



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA
DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO IN INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI**

XX CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Produzione, caratterizzazione e studio dell'attività
biologica di TAT-OP1 fattore osteogenico per
l'ingegneria tissutale**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Supervisore : Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottoranda : Dott.ssa Chiara Boran

30 giugno 2008

*Con affetto
a mio figlio
Davide*

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 3
INTRODUZIONE	pag. 5
1. Ingegneria Tissutale	pag. 5
2. Utilizzo di fattori di crescita nell' ingegneria tissutale	pag. 6
3. BMP: proteine morfogenetiche dell'osso	pag. 7
3.1 Meccanismo d'azione delle BMP	pag. 8
3.2 Ruolo fisiologico e farmacologico delle BMP	pag.10
4. Osteogenic protein 1: OP-1	pag.12
5. Domini di trasduzione proteica: TAT	pag.15
6. La proteina ricombinante TAT-OP1	pag.17
PARTE SPERIMENTALE	pag.19
1. Materiali	pag.19
2. Clonaggio del gene di OP-1	pag.19
2.1 PCR: reazione polimerasica a catena	pag.19
2.2 Elettroforesi su gel di agarosio	pag.20
2.3 Taglio enzimatico del DNA con endonucleasi di restrizione	pag.21
2.4 Ligazione	pag.22
2.5 Preparazione di cellule competenti	pag.22
2.6 Trasformazione batterica	pag.23
2.7 Ceppi utilizzati	pag.23
2.8 Screening delle colonie	pag. 25
2.9 Purificazione del DNA plasmidico	pag.25
3. Espressione e purificazione di TAT-OP1	pag.26

3.1 Mini espressione di proteine	pag.26
3.2 Espressione di proteine su vasta scala	pag.27
3.3 Purificazione di proteine dal pellet batterico	pag.27
3.4 Cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati (IMAC)	pag. 28
3.5 Cromatografia di gel filtrazione	pag.29
3.6 Cromatografia RP-HPLC	pag.29
3.7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	pag.30
4. Caratterizzazione chimica di TAT-OP1	pag.32
4.1 Riduzione e carbamidometilazione di TAT-OP1	pag.32
4.2 Determinazione del peso molecolare tramite spettrometria di massa ESI-TOF di TAT-OP1	pag.33
4.3 Analisi spettroscopiche	pag.34
4.3.1 Spettroscopia di assorbimento UV	pag.34
4.3.2 Analisi di dicroismo circolare	pag.35
5. Coltura di cellule di linea MC3T3-E1	pag.35
6. Separazione e coltura di cellule UCBMSC	pag.36
6.1 Colture primarie di cellule provenienti da UCB	pag.36
6.2 Caratterizzazione fenotipica di UCBMSC	pag.36
6.3 Induzione del differenziamento adipogenico e osteogenico in UCBMSC	pag.37
6.3.1 Colorazione Oil-RedO	pag.37
7. Induzione del differenziamento osteogenico con TAT-OP1	pag.38
8. Studio dell'attività biologica di TAT-OP1	pag.39
8.1 Saggio di vitalità cellulare MTS	pag.39
8.2 Analisi su Western blotting di cellule MC3T3-E1	pag.40
8.2.1 Coltura e raccolta di cellule MC3T3-E1 per Western Blotting	pag.40
8.2.2 Western Blotting	pag.41
8.3 Saggio di Von Kossa su cellule di linea MC3T3-E1 e su UCBMSC	pag.42
8.4 Immunomarcatura di cellule fissate mediante immunofluorescenza	pag.42
8.5 Quantificazione della fosfatasi alcalina su cellule MC3T3-E1	pag.43

