico:

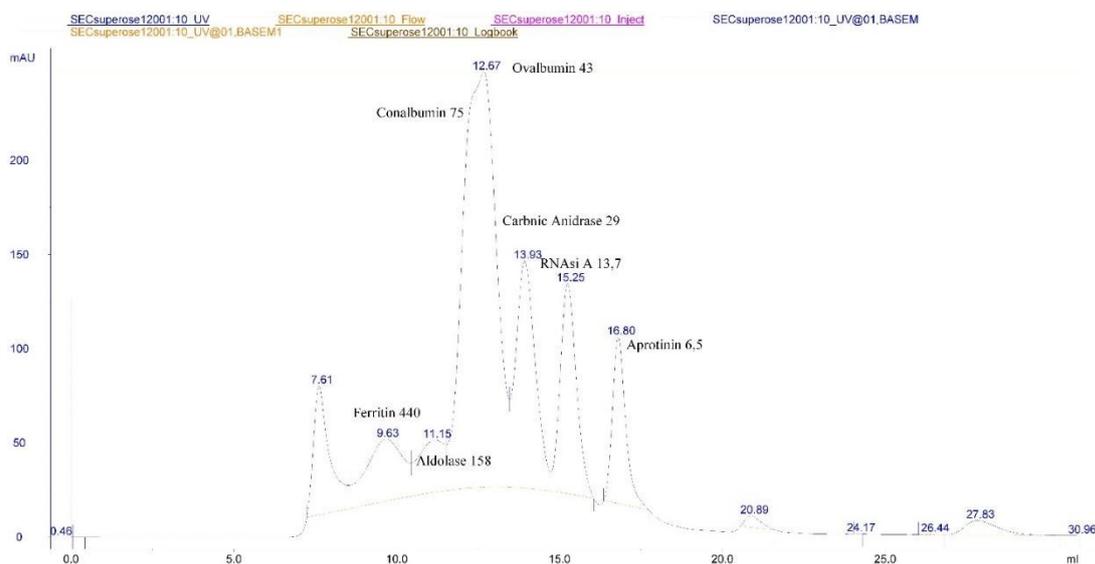


Figura 27: grafico della corsa di taratura per la colonna Size Exclusion, con evidenziati i picchi di Eluizione delle proteine a Massa Molecolare e Concentrazione note.

Come ci si aspetta, le molecole grandi escono a volumi di eluizione più piccoli e poi via via le molecole con Massa Molecolare inferiore.

A questo punto, mantenendo il flusso e il Buffer costanti, si fa passare la soluzione contenente la proteina purificata, ottenendo il seguente grafico:

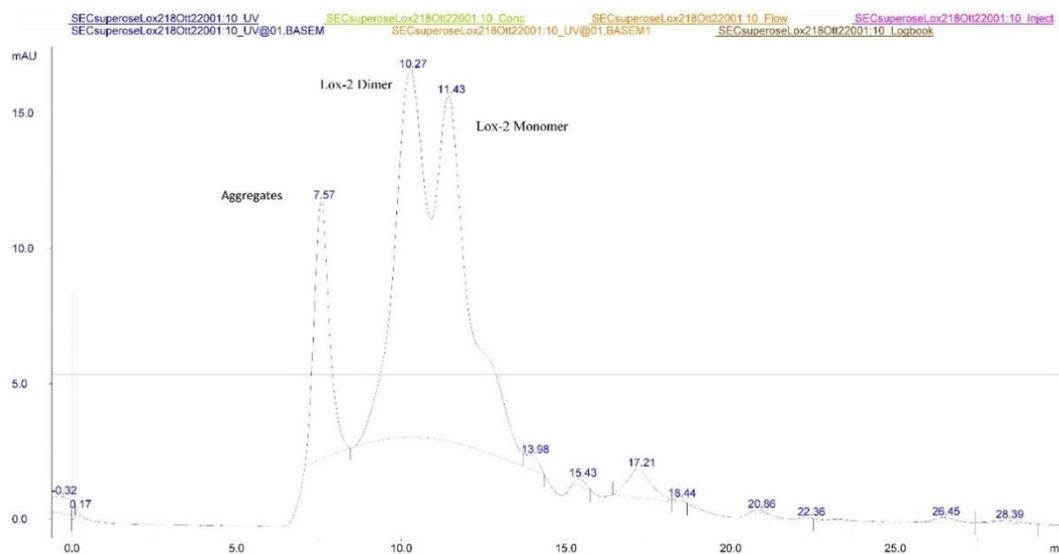


Figura 28: grafico della corsa con la soluzione contenente il concentrato di Lipossigenasi 2. L'enzima in questione sembra possedere due strutture predominanti, una monomerica e una dimerica.

Si è riscontrato in maniera chiara che Lox2 presenta una forma monomerica e una dimerica e ciò ha lasciato dei dubbi su quale delle due forme risulti poi effettivamente attiva; alla ricerca di ciò si è preparata una seconda corsa di Size Exclusion utilizzando un Buffer a forza ionica molto più alta (la concentrazione di NaCl è stata alzata a 500 mM dai 150 precedenti) nel tentativo di stabilizzare la forma attiva della proteina. Purtroppo tale esperimento non ha prodotto nessun risultato degno di nota e i grafici di eluizione sono risultati del tutto paragonabili, motivo per cui l'immagine non è mostrata.

Una volta ottenuto il grafico della proteina in esame, si possono mettere assieme i dati delle due corse per ottenere il seguente grafico che correla il volume di eluizione, cioè il momento in cui la proteina viene rilasciata dalla colonna e raggiunge il rivelatore, con il logaritmo della sua MM, definendone

dunque la caratteristica e permettendone la purificazione nelle eventuali corse successive.

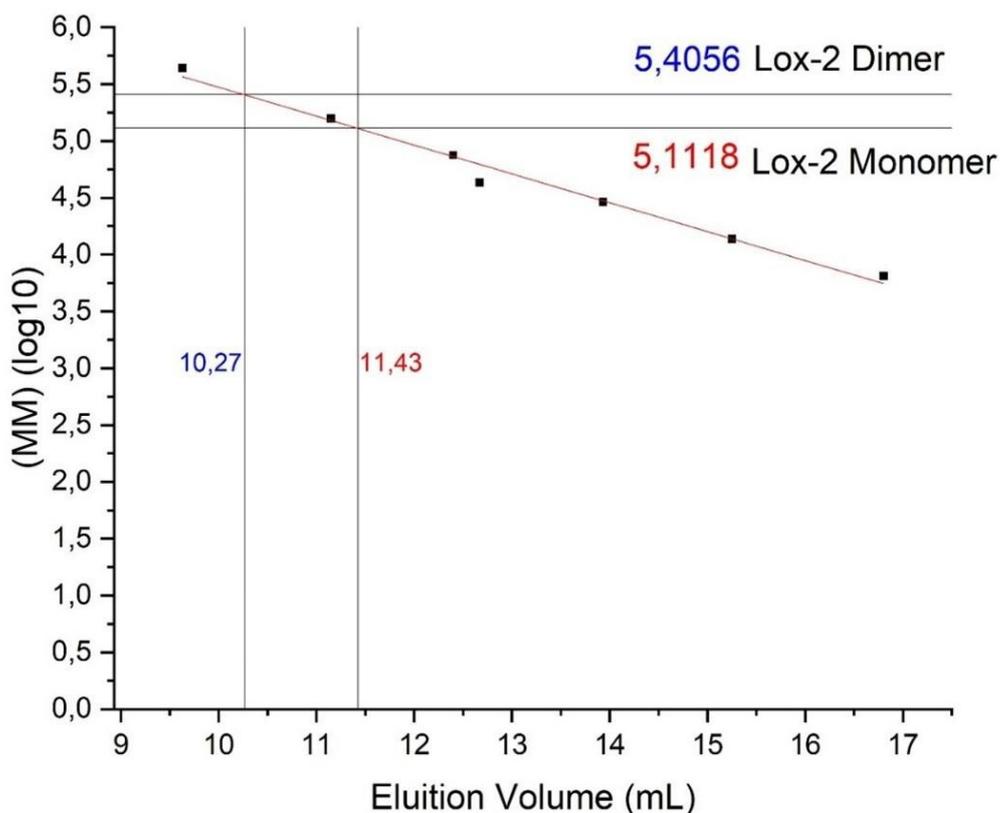


Figura 29: grafico della retta di taratura con la disposizione della proteina e la possibilità di calcolo dell'effettiva Massa Molecolare di ciò che si sta osservando. Risolvendo i calcoli si trova che la MM del monomero è di 129 kDa e quella del dimero di 254 kDa, valori che si discostano da quelli delle previsioni di 97 kDa, ma ciò non è considerato un errore troppo grande, perché potrebbe essere dovuto a una serie di variabili su cui si ha poco controllo, come ad esempio la qualità e età della colonna, la pulizia dello strumento, la qualità della miscela proteica nota, la temperatura e il pH, quindi si prende per buono l'esperimento.

PROTEINE	MM (kDa)	Volume Campione (μ L)	Volume Eluizione (mL)	log(MM)
Aprotinin (10 mg)	6500	15	16.8	3,81
Ribonuclease A (50 mg)	13700	15	15.25	4,13
Carbonic anhydrase (15 mg)	29000	15	13,93	4,46
Ovalbumin (50 mg)	43000	20	12,67	4,63
Impurity	47863	100	13,13	4,68
Conalbumin (50 mg)	75000	15	12,4	4,87
Lox7 Monomero	10002 3	100	11,85	5
Aldolase (50 mg)	15800 0	20	11,15	5,19
Lox7 Dimer?	23988 3	100	10,36	5,38
Ferritin (15 mg)	44000 0	5	9,63	5,64

Tabella 15: volumi di eluizione per la corsa di Lox7. Anche qui, come per Lox2, i dati della taratura e dell'esito dell'esperimento sono stati raggruppati per chiarezza d'insieme.

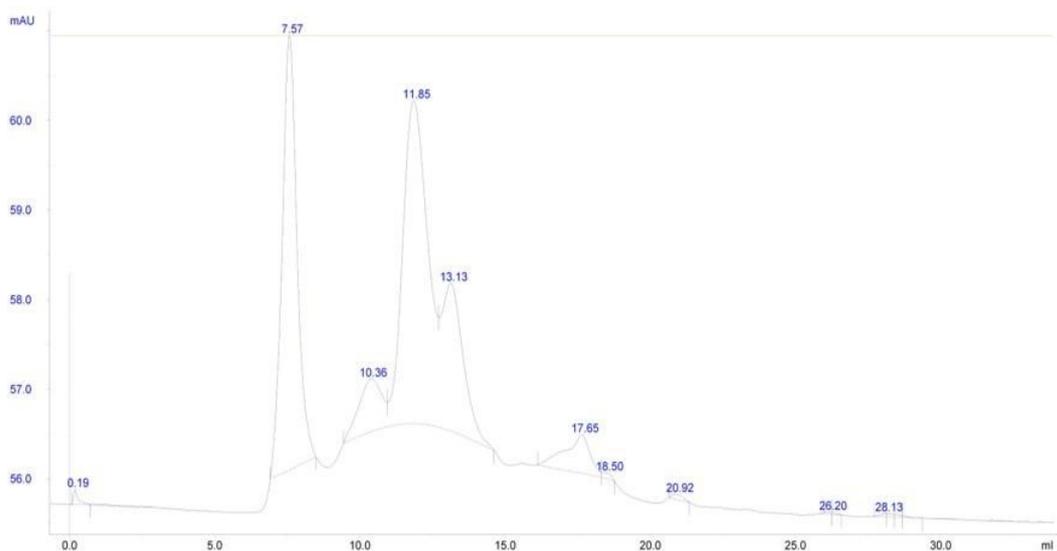


Figura 30: grafico della corsa in colonna Size Exclusion della soluzione concentrata di Lox7. Come è subito identificabile, questa corsa è risultata più sporca di quella effettuata con Lox2, infatti la molecola che eluisce a 13.13 mL è stata identificata come impurezza, mentre è poco chiaro se a 10.36 mL abbia eluito il dimerico della proteina, oppure qualche altra impurità.