8.6 <i>Quantificazione della mineralizzazione della matrice su cellule MC3T3-E1</i>	<i>pag.44</i>
8.7 <i>Colorazione della fosfatasi alcalina su UCBMSC</i>	<i>pag.45</i>
9. <i>Coltura tridimensionale in Puramatrix Hydrogel™ di UCBMSC</i>	<i>pag.46</i>
9.1 <i>Caratterizzazione mediante microscopia elettronica a trasmissione</i>	<i>pag.47</i>
RISULTATI E DISCUSSIONE	<i>pag.49</i>
1. <i>Clonaggio del gene di OP-1</i>	<i>pag.49</i>
2. <i>Espressione e purificazione di TAT-OP1</i>	<i>pag.52</i>
3. <i>Caratterizzazione chimica di TAT-OP1</i>	<i>pag.58</i>
3.1 <i>Determinazione del peso molecolare tramite spettrometria di massa ESI-TOF</i>	<i>pag.58</i>
3.2 <i>Studi di stabilità in soluzione tramite spettroscopia UV e dicromismo circolare</i>	<i>pag.60</i>
4. <i>Studio di tossicità di TAT-OP1 su cellule MC3T3-E1</i>	<i>pag.64</i>
5. <i>Verifica della presenza di TAT-OP1 all'interno delle cellule</i>	<i>pag.66</i>
6. <i>Studio dell'attività biologica di TAT-OP1 su cellule MC3T3-E1</i>	<i>pag.68</i>
6.1 <i>Saggio di Von Kossa su cellule MC3T3-E1</i>	<i>pag.68</i>
6.2 <i>Quantificazione della mineralizzazione della matrice su cellule MC3T3-E1</i>	<i>pag.71</i>
6.3 <i>Immunofluorescenza su cellule MC3T3-E1</i>	<i>pag.72</i>
6.4 <i>Quantificazione della fosfatasi alcalina su cellule MC3T3-E1</i>	<i>pag.74</i>
7. <i>Studio dell'attività biologica di TAT-OP1 su cellule UCBMSC</i>	<i>pag.76</i>
7.1 <i>Isolamento e caratterizzazione di cellule estratte da sangue di cordone ombelicale</i>	<i>pag.76</i>
7.2 <i>Saggio di Von Kossa e fosfatasi alcalina su cellule UCBMSC</i>	<i>pag.78</i>
8. <i>Coltura tridimensionale in Puramatrix Hydrogel™ di UCBMSC</i>	<i>pag.81</i>
CONCLUSIONI	<i>pag.85</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>pag.89</i>

ABBREVIAZIONI

AA	Amminoacidi
API	Atmospheric pressure Ionization: Ionizzazione a pressione Atmosferica
APS	Ammonio Per Solfato
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Albumina di Siero Bovino
°C	Grado Celsius
CD	Dicroismo circolare
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DTT	Ditiotreitolo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extra Cellular Matrix: Matrice Extra Cellulare
EDTA	Acido Etilendiamminotetracetico
ESI	Electron Spray Ionization
FBS	Fetal Bovine Serum: Siero Fetale di Bovino
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IMAC	Ion Metal Affinity Chromathography: Cromatografia di affinità con ioni immobilizzati
IPTG	Isopropil β -tiogalattopiranoside
LB	Terreno di Luria Bertoni
LSB	Laemmlli Sample Buffer
MeCN	Acetonitrile
α -MEM	Minimum Essential Medium
mQ	Acqua deionizzata e filtrata attraverso filtro Millipore®
MSC	Mesenchymal Stem Cells: Cellule Staminali Mesenchimali
NTA	Acido Nitrilo Triacetico
OC	Osteocalcina
OD	Densità Ottica

OP-1	Osteogenic Protein 1
OPN	Osteopontina
PAGE	Elettroforesi su Gel di PoliAcilammide
PBS	Phosphate Buffer Solution soluzione di tampone fosfato isotonica
PCR	Polymerase Chain Reaction: Reazione Polimerasica a Catena
pI	Punto isoelettrico
PLGA	Acido poli(lattico-co-glicolico)
PM	Peso Molecolare
PTD	Protein Trasduction Domain: Domini di Trasduzione Proteica
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography: Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa
Rpm	Rounds per minute: giri al minuto
SDS	Sodio Dodecil Solfato
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-Etilenediammina
TFA	Acido trifluoroacetico
TOF	Time of Flight: Tempo di volo
UCBMSC	Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells
UV	Ultravioletto

ABBREVIAZIONI DEGLI AMMINOACIDI

Acido Aspartico	Asp	D	Istidina	His	H
Acido Glutammico	Glu	E	Leucina	Leu	L
Alanina	Ala	A	Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R	Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N	Prolina	Pro	P
Cisteina	Cys	C	Serina	Ser	S
Fenilalanina	Phe	F	Triptofano	Trp	W
Glicina	Gly	G	Tirosina	Tyr	Y
Glutamina	Gln	Q	Treonina	Thr	T
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V