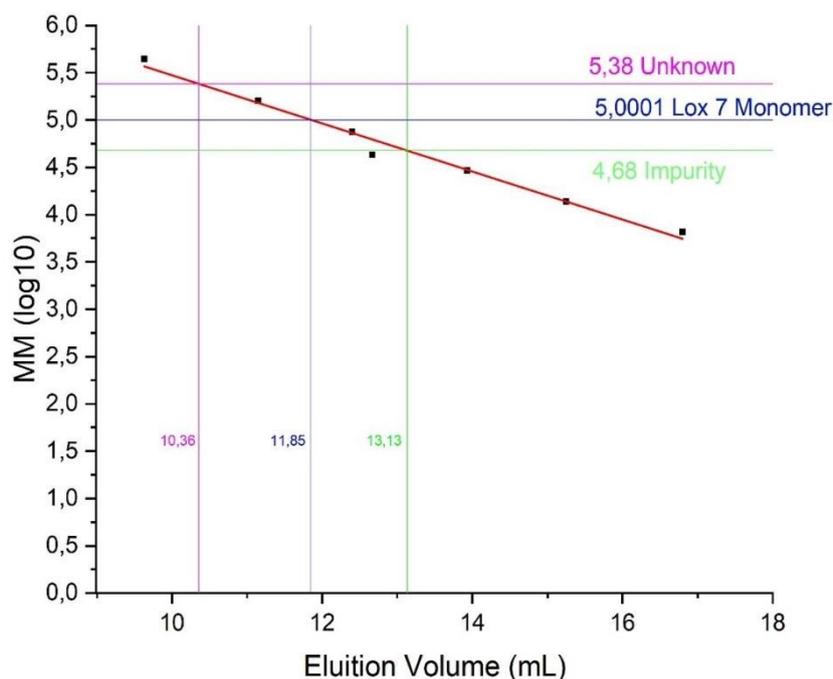


Figura 31: retta di taratura della corsa in cui sono stati inseriti i volumi di Eluizione del campione in esame. È lo schema di calcolo che consente di risalire ai risultati spiegati nell'immagine e nella tabella precedenti.

4.2.3.2 Spettrofotometro e Western Blot

Lo spettrofotometro utilizzato in fase di rilevazione è stato principalmente Nanodrop che, come spiegato nella sezione Materiali e Metodi, è in grado di rilevare la concentrazione di una molecola in soluzione con quantità di 1 – 3 μL . lo strumento viene tarato con il buffer in cui è immersa la proteina, oppure con acqua bidistillata, che ha la stessa limpidezza a 280 nm, la lunghezza d'onda che viene impostata per la rilevazione proteica.

La Western Blot è più una tecnica di rilevazione, che di purificazione, ma è inserita in questo capitoletto in quanto consente di identificare precisamente la posizione su gel (di poliacrilammide) della proteina in esame e quindi di procedere con precisione ad un'estrazione da gel in un momento successivo.

Il *blotting* è tecnica biochimica che permette di separare proteine specifiche da una miscela di proteine non nota attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici ed è divisa in una serie di fasi consequenziali che bisogna seguire passo passo.

- Produzione di un gel SDS – PAGE da una miscela proteica contenente la proteina in esame.
- Trasferimento delle proteine su una membrana di Nitrocellulosa, o PVDF²⁴ attraverso un meccanismo di *electroblotting*.
- Prevenzione delle interazioni della membrana con altre proteine attraverso l'aggiunta, sulla membrana, di una soluzione al 1 – 3% di BSA²⁵ in TBS – T²⁶ con una bassa percentuale di detergente come il Tween 20²⁷; tale soluzione va a legarsi in tutte quelle zone dove le proteine non hanno interagito con la membrana, evitando legami aspecifici.
- Aggiunta dell'anticorpo primario Anti – Lox e incubazione o/n sotto lenta agitazione, nella soluzione descritta precedentemente.
- Risciacquo della membrana con acqua purificata per eliminare l'anticorpo primario non legato.
- Aggiunta dell'anticorpo secondario Anti – topo che si lega all'anticorpo primario e che ha la funzione di amplificare il segnale in fase di analisi, infatti diversi anticorpi secondari si legano ad un singolo anticorpo primario.
- Rilevazione a chemiluminescenza, che permette di poggiare la membrana su uno scanner e di visualizzare le bande dove la proteina di interesse si è esattamente legata.

²⁴ *PVDF*: polivinilidenefluoruro. Polimero ad alta resistenza chimica ad acidi e ossidanti, ultravioletta e alle temperature, utilizzato in questo caso per la produzione di membrane per l'impressione di proteine nella tecnica di Western Blot.

²⁵ *BSA*: Bovine Serum Albumin. Tampone di blocco ideale per saturare i siti di legame proteico sulle membrane di blocco.

²⁶ *TBS – T*: Tris Buffered Saline Tween 20. Buffer di saturazione dei legami proteici per membrane di blocco.

²⁷ *Tween 20*: polisorbato 20. È un tensioattivo non ionico a pH neutro, un detergente molto solubile in acqua. All'interno di questo studio è stato utilizzato soprattutto per mantenere in soluzione i substrati delle proteine, i due acidi grassi 18:2 e 18:3 in quanto le reazioni vengono eseguite in ambiente acquoso e gli acidi grassi tendono a separarsi e ad andare in sospensione. La sua *Concentrazione Micellare Critica* (CMC) è di 60 – 70 µM.

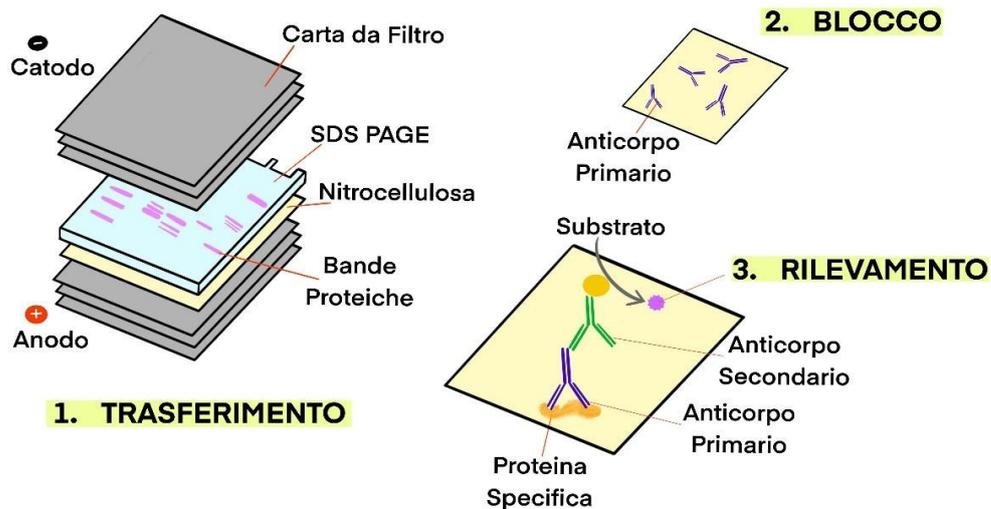


Figura 32: rappresentazione schematica delle fasi principali del Western Blot. Nella prima fase le proteine migrano dal gel alla membrana di nitrocellulosa, allontanandosi dal catodo. Nella seconda fase è rappresentata la soluzione tampone con detergente BSA e, successivamente, l'anticorpo primario. Una fase di lavaggio precede la terza fase che consiste nell'aggiunta dell'anticorpo secondario e nella successiva rivelazione a chemiluminescenza delle proteine legate.

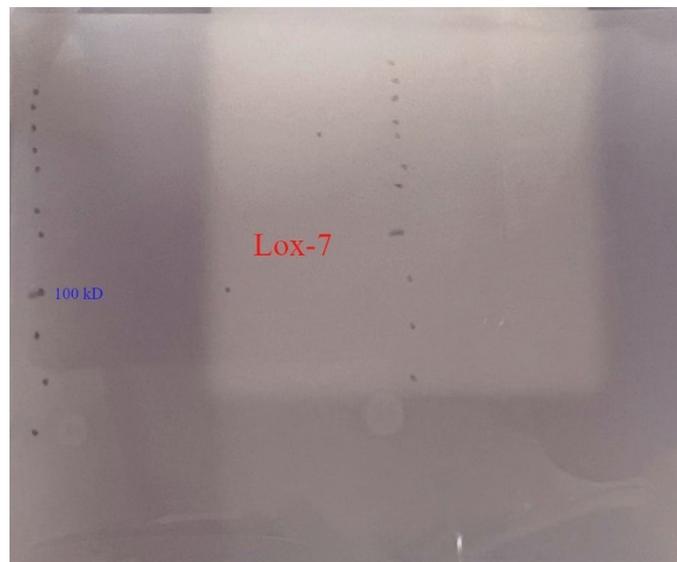


Figura 32bis: Western Blot eseguito su Lox7 ed analizzato per confermarne l'effettiva presenza nella soluzione proteica passata alla SDS PAGE. Il puntino evidenziato intorno ai 100 kD rappresenta la posizione della banda analizzata in chemiluminescenza. Ciò dà un buon margine di sicurezza sull'effettiva riuscita dell'espressione proteica.

4.3 ANALISI DELL'ATTIVITÀ CATALITICA.

Una volta ottenute buone quantità di proteina purificata si può passare ai test di attività che serviranno alla caratterizzazione delle qualità principali delle proteine in oggetto, come il range di pH in cui l'attività catalitica è migliore e, collegato a questo, il tampone nel quale la reazione dà i risultati migliori, la ricerca del substrato preferito degli enzimi scegliendo fra acido linoleico e linolenico, due degli acidi grassi maggiormente metabolizzati a livello delle cellule vegetali e il risultato delle trasformazioni dei substrati in prodotto, per osservare quali siano generati in maggiore abbondanza.

4.3.1 Determinazione del pH ottimale

La struttura e la funzionalità delle proteine sono influenzate dal pH e la maggior parte di esse, come le Lipossigenasi, opera in un range di pH preferito. Il pH delle piante, come quello dei mammiferi, varia a seconda del distretto che si sta osservando. Come regola generale però, si considerano valori compresi fra 6.5 e 7.5 per il citosol e valori più acidi, anche tra 5.5 e 6.0 per l'ambiente extracellulare e il vacuolo. Le proteine che si stanno osservando ci si aspetta operino in questi ambienti mediamente poco acidi.

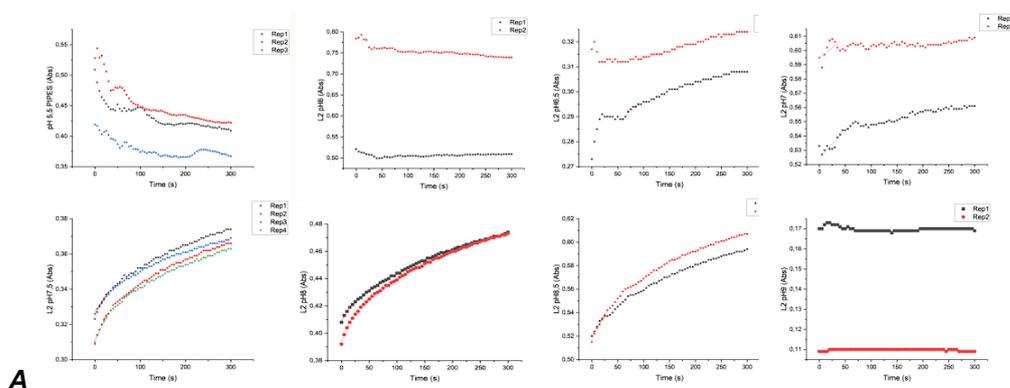
Per costruirsi un grafico di attività (Capel-Cuevas et al., 2012) si prepara una soluzione con la proteina, il buffer ad un certo pH e il substrato e si fa andare la reazione mentre uno spettrofotometro, il Synergy UV – VIS misura la variazione di assorbanza della soluzione nel tempo. L'esito di queste sperimentazioni produce soprattutto delle curve Gaussiane (anche dette Bell – Shaped, a Campana), oppure delle curve che risiedono in grafici la cui ascissa è composta dai valori di pH, mentre l'ordinata dal valore di velocità iniziale, calcolata sulla base di una reazione enzimatica di questo tipo:



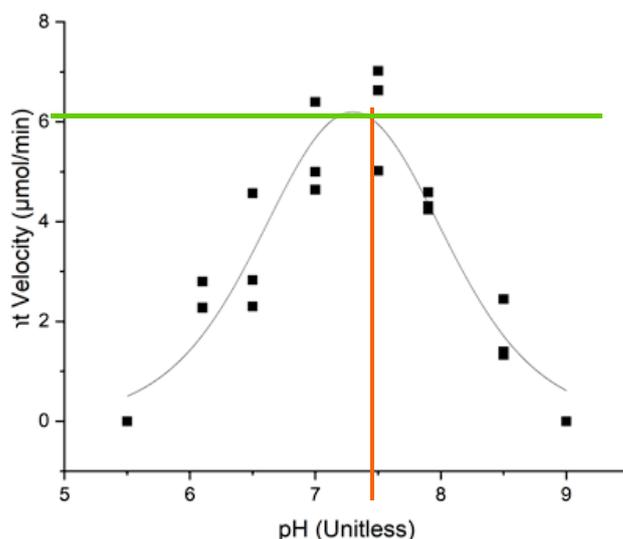
dove *E* è l'enzima, *S* il substrato, *ES* il complesso Enzima Substrato, *P* il prodotto e *k1* e *k2* sono rispettivamente la velocità di formazione di *ES* e la velocità di

separazione del complesso con formazione di prodotti. La *Velocità Istantanea* è dunque uguale a:

$$v_0 = k_2 [E - S]$$



A



B

Figura 33: test di attività di *Lox2* al variare del pH. È stato utilizzato PIPES²⁸ 0,1 M con pH crescenti da 5,5 fino a 9, Tween20 50 μM, leggermente sotto la CMC, come substrato 100 μM, e enzima 5 μM. Per ogni pH si sono eseguite due ripetizioni) nelle quali lo strumento eseguiva misurazioni a 234 nm ogni 5 secondi per 5 minuti di reazione totali.

²⁸ PIPES: piperazin-1,4-bis(acido-2-etansolfonato). Tampone con una pKa di 6,8 a 20 °C buono a pH acidi o debolmente basici. Nelle sperimentazioni sul range di pH viene utilizzato per range anche più lunghi verso il basico per il semplice motivo che non si necessita di misurazioni eccessivamente precise e, inoltre, gli esperimenti vengono eseguiti con tampone sempre fresco, quindi molto efficace.

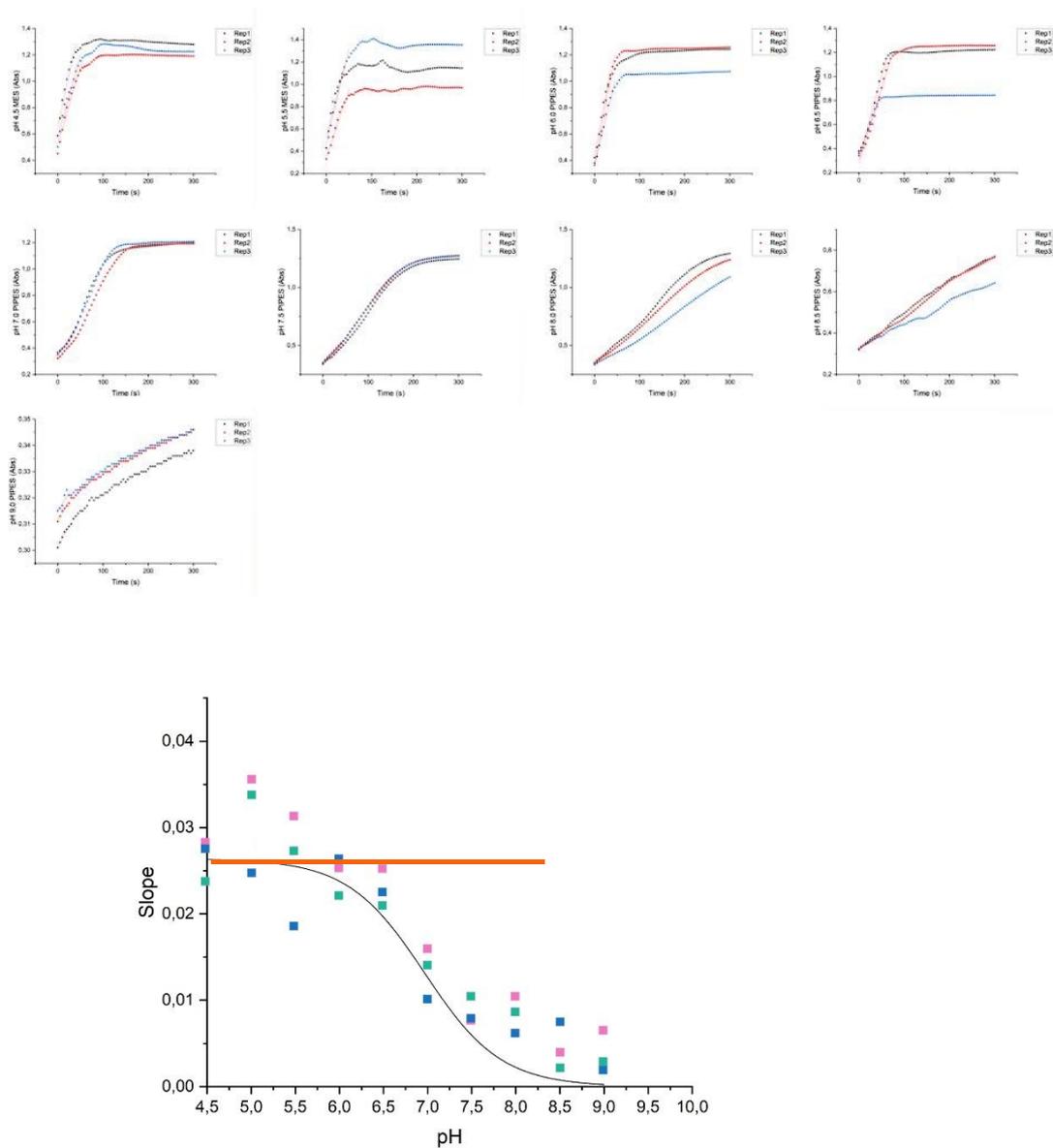


Figura 34: esattamente come è stato fatto per la lipossigenasi precedente, anche per Lox7 si è cercato di misurare il picco di attività enzimatica in base al pH. È stato utilizzato Tween20 50 μM , acido linolenico a 100 μM e enzima 50 μM con misurazioni ogni 5 secondi per 5 minuti a 234 nm. In questo caso i pH 4.5 – 5 e 5.5 sono stati coperti con il Tampone MES²⁹ 0.1 M, mentre da pH 6.0 al 9.0 è stato utilizzato PIPES 0,1 M.

È già facilmente visibile come l'efficienza aumenti significativamente a pH 7.5 per poi calare lentamente a pH 8.0 e 8.5 fino a crollare del tutto a pH 9.0, i un

²⁹ MES: Acido 2-(N-morfolino) etansolfonico: tampone ottimo a pH acidi, possiede pKa 6.16. È stato utilizzato per la ricerca del pH ideale negli esperimenti su Lipossigenasi 7.

grafico a campana con il metodo spiegato poc'anzi. Il risultato è stato che si è stabilito che il massimo di attività si raggiunge a circa $\text{pH} = 7.4$ con un range di tolleranza di ± 0.5 .

In questo caso l'enzima sembra funzionare a pH ben più acidi dell'altra isoforma, per poi perdere attività piuttosto repentinamente una volta in ambiente basico; secondo la Figura 34 A si sarebbe dovuto optare per reazioni catalitiche a $\text{pH} 4.5 - 5.0$, ma si è comunque scelto di operare a pH leggermente più alti ($\text{pH} = 6.0$) perché il profilo di attività delle tre repliche ha un aspetto più coerente e perché difficilmente si trovano ambienti così estremi nelle cellule eucariotiche.

4.3.2 Determinazione dell'Efficienza Catalitica di Lox2 e Lox7

Una volta individuato il pH si può passare ad indagare su quali altre siano le condizioni di reazione in cui l'attività catalitica è più efficiente e, nello specifico, in questa fase si mette l'attenzione sull'individuare quale sia il giusto rapporto di concentrazione fra proteina e substrato, quale sia la miglior Molarità del Buffer (anche se soluzioni molto diluite sono di norma preferite), se ci sia o meno bisogno di detergente in soluzione e, se sì, quale sia la concentrazione migliore da aggiungere. Lo strumento che si utilizza è, come per le indagini sul pH , lo spettrofotometro UV – VIS Synergy impostato per misurare l'assorbanza dei prodotti a 234 nm ogni 5 – 7 secondi.

Inoltre per la catalisi di acido linoleico e linolenico, da parte di entrambe le proteine, si è indagato sulla formazione dei prodotti, che sono acidi idrossieicosatetranoici (HETEs), anche se in questa fase della ricerca è ancora impossibile dire con precisione di quale specifica specie ossidata si tratti.

4.3.2.1 Effetto di concentrazioni crescenti di substrato sull'attività di Lox2

Una volta determinati tampone e pH ottimali per l'attività di Lox2, ovvero, PIPES 0,1 M a pH = 7,5, si è dunque passati ai saggi di concentrazione variando il dosaggio del substrato, in questo caso acido linolenico e mantenendo stabili le quantità di detergente e di enzima e cioè 50 μ M Tween 20 e 0.02 μ g/ μ L Lox2 partendo da uno stock a 2 mg/mL. Le concentrazioni di substrato scelte sono state 0 – 10 – 25 – 50 – 75 – 100 μ M. Per ognuna di esse sono state eseguite 3 repliche.

Dal grafico di Assorbanza si sono ricavate le curve di attività, da cui sono state estrapolate le velocità istantanee alle diverse concentrazioni, come qui di seguito mostrato:

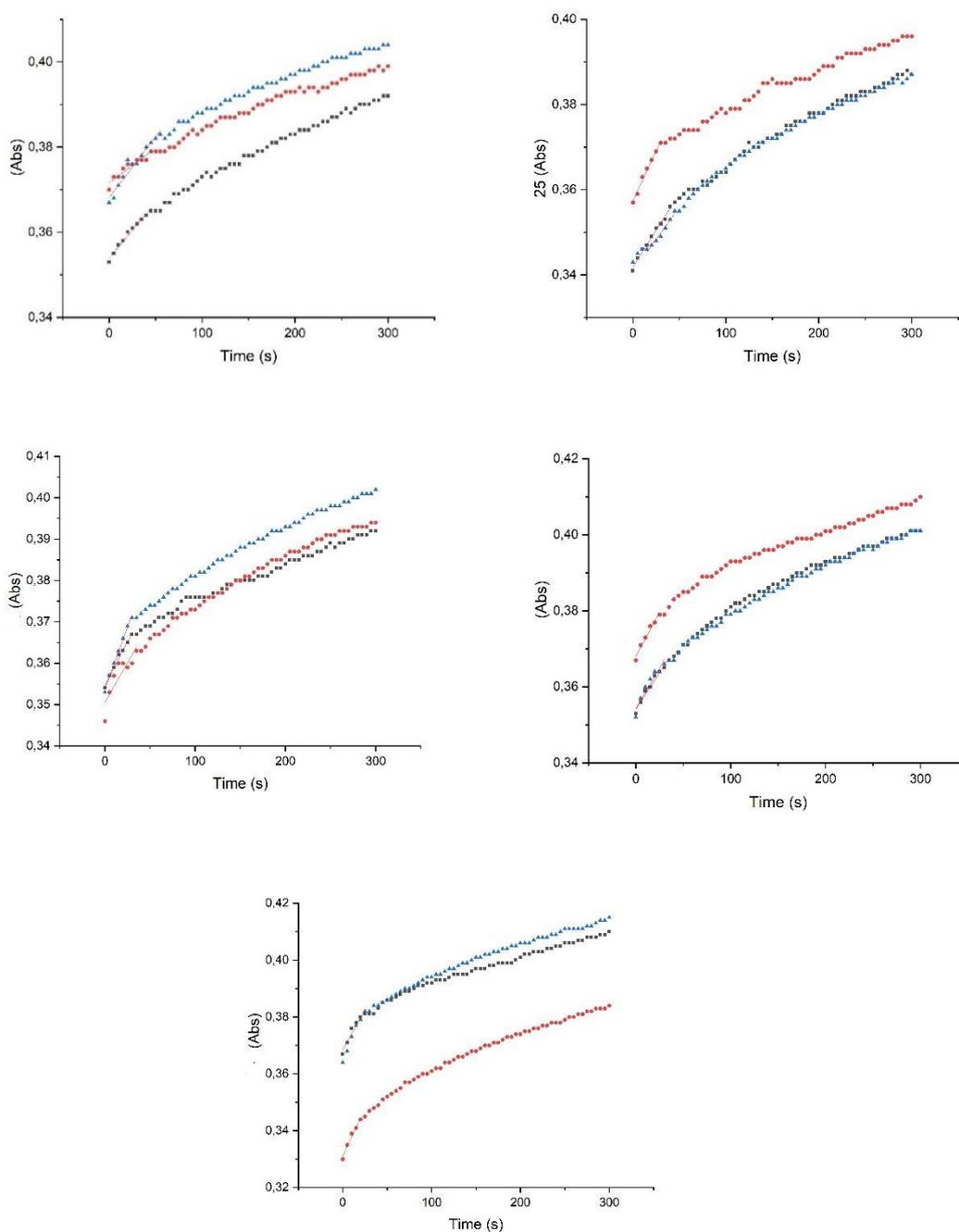


Figura 35: curve di accumulo di prodotto (13-HotrE) nel tempo, in presenza di concentrazioni crescenti di acidi linolenico come substrato.