RIASSUNTO

Osteogenic protein 1 (OP-1 o BMP-7) è una proteina di 431 amminoacidi e fa parte della famiglia delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), fattori di crescita multifunzionali che appartengono a loro volta alla grande famiglia del TGF- β . Le BMP sono coinvolte in diverse funzioni come la formazione di cartilagine, di osso e nello sviluppo di tessuti di origine non osteogenica (cuore e nervi); vengono secrete sotto forma di precursori fino a quattro volte più lunghi della forma matura e presentano al C-terminale un motivo contenente sette cisteine ..C...CXGXC...CC...CXCX..., che rappresenta la porzione attiva della molecola.

In questo lavoro di tesi è stata prodotta una proteina ricombinante di fusione, chiamata TAT-OP1 che comprende la sequenza TAT e la porzione matura di OP-1. TAT è un peptide ricco di residui di arginina che deriva dalle proteine del virus dell'HIV ed è comunemente impiegato come dominio di trasduzione proteica.

Il costrutto TAT-OP1 è composto da 162 amminoacidi e comprende all'N-terminale (30 AA) una coda di 6 istidine seguita dalla sequenza TAT, il sito di taglio per una peptidasi specifica (6 AA) e al C-terminale il dominio di OP-1 con le sette cisteine (126 AA).

Il costrutto TAT-OP1 è stato ottenuto tramite tecniche di biologia molecolare (DNA ricombinante), e la proteina da esso derivata è stata purificata tramite cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati (IMAC) e RP-HPLC. TAT-OP1 è stata caratterizzata tramite SDS-PAGE, analisi degli amminoacidi, spettroscopia UV, dicroismo circolare e spettrometria di massa.

Per testare la capacità di TAT-OP1 a dare differenziamento in senso osteogenico sono stati utilizzati osteoblasti di linea di tipo MC3T3-E1 sottoposti a diverse condizioni di stimolazione (*pulse* 200 nM e *in continuo* 5,5, 13,5 e 27 nM).

Dopo 7 e 14 giorni di trattamento sia con metodo *pulse* che *in continuo* le cellule mostravano mineralizzazione della matrice e risultavano positive al saggio della fosfatasi alcalina. Inoltre tramite immunofluorescenza è stata verificata la presenza dei marcatori tipici del differenziamento osteogenico come l'osteopontina, l'osteocalcina e Cbfa1/Runx2.

Per testare l'attività biologica di TAT-OP1 è stato inoltre sviluppato un modello, sia bidimensionale che tridimensionale, di cellule fibroblastoidi isolate da sangue di cordone ombelicale (UCBMSC). Il modello 3D prevedeva l'utilizzo di una matrice sintetica chiamata Puramatrix Hydrogel TM in grado di mimare il microambiente naturale. Inoltre per assicurare il rilascio controllato di TAT-OP1, per mantenere nel tempo una concentrazione ideale di proteina e per aumentare l'efficacia della stimolazione sono state utilizzate delle microsfele di PLGA.

Le colture primarie in monostrato di UCBMSC sono state ottenute tramite separazione in gradiente di densità, sono state caratterizzate per l'espressione fenotipica di CD105, CD90, CD166, nestina, c-kit, CD31, CD34 e CD38 ed è stata testata la loro capacità multidifferenziativa. Come per le MC3T3-E1 anche in questo caso nelle colture trattate con TAT-OP1, sia con il metodo *pulse* che *in continuo*, è stato possibile rilevare la presenza di depositi di sali di calcio e della fosfatasi alcalina.

Per determinare la produzione di matrice ossea di cellule UCBMSC stimulate con TAT-OP1 (200 nm) dopo incapsulazione in Puramatrix Hydrogel TM è stata utilizzata l'analisi mediante microscopia elettronica a trasmissione.

Dopo 27 giorni di induzione è stata osservata la formazione di micro fibrille di collagene aggregate attorno alle cellule. Ma solo nelle colture trattate con le microsfele di PLGA a rilascio controllato è stata rilevata la presenza di depositi di calcio e cristalli di idrossiapatite.