Le diverse velocità iniziali sono quindi state messe in relazione con le relative concentrazioni di substrato e messe in un grafico secondo l'equazione di Michaelis – Menten, come di seguito mostrato:

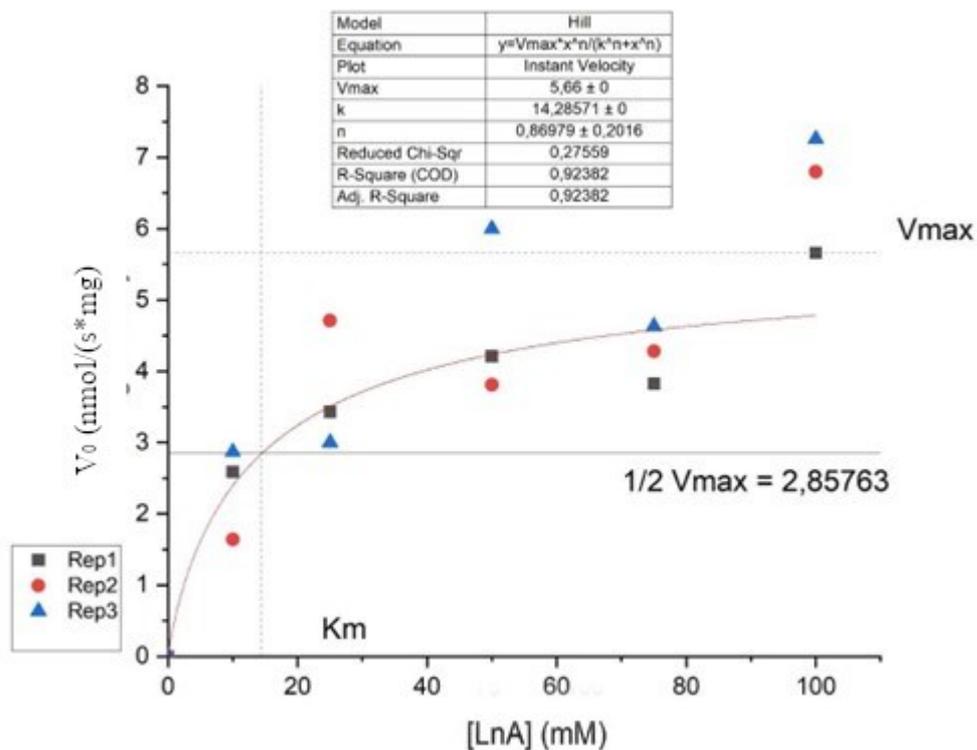


Figura 36: la velocità iniziale è stata rappresentata in funzione della concentrazione di substrato.

Come si può notare la curva non ha ancora raggiunto il Plateau ed è necessario aumentare ulteriormente la concentrazione di acido linolenico per ottenere una curva più utile ai fini della ricerca. Altra considerazione va fatta sulla misura di R – Square, che è tanto migliore quanto più si avvicina al valore unitario; sarebbe opportuno migliorare ulteriormente questo valore standardizzando ancora di più il metodo.

Il grafico precedente si può ulteriormente migliorare esprimendo la pendenza, cioè la velocità iniziale, in milligrammi di prodotto ottenuto utilizzando la seguente formula:

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

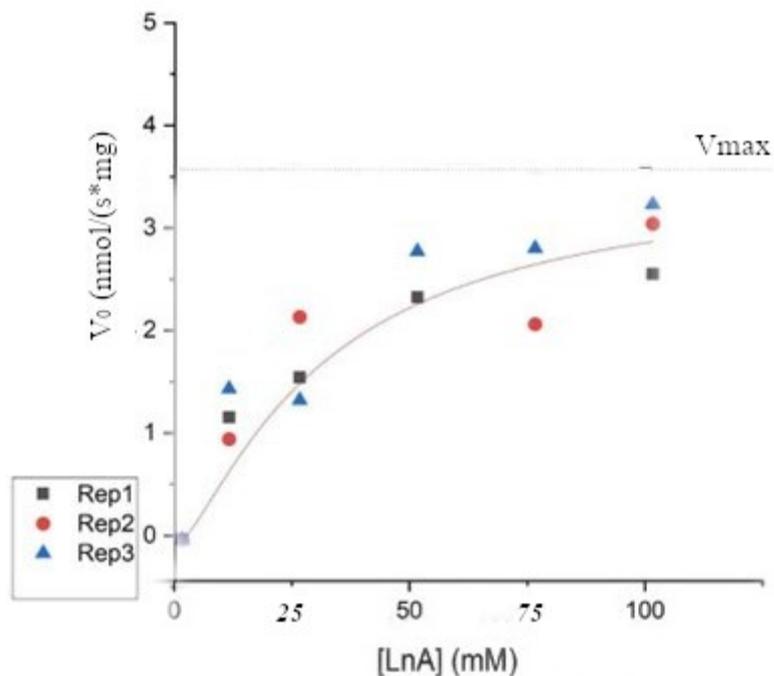


Figura 37: grafico che deriva dall'applicazione della formula qui sopra esplicitata al grafico di Figura 4.19 e consente di avere una visione ancora migliore della tendenza dell'attività enzimatica.

4.3.2.2 Effetto di concentrazioni crescenti di substrato sull'attività di Lox7

La procedura eseguita con Lox2 è stata eseguita anche con Lox7, con l'unica differenza del buffer utilizzato, qui è PIPES 0.1 M a pH 6.0. La concentrazione di Tween20 mantenuta a 50 μ M e la concentrazione di enzima a 0.02 μ g/ μ L, partendo da uno stock 0.8 mg/mL.

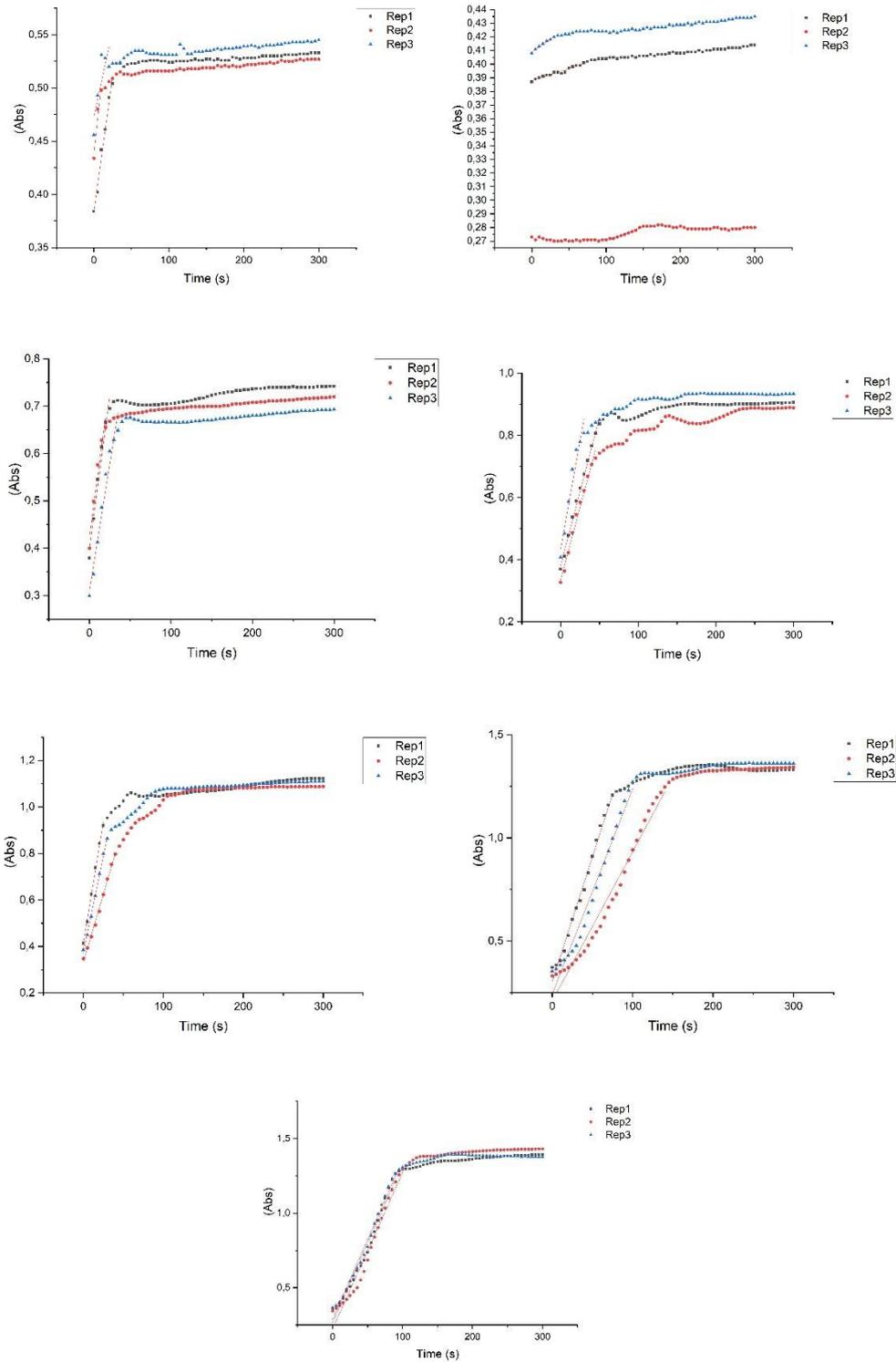


Figura 38: quello che si ottiene alle varie concentrazioni di substrato con misurazioni cadenzate sulla quantità di prodotti sintetizzati.

Anche qui, utilizzando l'equazione di Michaelis – Menten si è in grado di costruire un grafico di attività del tipo seguente.

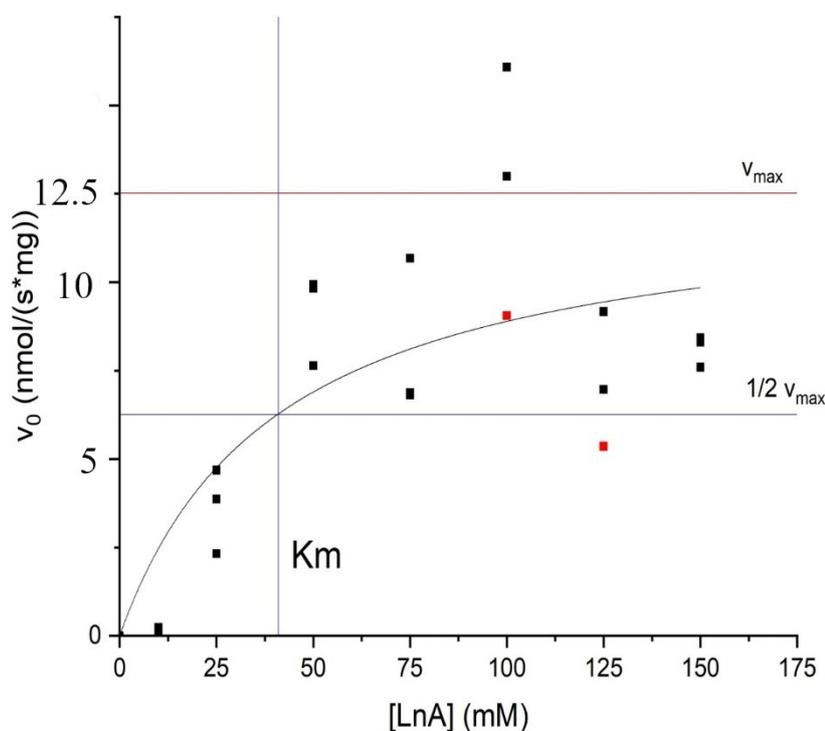


Figura 39: grafico della velocità istantanea correlata alle varie concentrazioni di substrato. Anche qui, come visibile, si ottiene una curva che tende a una retta perpendicolare all'asse delle ascisse che rappresenta la velocità massima di reazione catalitica.

VALORI	Lox2	Lox7
pH max	7.5	4.5
Km	31.6	38.1
Vmax	3.1	12.5

Tabella 16: riassunto dei valori principali ottenuti con le sperimentazioni cinetiche su Lox2 e Lox7. Come è ben visibile, Lox7 sia adatta meglio a pH più acidi e presenta una velocità catalitica ben più alta rispetto all'altra proteina.

4.3.3 Determinazione dei Prodotti di Reazione e della Catalisi nel tempo via HPLC - MS - UV

Questo tipo di indagine è stata svolta nel Dipartimento di Fisica dell'Università di Trento. Le soluzioni contenenti i buffer, il detergente e il substrato sono state preparate, con una sovrabbondanza di uno, per tutte le tipologie di reazione e le ripetizioni annesse rispettando le condizioni derivanti dagli esperimenti precedenti: substrato (18:2 e 18:3) a 100 μM , enzima a 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Buffer PIPES 0.1 M pH = 7.5 per Lox2 e PIPES 0.1 M a pH = 6.0 per Lox7 e Tween20 a 50 μM . Le reazioni sono state poi fermate dopo 2 e 5 ore con Trifenilfosfina³⁰ 0.4 M in Acetonitrile³¹; 30 μL di mix di reazione fermati con 120 μL di soluzione di stop.

Si iniziano gli esperimenti su Lox2, come viene spiegato nella sequenza di figure.

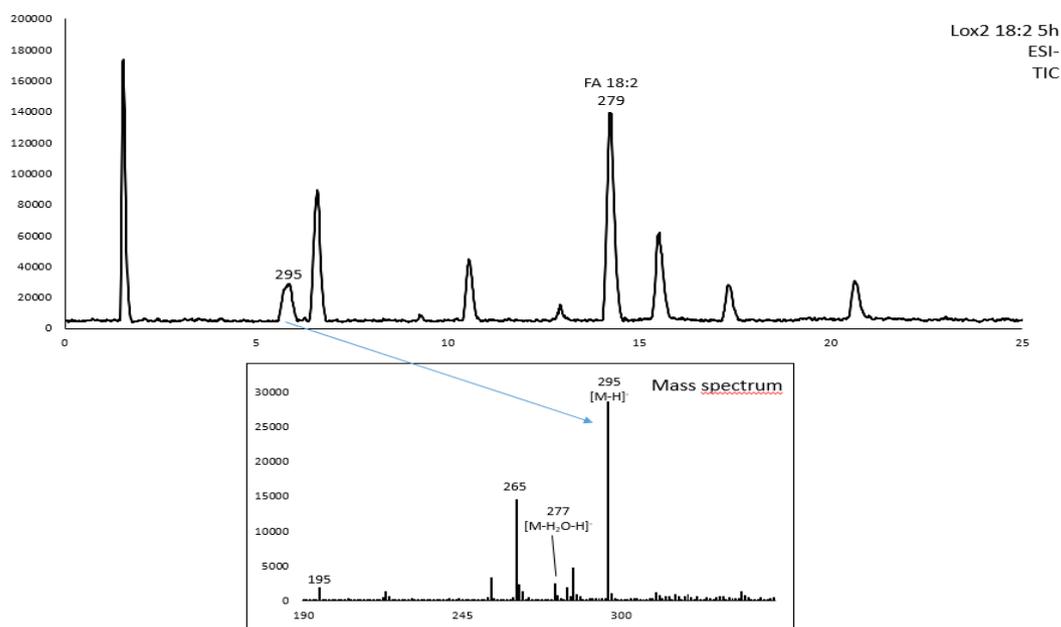


Figura 40: reazione Lox2 con acido linoleico 18:2 fermata dopo 5 ore.

³⁰ Trifenilfosfina (TPP-PPh₃): molecola chimica con caratteristiche riducenti. Si ossida a Trifenilfosfina ossido.

³¹ Acetonitrile: solvente organico utilizzato, in questo caso, come agente di blocco (stopping agent) di enzimi. Inattiva gli enzimi per consentire il controllo dei prodotti.

La reazione non consuma tutto il substrato, però produce un composto con $m/z = 295$ che viene poi analizzato con spettrometria MS/MS per comprendere quale legame del substrato è stato interessato dall'ossidazione.

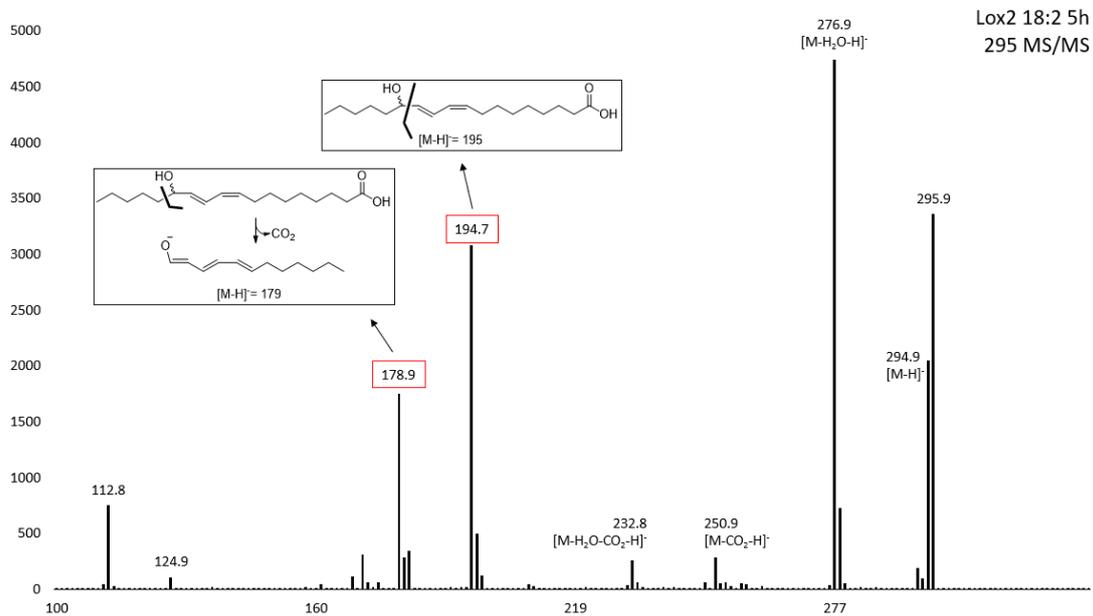


Figura 41: indagine sul picco a $m/z = 295$ per contestualizzare l'ossidazione di Lox2 sul carbonio C13 dell'Acido Linoleico.

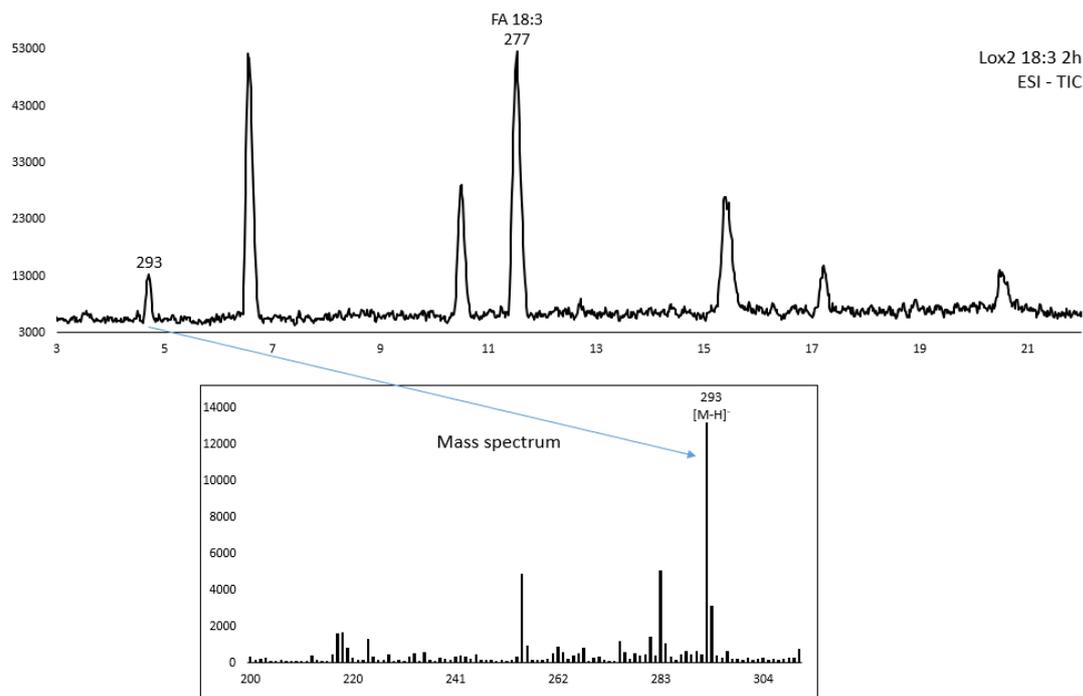


Figura 42: reazione di Lox2 con Acido Linolenico 18:3 fermata dopo 2 ore. La reazione non consuma tutto il substrato, però produce un composto con m/z 293 che viene poi analizzato.

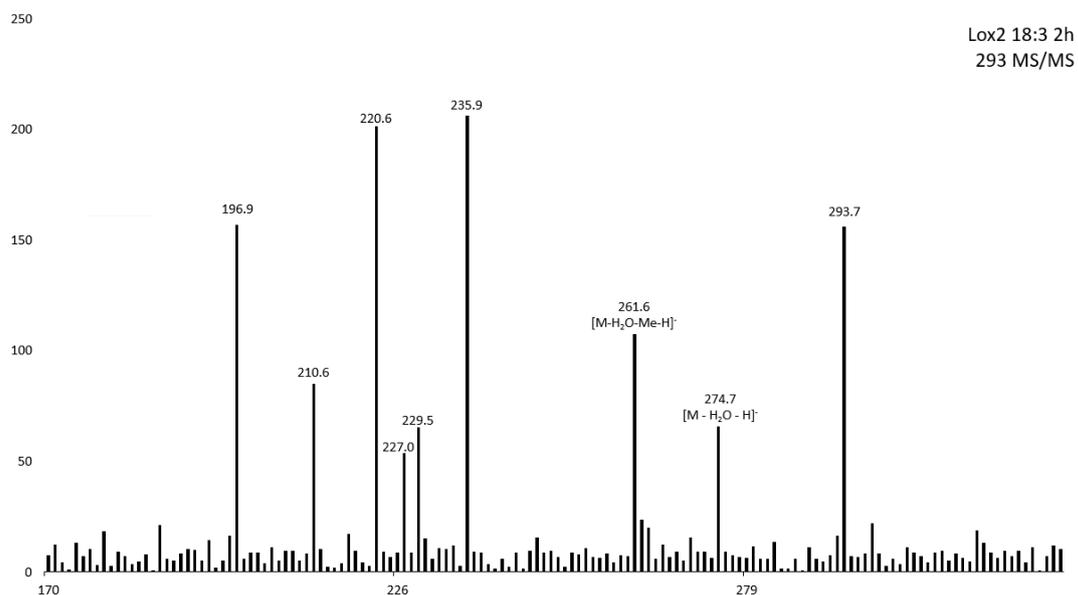


Figura 43: analisi del grafico MS/MS (spettrometria di massa tandem che aumenta la possibilità di analisi di un campione) sul picco 293 della reazione Lox2 e acido linolenico dopo due ore. L'intensità dei segnali è troppo bassa per fare speculazioni.