In futuro sarà interessante verificare l'utilità di questo sistema tridimensionale per migliorare sia lo studio *in vitro* del differenziamento osteogenico che per meglio caratterizzare l'attività biologica di TAT-OP1 per una sua eventuale applicazione clinica nel campo dell'ingegneria tissutale dell'osso.

ABSTRACT

Osteogenic protein-1 (OP-1 or BMP-7) is a member of Bone Morphogenic Proteins's family (BMPs) and consists of 431 amino acid. BMPs are multi-functional growth factors belonging to the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily. Implicated in a variety of functions as the formation of cartilage and bone, and the development of non-osteogenic tissues (heart, nerve), BMPs are secreted as a precursor approximately four times longer than the mature form, and share a C-terminal distinctive pattern ..C...CXGXC...CC...CXCX.. containing seven cysteines, the active region of the proteins.

In this study we prepared a recombinant fusion protein, called TAT-OP1, including TAT sequence, an Arg rich peptide derived from HIV protein usually used to perform the cell transfection, and a portion of OP-1 sequence. The construct TAT-OP1, 162 aminoacids long, starts with an N-terminal 6His-tag followed by TAT sequence (all together 30 AA), a peptidase specific cleavage site (spanning 6 AA) and the C-terminal OP-1 domain (126 AA) containing the cysteines motive.

Obtained by recombinant DNA technology, the protein TAT-OP1 has been purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) and RP-HPLC, then characterized by SDS-PAGE, aminoacid analysis, UV, CD, and mass spectrometry.

In order to demonstrate the osteogenic potential of recombinant fusion protein TAT-OP1, we treated osteoblastic cell line MC3T3-E1 by using different treatment conditions (*pulse*- 200 nM and *in continous*- 5.5, 13.5 and 27 nM treatment).

After 7 and 14 days of cellular treatment performed by application of both stimulation methods, the presence of calcium salt deposits, alkaline phosphatase activity and the expression of osteogenic markers (osteopontin, osteocalcin and Cbfa1/Runx2) were detected by colorimetric and immunoflorescence assays.

To investigate the possible applications of this protein in bone tissue engineering, we developed a research model using adherent fibroblastic cells

ABSTRACT

isolated from umbilical cord blood (UCBMSCs) and a three-dimensional (3D) synthetic scaffold, named Puramatrix Hydrogel TM to mimic the native micro-environment. Moreover, PLGA micro-beads were employed to allow a controlled release of TAT-OP1 with the aim to maintain a suitable level of protein for prolonged times, enhancing its stimulation efficacy.

The primary cultures of UCBMSCs were separated by density-gradient method and were phenotypically characterized in 2D system for the expression of CD105, CD90, CD166, nestin, c-kit, CD31, CD34 and CD38 and for their multi-differentiative potential. As detected on MC3T3-E1 cells, TAT-OP1 demonstrated to stimulate nodule calcium formation and the expression of alkaline phosphatase when the cells were treated by both of stimulation methods.

After encapsulation into Puramatrix Hydrogel TM, the cellular response to TAT-OP1 stimulation was evaluated by using electron microscopy analysis, to detect the production of bone like ECM. After 27 days of stimulation with TAT-OP1 (200 nM), microfibrils were observed partially aggregated around the cells. Calcification nodules and Hydroxyapatite crystals were detected only in the cultures encapsulated into Puramatrix Hydrogel TM and treated with PLGA microspheres-controlled release system.

Further investigations will define the utility of this technical approach to improve the *in vitro* study of osteogenic differentiation and the biological activity of TAT-OP1 for clinical application in the field of bone tissue engineering.

INTRODUZIONE

1. *Ingegneria tissutale*

Nel nostro organismo molti sono i tessuti e gli organi che a causa di patologie o traumi non sono più in grado di svolgere le loro funzioni sia dal punto di vista anatomico che metabolico. Fino a poco tempo fa l'uso di protesi e, nei casi più gravi, il trapianto rappresentavano l'unica possibilità per far fronte a queste condizioni patologiche (Terada *et al.*, 2000).