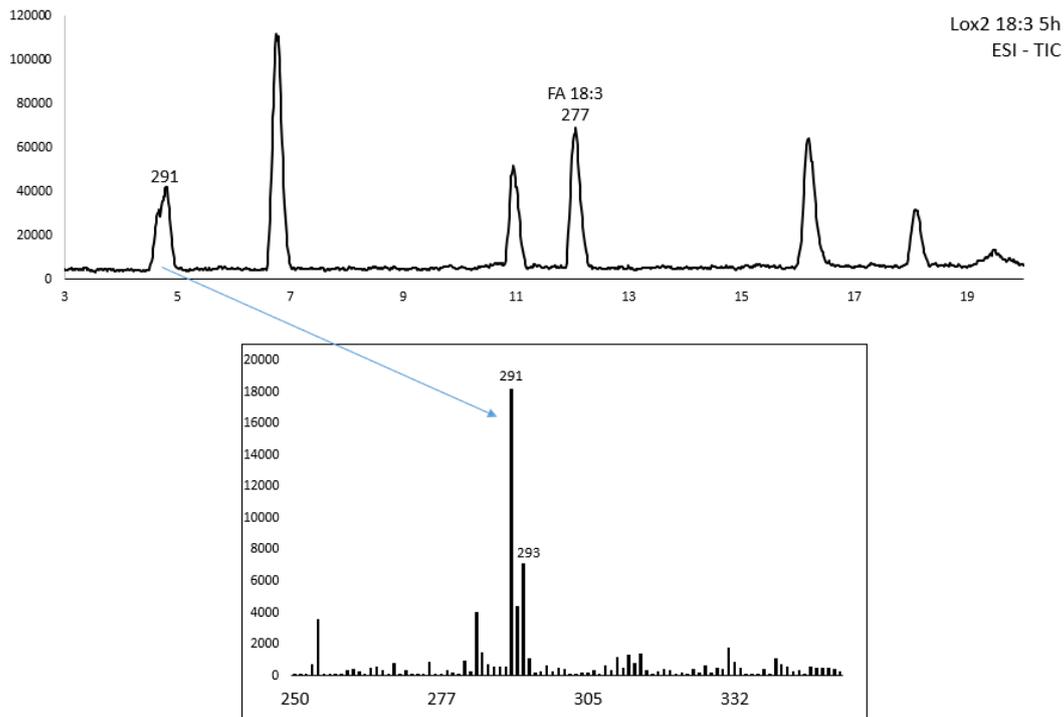


Figura 44: reazione Lox2 con acido linolenico 18:3 fermata dopo 5 ore. La reazione porta a una miscela di composti in cui spiccano $m/z = 291$ e $m/z = 293$ in rapporto 5:1. La reazione non consuma tutto il substrato. Si è quindi andati ad indagare sul picco 291 nella figura successiva.

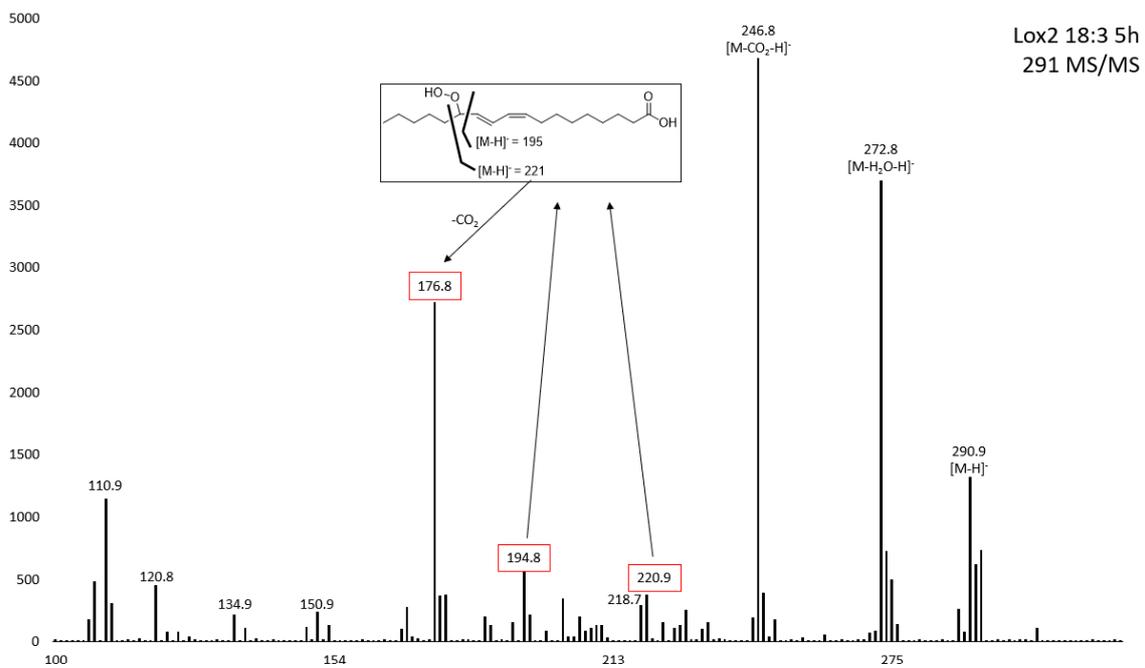


Figura 45: controllo dei frammenti di ossidazione sul carbonio C13 di acido linolenico basandosi sul picco $m/z = 291$.

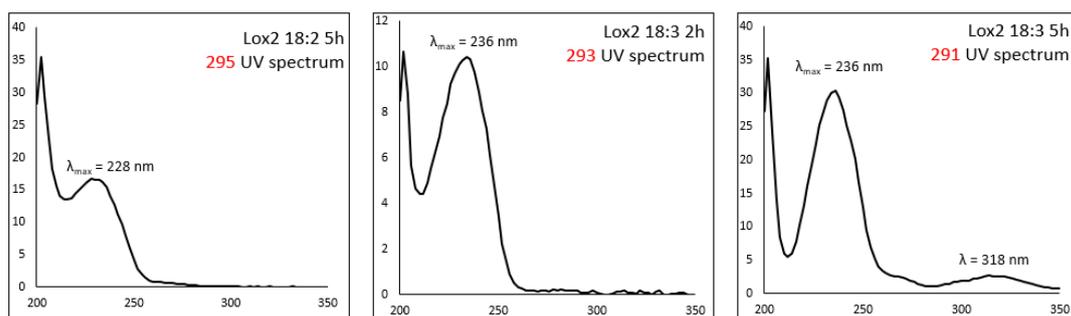


Figura 46: spettri UV dei composti a $m/z = 295, 293$ e 291 .

Una volta finite le indagini su Lipossigenasi 2 si è passati alle reazioni su Lipossigenasi 7. Di seguito vengono esplicitati i grafici in forma ridotta, basti notare che le sperimentazioni sono state eseguite con i medesimi criteri precedenti.

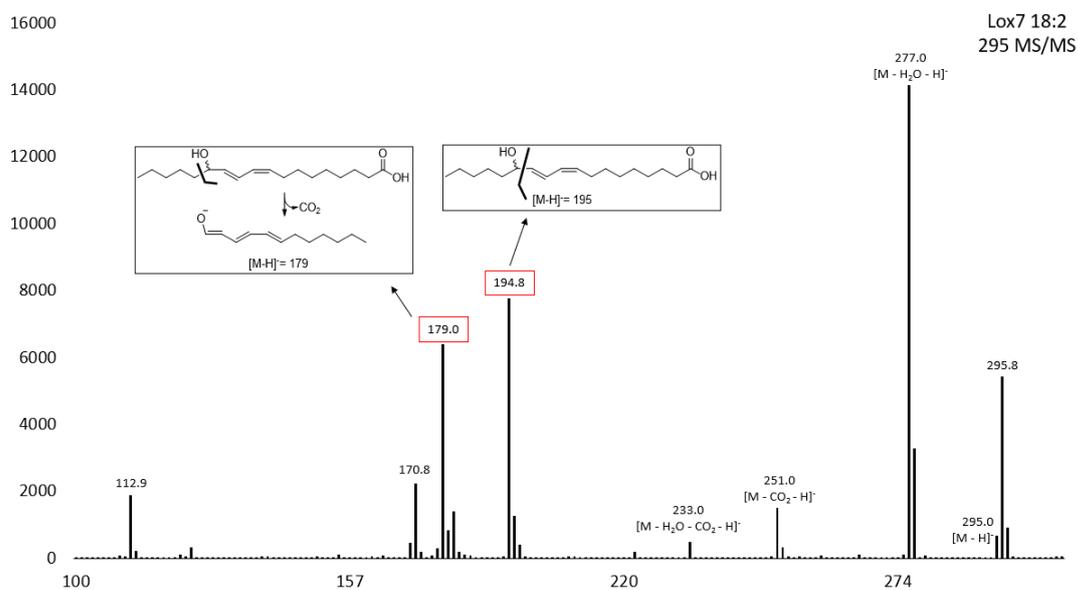


Figura 47: controllo del picco $m/z = 295$ della reazione a 5 ore di Lox7 con Acido Linoleico. La reazione consuma tutto il substrato Qui è visibile il controllo sui frammenti dopo ossidazione del carbonio C13 dell'acido grasso.

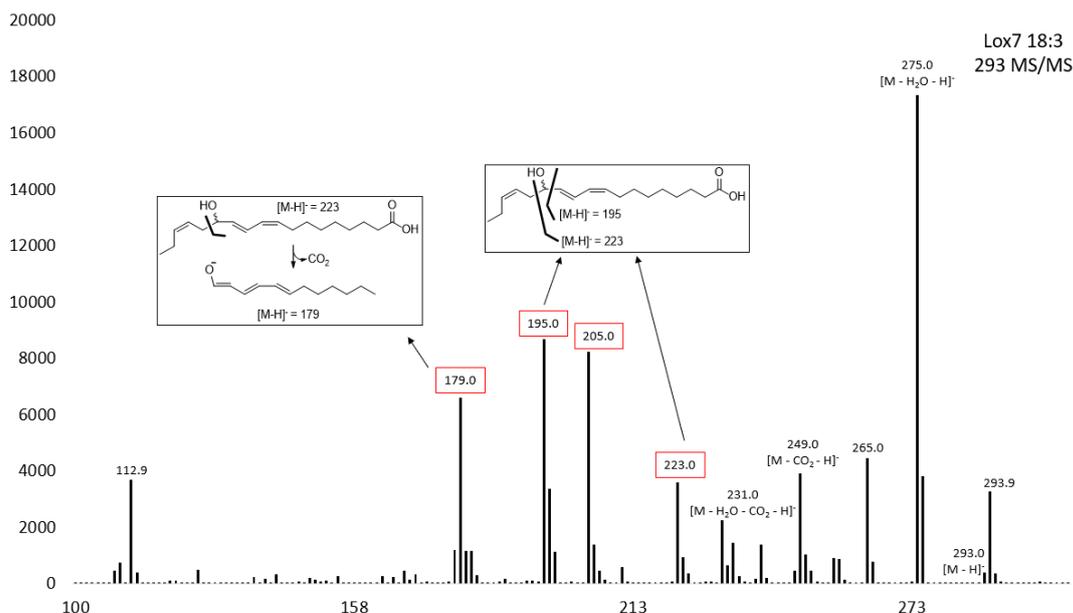


Figura 48: controllo del picco $m/z = 293$ della reazione a 5 ore di Lox7 con acido linolenico. La reazione consuma tutto il substrato. Qui si stanno controllando i frammenti dell'ossidazione in C13.

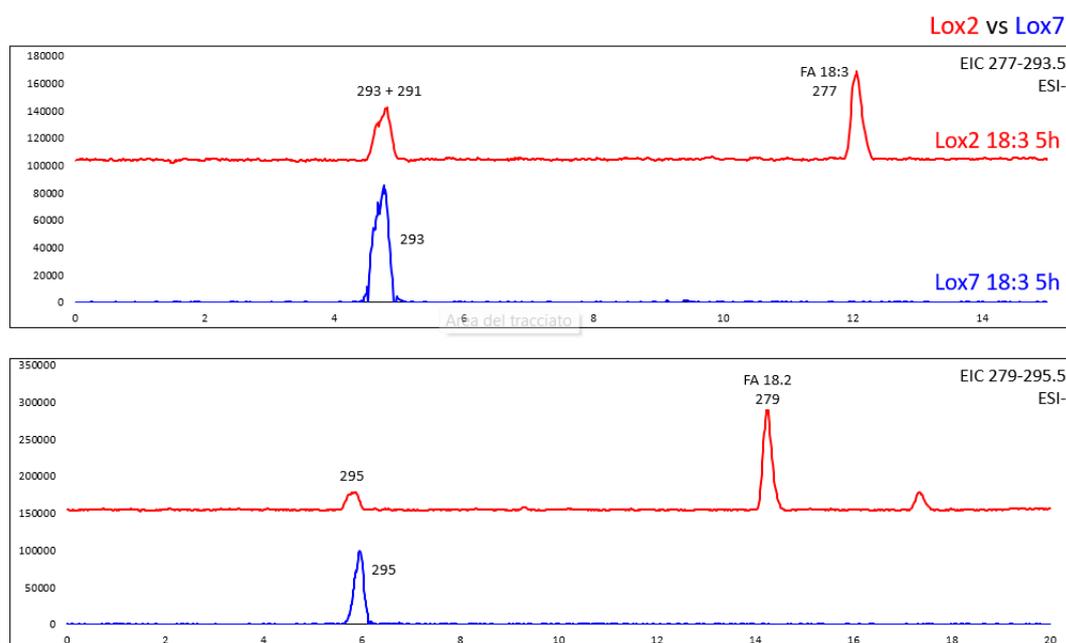


Figura 49: confronto delle reazioni delle due Lipossigenasi con entrambi i substrati per reazioni da 5 ore.

Si può notare una certa differenza nei picchi a 295, anche se poi al controllo MS-MS, la spettrometria tandem, appaiono identici. Altra cosa che si vede subito è l'assenza del picco a 291 per la reazione con Lox7.

4.3.4 Identificazione e Analisi Cinetica della generazione dei prodotti di Reazione con Tecnica NMR

La Risonanza Magnetica Nucleare, nonostante non sia uno strumento particolarmente sensibile, è stata comunque impiegata perché l'obiettivo di questo esperimento è stato, un'altra volta, quello di individuare con esattezza i prodotti di reazione catalitica; si è infatti in possesso della formula bruta di entrambi i substrati utilizzati e anche dei due prodotti di reazione, ma non è chiaro quale sia il doppio legame coinvolto nella trasformazione e l'idea è proprio quella di evidenziare l'intorno magnetico del legame – COOH per capire in che posizione, della catena alifatica dell'acido grasso, esso venga preferenzialmente a formarsi. Purtroppo i dati sono risultati poveri e inconcludenti, quindi serviranno ulteriori studi per riuscire a estrapolare qualcosa di utilizzabile a livello scientifico.

5. DISCUSSIONE

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di sintetizzare e caratterizzare due lipossigenasi di *Vitis vinifera*, Lox2 e Lox7. Si è iniziato dall'amplificazione del trascritto attraverso una tecnica che prende il nome di PCR.

Una volta divisi i codici genetici in aliquote da 60 μ L delle due lipossigenasi, si è passati al taglio enzimatico ad opera di enzimi di restrizione, proteine in grado di riconoscere sequenze di DNA/RNA specifiche e idrolizzare il legame C-C. Si è riusciti ad ottenere *sticky ends* su entrambe le estremità dei filamenti di Lox7, mentre per Lox2 ci si è dovuti accontentare di una *blunt end*, tagliata dall'enzima Sma1, all'estremità N-terminale; ciò è meno preferibile perché dà problemi nella specificità della ligazione al plasmide batterico, ma è stata un'evenienza non aggirabile in alcun modo. Si è quindi proseguito alla ligazione sul vettore plasmidico di *E. coli* e si è testato il successo dell'operazione confrontando, tramite elettroforesi, i pesi molecolari del plasmide modificato e non modificato. Anche questo processo è stato rifatto più volte per renderlo semplice e ripetibile.

A questo punto si è proseguito con le tecniche per rendere competenti le cellule di batteriche, trasferendo il plasmide modificato in cellule che già ne presentassero uno funzionante al loro interno; ciò, per inciso, è fondamentale per far sì che il batterio sia già in possesso di *trascrittasi* in grado di tradurre il genoma plasmidico, indipendente da quello cromosomico. Si è tentato dapprima con elettroporazione, ma i risultati non sono stati molto soddisfacenti nelle fasi successive, si è dunque passati a cellule modificabili attraverso heat shock (BL21 – Codon Plus (DE3) – RIPL) con cui si è proseguito nelle parti più avanzate di questo studio. Si sono fatte replicare esponenzialmente le cellule competenti e si sono riunite in *minipreparazioni* (aliquote da 30 μ L) le colonie considerate migliori che si sono infine conservate in freezer a -80 °C.

Di volta in volta si sono recuperate le colonie conservate e le si è fatte replicare per poi indurre l'espressione proteica attraverso lo sblocco dell'*operone lac*, sequenza genica presente sul plasmide batterico che viene sbloccato quando il microrganismo si trova in condizioni di scarse concentrazioni di glucosio

e che permette il metabolismo del lattosio per il sostentamento. Il mix proteico ottenuto è stato quindi purificato più volte fino ad ottenere soluzioni sufficientemente concentrate e ripulite delle proteine oggetto di studio. Con Lox7 le fasi di purificazione sono sempre state più convincenti rispetto che con Lox2, probabilmente per via di una più scarsa efficienza dell'Histidine Tag di quest'ultima; il motivo risiede tendenzialmente nella conformazione tridimensionale di Lox2 che tende a ripiegare il proprio dominio N-terminale all'interno, rendendo più difficoltoso il legame alla colonna di purificazione dell'FPLC (IMAC).

Partendo da colture batteriche da 500 mL, si arriva a soluzioni purificate nell'ordine delle 30-40 aliquote da 30 μ L ognuna, per un totale circa 1 mL di soluzione proteica purificata per ogni Lox. Le concentrazioni in soluzione finale sono state di 2mg/mL per Lox2 e di 0.8 mg/mL per Lox7.

Si è passati dunque ai test di attività delle proteine, partendo dalla ricerca del pH ottimale di reazione. L'efficienza di Lox-2 è ben rappresentata da una curva a campana con picco massimo a circa pH 7.3, mentre Lox7 ha un picco di attività intorno a pH 4.5, per poi perdere di efficienza man mano che il valore sale. Da notare che, nonostante il picco di attività fosse molto acido, nei saggi a concentrazione si è lavorato a pH leggermente più alcalini perché, nonostante si perdesse un po' in efficienza, si è notato che la ripetibilità degli esperimenti migliorava intorno a valori di 5.5-6.0. Entrambi i test sono stati eseguiti con acido linoleico 18:2 e con acido linolenico 18:3, ma i risultati migliori si sono sempre ottenuti con il secondo, a dimostrare una certa preferenza per questo substrato da parte degli enzimi.

Fissato il pH di maggior efficienza si è passati ai test di attività veri e propri con saggi a concentrazione crescente di substrato e utilizzando di volta in volta substrati diversi e proteine purificate provenienti da colture differenti. I dati riportati in tesi sono i più significativi ai fini di ricerca e rimarkano la preferenza degli enzimi ad utilizzare acido linolenico come substrato e una maggiore efficienza catalitica da parte di Lox7.

Lox7, infatti, si è dimostrata in grado di consumare sempre tutto il suo substrato e anche piuttosto velocemente, mentre Lox2 presenta un picco di

attività iniziale buono, ma che si perde velocemente, portando all'inattivazione della proteina prima che tutto il substrato venga digerito. Questo potrebbe essere dovuto sia a una questione intrinseca del polipeptide, ma anche alla possibilità che la purificazione di Lipossigenasi 7 sia venuta meglio, permettendo quindi un'analisi più realistica della sua propria attività senza elementi disturbanti.

Proseguendo i test di attività si sono eseguite delle digestioni a 1-5 e 24 ore che sono state controllate grazie a HPLC-MS. Da subito si evince, nuovamente, che Lox7 consuma tutto il substrato, che sia acido linoleico (più lentamente, o linolenico, mentre Lox2 non riesce a consumare completamente nessuno dei due nonostante si sia lasciata andare la reazione anche molto a lungo. Entrambe le proteine, in ogni caso, sembrano ossidare il substrato 18:3 in C13. Seppure dai grafici risultino alcune differenze sostanziali, il confronto dei due LC-MS/MS, tecnica che aumenta la precisione di esame, non denotano poi alcuna differenza, sottolineando due reazioni di ossidazione molto simili, per lo meno sul substrato studiato.

Si è anche fatto un tentativo sui prodotti grazie a NMR, ma con risultati purtroppo inconcludenti, infatti i grafici risultavano troppo rumorosi e di difficile analisi, impedendo di estrapolare dati significativi.

Concludendo, si può tranquillamente dire che questo è stato uno studio pionieristico che ha posto le basi per future esperienze scientifiche le quali porteranno a meglio delineare le caratteristiche principali di questa classe di enzimi. I dati raccolti pongono le basi per future sperimentazioni con la tranquillità di avere dei protocolli ripetibili ed efficaci. Parte del materiale genetico e proteico è ancora conservato ed etichettato nei freezer del laboratorio, in modo che risulti libero ed accessibile, consentendo ai futuri ricercatori di partire da step di ricerca successivi e dando dunque loro la possibilità di concentrarsi meglio sulla standardizzazione dei protocolli per i saggi di attività e sull'eventuale ricerca della struttura tridimensionale di queste due Lipossigenasi.

I risultati ottenuti confermano l'attività perossidante comune a tutte le Lipossigenasi, con preferenza nei confronti del substrato 18:3, piuttosto che 18:2, caratteristica condivisa con la maggior parte delle Lipossigenasi vegetali finora studiate.

Si potrebbe, in studi successivi, migliorare l'efficienza della purificazione per ottenere soluzioni uniche o quasi di proteina che non lascino dubbi sull'effettiva attività catalitica e si dovrebbe testare l'attività anche su substrati diversi per denotare differenze di preferenza ed efficacia. Interessante sarebbe produrre reazioni tanto efficaci da poter analizzare i grafici NMR, facendosi quindi un'idea più chiara delle caratteristiche stereoscopiche della catalisi.

BIBLIOGRAFIA

- Alsalem, M., Millns, P., Kendall, D., & Chapman, V. (2011). F127 EVIDENCE FOR A ROLE OF 15-LIPOXYGENASE IN THE GENERATION OF ENDOGENOUS LIGANDS WHICH ACTIVATE TRPV1. *European Journal of Pain Supplements*, 5(1). [https://doi.org/10.1016/s1754-3207\(11\)70376-5](https://doi.org/10.1016/s1754-3207(11)70376-5)
- Andreou, A., & Feussner, I. (2009). Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. In *Phytochemistry* (Vol. 70, Issues 13–14). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.008>
- Bateman, A., & Sandford, R. (1999). The PLAT domain: A new piece in the PKD1 puzzle. *Current Biology*, 9(16). [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80380-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80380-7)
- Bell, E., Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8675>
- Boyle, J. (2005). Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>
- Brash, A. R. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 274, Issue 34). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23679>
- Capel-Cuevas, S., Cuéllar, M. P., Pegalajar, M. D. C., De Orbe-Payá, I., & Capitán-Vallvey, L. F. (2012). An expert system for full pH range prediction using a disposable optical sensor array. *IEEE Sensors Journal*, 12(5). <https://doi.org/10.1109/JSEN.2011.2168815>
- Chavan-Gautam, P., Rani, A., & Freeman, D. J. (2018). Distribution of Fatty Acids and Lipids During Pregnancy. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 84, pp. 209–239). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.12.006>
- Chen, H. min, Zhu, Z. jun, Chen, J. J., Yang, R., Luo, Q. jun, Xu, J. lin, Shan, H., & Yan, X. J. (2015). A multifunctional lipoxygenase from Pyropia haitanensis- The cloned and functioned complex eukaryotic algae oxylipin pathway enzyme. *Algal Research*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.015>