Negli ultimi anni si sta sviluppando nel campo della medicina rigenerativa una nuova branca che prende il nome di *ingegneria tissutale*. Con questo termine, che traduce l'espressione anglosassone "*tissue engineering*" coniata ufficialmente nel 1988 dalla National Science Foundation, si indica quel campo multidisciplinare che realizza sostituti biologici, contenenti cellule vive e funzionali, per la rigenerazione, il mantenimento o il miglioramento delle prestazioni dei tessuti (Langer *et al.*, 1993). L'ingegneria tissutale rappresenta quindi il punto di incontro di diverse discipline scientifiche quali la medicina, la biologia, l'ingegneria e la chimica con lo scopo comune di ottenere o sostituire organi o parte di organi del corpo umano. In questo modo sarà possibile avere una valida alternativa al trapianto che, come è noto, presenta non pochi problemi fondamentali come la cronica carenza di donatori, i fenomeni di rigetto e la continua necessità di assumere farmaci immunosoppressori (Terada *et al.*, 2000).

In generale un costrutto di ingegneria dei tessuti è formato dalla componente cellulare e da una struttura di base con funzione di supporto. Le cellule, grazie alla produzione di matrice extracellulare, favoriscono l'interazione con il sito di impianto. Un grosso vantaggio di questa tecnica è che le cellule possono essere donate dal paziente stesso, queste una volta selezionate vengono fatte crescere *in vitro* e successivamente reimpiantate (Suh, 2000).

La struttura di base può essere costituita da una componente artificiale, di tipo polimerico, oppure da una componente naturale che garantisca un supporto alle popolazioni cellulari di interesse (*Figura 1*).

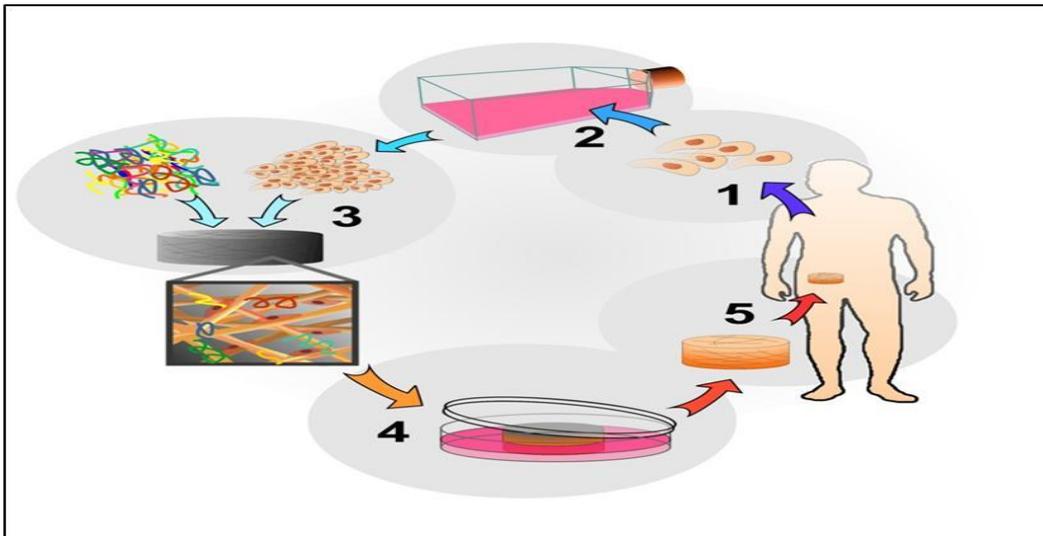


Figura 1. Schema riassuntivo: 1 espianto delle cellule dal paziente/donatore; 2 espansione *in vitro*; 3 realizzazione del costrutto cellule/matrice/fattori di crescita; 4 coltura delle cellule nella matrice; 5 reimpianto del costrutto nel paziente.

L'ingegneria dei tessuti pertanto ha come scopo quello di progettare organi e protesi andando a valutare l'interazione tra biomateriale e componente cellulare per favorire una rapida ed efficace rigenerazione del tessuto originario. Il supporto deve perciò essere biocompatibile e biodegradabile.

Per ottimizzare l'adesione e la crescita cellulare possono essere impiegati peptidi di adesione derivanti dalla sequenza RGD (arginina, glicina, acido aspartico), o dei proteoglicani del tipo KSRS (lisina, serina, arginina, serina). Un altro modo per favorire la proliferazione è quello di condizionare le matrici o aggiungere al terreno di coltura sequenze attive appartenenti a fattori di crescita specifici per il tipo di cellule impiegato.