- Chiba, T., Thomas, C. P., Calcutt, M. W., Boeglin, W. E., O'Donnell, V. B., & Brash, A. R. (2016). The Precise Structures and Stereochemistry of Trihydroxylinoleates Esterified in Human and Porcine Epidermis and Their Significance in Skin Barrier Function. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28). <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.711267>
- Christensen, S. A., Huffaker, A., Kaplan, F., Sims, J., Ziemann, S., Doehlemann, G., Ji, L., Schmitz, R. J., Kolomiets, M. V., Alborn, H. T., Mori, N., Jander, G., Ni, X., Sartor, R. C., Byers, S., Abdo, Z., & Schmelz, E. A. (2015). Maize death acids, 9-lipoxygenase-derived cyclopentane(a)nones, display activity as cytotoxic phytoalexins and transcriptional mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36). <https://doi.org/10.1073/pnas.1511131112>
- Cramer, G. R., Ghan, R., Schlauch, K. A., Tillett, R. L., Heymann, H., Ferrarini, A., Delledonne, M., Zenoni, S., Fasoli, M., & Pezzotti, M. (2014). Transcriptomic analysis of the late stages of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berry ripening reveals significant induction of ethylene signaling and flavor pathways in the skin. *BMC Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0370-8>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Ding, Y., Yang, W., Su, C., Ma, H., Pan, Y., Zhang, X., & Li, J. (2019). Tandem 13-lipoxygenase genes in a cluster confers yellow-green leaf in cucumber. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20123102>
- Djian, B., Hornung, E., Ischebeck, T., & Feussner, I. (2019). The green microalga *Lobosphaera incisa* harbours an arachidonate 15S-lipoxygenase. *Plant Biology*, 21. <https://doi.org/10.1111/plb.12920>
- Ekblom, R., & Wolf, J. B. W. (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. In *Evolutionary Applications* (Vol. 7, Issue 9, pp. 1026–1042). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/eva.12178>
- Farmer, E. E., & Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 64). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120132>

- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. In *Science* (Vol. 294, Issue 5548). <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871>
- Garreta, A., Val-Moraes, S. P., García-Fernández, Q., Busquets, M., Juan, C., Oliver, A., Ortiz, A., Gaffney, B. J., Fita, I., Manresa, À., & Carpena, X. (2013). Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FASEB Journal*, 27(12). <https://doi.org/10.1096/fj.13-235952>
- GE Healthcare. (2015). Sepharose and sepharose CL. *GE Healthcare*.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., & Rosahl, S. (2001). Oxylipin Profiling Reveals the Preferential Stimulation of the 9-Lipoxygenase Pathway in Elicitor-treated Potato Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6267–6273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008606200>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Transformation of *Escherichia coli* by Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101220>
- Grüllich, C., Duvoisin, R. M., Wiedmann, M., & Van Leyen, K. (2001). Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte. *FEBS Letters*, 489(1). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02080-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02080-4)
- Haberl Meglič, S., Janež, N., Peterka, M., Flisar, K., Kotnik, T., & Miklavčič, D. (2020). Evaluation and Optimization of Protein Extraction From *E. coli* by Electroporation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.543187>
- Horn, T., Adel, S., Schumann, R., Sur, S., Kakularam, K. R., Polamarasetty, A., Redanna, P., Kuhn, H., & Heydeck, D. (2015). Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 57). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.11.001>
- Ishtiaq, M., Muzammil, M., & Maqbool, M. (2023). Electrophoresis. In *Genetic Engineering: Volume 1: Principles Mechanism, and Expression*. https://doi.org/10.5005/jp/books/14191_18
- Islam, M. S., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A review on macroscale and microscale cell lysis methods. In *Micromachines* (Vol. 8, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/mi8030083>

- Jiang, X., Xue, Y., Mustafa, M., & Xing, Z. (2022). An updated review of the effects of eicosapentaenoic acid- and docosahexaenoic acid-derived resolvins on bone preservation. In *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (Vol. 160). <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2022.106630>
- Kanofsky, J. R., & Axelrod, B. (1986). Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 261(3). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36059-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36059-3)
- Kister, A. E., Fokas, A. S., Papatheodorou, T. S., & Gelfand, I. M. (2006). Strict rules determine arrangements of strands in sandwich proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.0510747103>
- Kuhn, H., Banthiya, S., & Van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1851, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.002>
- Kuksis, A. (2010). Lipidomics and metabolomics of dietary lipid peroxidation. *RSC Food Analysis Monographs*. <https://doi.org/10.1039/9781849730921-00102>
- Kumari, S., Badana, A. K., Murali Mohan, G., Shailender, G., & Malla, R. R. (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. In *Biomarker Insights* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1177/1177271918755391>
- Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Hoult, J. R. S., & Halliwell, B. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochemical Pharmacology*, 42(9). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90501-u](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90501-u)
- L.C. Passos, M., & M.F.S. Saraiva, M. L. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. In *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation* (Vol. 135). <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>
- Li, C., Wu, X., Liu, S., Shen, D., Zhu, J., & Liu, K. (2020). Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of Neurological Diseases. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00612>

- Liavonchanka, A., & Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, 163(3). <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.006>
- Liu, C., Fan, D., Lei, Q., Lu, A., & He, X. (2022). Roles of Resolvins in Chronic Inflammatory Response. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 23). <https://doi.org/10.3390/ijms232314883>
- Manns, J. M. (2011). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current Protocols in Microbiology*, SUPPL. 22. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22>
- Mcconn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., & Browse, J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5473>
- Mlynárik, V. (2017). Introduction to nuclear magnetic resonance. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 529). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.006>
- Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A. M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J. M., García-Casado, G., Gouhier-Darimont, C., Reymond, P., Takahashi, K., García-Mina, J. M., Nishihama, R., Kohchi, T., & Solano, R. (2018). Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nature Chemical Biology*, 14(5). <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0033-4>
- Morrison, S. L. (2001). Transformation of E. coli by electroporation. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.], Appendix 3*. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ma03ns21>
- Mosblech, A., Feussner, I., & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 47, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.12.011>
- Mukhtarova, L. S., Lantsova, N. V., Khairutdinov, B. I., & Grechkin, A. N. (2020). Lipoxygenase pathway in model bryophytes: 12-oxo-9(13),15-phytodienoic acid is a predominant oxylipin in *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112533>
- Musiek, E. S., Brooks, J. D., Joo, M., Brunoldi, E., Porta, A., Zanoni, G., Vidari, G., Blackwell, T. S., Montine, T. J., Milne, G. L., McLaughlin, B., & Morrow, J. D. (2008). Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory

- mediators formed from the peroxidation of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M803625200>
- Neau, D. B., Bender, G., Boeglin, W. E., Bartlett, S. G., Brash, A. R., & Newcomer, M. E. (2014). Crystal Structure of a Lipoxygenase in Complex with Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46).
<https://doi.org/10.1074/jbc.m114.599662>
- Negri, A. S., Robotti, E., Prinsi, B., Espen, L., & Marengo, E. (2011). Proteins involved in biotic and abiotic stress responses as the most significant biomarkers in the ripening of Pinot Noir skins. *Functional and Integrative Genomics*, 11(2).
<https://doi.org/10.1007/s10142-010-0205-0>
- Newie, J., Andreou, A., Neumann, P., Einsle, O., Feussner, I., & Ficner, R. (2016). Crystal structure of a lipoxygenase from *Cyanothece* sp. may reveal novel features for substrate acquisition. *Journal of Lipid Research*, 57(2).
<https://doi.org/10.1194/jlr.M064980>
- Newie, J., Kasanmascheff, M., Bennati, M., & Feussner, I. (2016). Kinetics of bis-allylic hydroperoxide synthesis in the iron-containing lipoxygenase 2 from cyanothecae and the effects of manganese substitution. *Lipids*, 51(3).
<https://doi.org/10.1007/s11745-016-4127-z>
- Nybo, K. (2014). SDS-PAGE. *BioTechniques*, 56(3), 115.
<https://doi.org/10.2144/000114144>
- Olsen, E. A., Lisa Abernethy, M., Kulp-Shorten, C., Callen, J. P., Glazer, S. D., Huntley, A., McCray, M., Monroe, A. B., Tschene, E., & Wolf, J. E. (1991). A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinic keratoses on the head and neck. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 24(5). [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70113-G](https://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70113-G)
- Pilati, S., Bagagli, G., Sonogo, P., Moretto, M., Brazzale, D., Castorina, G., Simoni, L., Tonelli, C., Guella, G., Engelen, K., Galbiati, M., & Moser, C. (2017). Abscisic acid is a major regulator of grape berry ripening onset: New insights into ABA signaling network. *Frontiers in Plant Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01093>
- Pilati, S., Brazzale, D., Guella, G., Milli, A., Ruberti, C., Biasioli, F., Zottini, M., & Moser, C. (2014). The onset of grapevine berry ripening is characterized by ROS

- accumulation and lipoxygenase-mediated membrane peroxidation in the skin. *BMC Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-87>
- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. In *Plant Physiology* (Vol. 130, Issue 1). <https://doi.org/10.1104/pp.010787>
- Powers, J. L., Kiesman, N. E., Tran, C. M., Brown, J. H., & Bevilacqua, V. L. H. (2007). Lactate dehydrogenase kinetics and inhibition using a microplate reader. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35(4). <https://doi.org/10.1002/bmb.74>
- Prajapati, H., Desai, C., Narkhede, S., & Prajapati, H. A. (2021). A Brief Review on Fast Protein Liquid Chromatography-FPLC. *J Pharm Sci Bioscientific Res.* 2021, 10(4).
- Prasad, A., Sedlářová, M., Balukova, A., Rác, M., & Pospíšil, P. (2020). Reactive Oxygen Species as a Response to Wounding: In Vivo Imaging in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01660>
- Pratiwi, R. A., Bayu, A., & Nandiyanto, D. (2021). Indonesian Journal of Educational Research and Technology How to Read and Interpret UV-VIS Spectrophotometric Results in Determining the Structure of Chemical Compounds. *Indonesian Journal of Educational Research and Technology*, 2(1).
- Rey, F., Alves, E., Gaspar, L., Conceição, M., & Domingues, M. R. (2022). Oils as a source of bioactive lipids (olive oil, palm oil, fish oil). In *Bioactive Lipids*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824043-4.00013-0>
- Roy, S., & Kumar, V. (2014). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*, 3(8), 955–960. <http://www.ijsr.net/archive/v3i8/MDIwMTU0MDk=.pdf>
- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J. P., Rosahl, S., Ortego, F., Castañera, P., & Sánchez-Serrano, J. J. (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.1146>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Transformation of *E. coli* by Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3933>

- Savadogo, E. H., Shiomi, Y., Yasuda, J., Akino, T., Yamaguchi, M., Yoshida, H., Umegawachi, T., Tanaka, R., Suong, D. N. A., Miura, K., Yazaki, K., & Kitajima, S. (2021). Gene expression of PLAT and ATS3 proteins increases plant resistance to insects. *Planta*, 253(2). <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03530-y>
- Schwartz, H. J., Petty, T., Dubé, L. M., Swanson, L. J., & Lancaster, J. F. (1998). A randomized controlled trial comparing zileuton with theophylline in moderate asthma. *Archives of Internal Medicine*, 158(2). <https://doi.org/10.1001/archinte.158.2.141>
- Siedow, J. N. (1991). Plant lipoxygenase: Structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001045>
- Singh, P., Arif, Y., Miszczuk, E., Bajguz, A., & Hayat, S. (2022). Specific Roles of Lipoxygenases in Development and Responses to Stress in Plants. In *Plants* (Vol. 11, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/plants11070979>
- Solanki, G. (2012). Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Pharmacological Research*, 2(3).
- Springer, A., Kang, C., Rustgi, S., Von Wettstein, D., Reinbothe, C., Pollmann, S., & Reinbothe, S. (2016). Programmed chloroplast destruction during leaf senescence involves 13-lipoxygenase (13-LOX). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.1525747113>
- Staswick, P. E., Yuen, G. Y., & Lehman, C. C. (1998). Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant Journal*, 15(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00265.x>
- Su, H. Y., Tsai, Y. C., Tsai, H. P., & Lin, C. L. (2022). Zileuton, a 5-Lipoxygenase Inhibitor, Attenuates Haemolysate-Induced BV-2 Cell Activation by Suppressing the MyD88/NF- κ B Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23094910>
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A. K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., & Mueller, M. J. (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal*, 34(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01730.x>

- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15107>
- Van Leyen, K., Duvoisin, R. M., Engelhardt, H., & Wiedmann, M. (1998). A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature*, 395(6700). <https://doi.org/10.1038/26500>
- Vicente, J., Cascón, T., Vicedo, B., García-Agustín, P., Hamberg, M., & Castresana, C. (2012). Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Molecular Plant*, 5(4), 914–928. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr105>
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C. A., Cook, R. J., & Browse, J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7209>
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., & Wang, D. W. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
- Wasternack, C., & Feussner, I. (2018). The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 69). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040440>
- Yoon, J. H., & Baek, S. J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. In *Yonsei Medical Journal* (Vol. 46, Issue 5). <https://doi.org/10.3349/ymj.2005.46.5.585>
- Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., & Mueller, M. J. (2012). Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: Biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology*, 160(1). <https://doi.org/10.1104/pp.112.202846>