2. Utilizzo di fattori di crescita nell'ingegneria tissutale

Perché la rigenerazione tissutale possa avere successo è indispensabile ricreare all'interno della matrice un ambiente del tutto simile a quello che le cellule hanno *in vivo*, in questo modo possono proliferare e differenziarsi in modo efficiente (Tabata, 2008). È necessario quindi fornire tutte quelle proteine, sia di

adesione che di crescita, con le quali le cellule sono a contatto nel loro ambiente naturale (Macri *et al.*, 2007).

I fattori di crescita possono essere utilizzati sia per promuovere che per prevenire la proliferazione cellulare, il differenziamento, la migrazione e l'adesione. In natura un singolo fattore può essere prodotto da più tipi cellulari e può avere azioni diverse in base al bersaglio cellulare sul quale va ad agire (Whitaker *et al.*, 2001). L'effetto osservato dipende in gran parte dalla concentrazione della proteina in esame, per questo, *in vivo*, esistono complicati quanto delicati sistemi di regolazione di sintesi e il tempo di emivita di tutti questi fattori è spesso molto breve, anche di soli pochi minuti (Nimni, 1997).

Si è pertanto capito che per le azioni che svolgono queste proteine hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella riparazione dei tessuti e sono quindi indispensabili nell'ingegneria tissutale (Baldwin and Saltzman, 1998).

Tra i fattori di crescita maggiormente studiati ed utilizzati possiamo ricordare il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine), HGF (fattore di crescita degli epatociti), FGF (fattore di crescita fibroblastica), NGF (fattore di crescita neuronale) che stimola la migrazione cellulare e l'estensione dei neuriti, EGF (fattore di crescita dell'epidermide) un potente stimolatore della proliferazione cellulare, la famiglia dei TGF- β (fattore di crescita trasformante) di cui fanno parte anche le BMP (proteine morfogenetiche dell'osso) che giocano un ruolo importante nello sviluppo di diversi tessuti ed organi (Babensee *et al.*, 2000).

Esistono diverse strategie per ottenere questi fattori di crescita, ad esempio è possibile purificarli da un estratto cellulare, utilizzare la terapia cellulare per stimolare la produzione *in vivo* oppure si può ricorrere alla tecnica del DNA ricombinante (Whitaker *et al.*, 2001).

3. BMP: proteine morfogenetiche dell'osso

Le BMP sono una famiglia di fattori multifunzionali che appartengono a loro volta alla grande famiglia del TGF- β (Chen *et al.*, 2004). La loro esistenza e le loro funzioni sono state scoperte tra gli anni sessanta e settanta da un chirurgo

ortopedico, Marshall Urist, il quale ha studiato la capacità del tessuto osseo decellularizzato di stimolare la formazione di nuovo tessuto una volta impiantato *in vivo*. Studi più approfonditi hanno dimostrato che questa capacità era dovuta alla componente organica e, precisamente, ad un insieme di proteine che hanno preso successivamente il nome di BMP (Urist *et al.*, 1973). Da quel momento è nato un grande interesse per questa famiglia di proteine e via via gli studi effettuati hanno dimostrato che le BMP giocano un ruolo importante sia nello sviluppo embrionale che nell'organismo adulto, sono infatti implicate nella formazione e nel mantenimento del tessuto cardiaco, neuronale, osseo e cartilagineo (Chen *et al.*, 2004). Le BMP inoltre stimolano la migrazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali durante l'embriogenesi e durante la riparazione e la rigenerazione tissutale nell'organismo adulto (Kingsley, 1994).

Ad oggi sono stati identificati e caratterizzati circa 20 membri di questa famiglia, tra i più studiati ricordiamo le BMP dalla 2 alla 8. Sono tutte proteine che mostrano una certa omologia di sequenza amminoacidica con il TGF- β , la forma attiva è rappresentata dal dimero e presentano tutte tre ponti disolfuro e una cisteina libera. Tutti i membri di questa famiglia vengono sintetizzati come lunghi precursori per poi essere tagliati da una proteasi specifica che libera la porzione matura e rende attiva la proteina (Celeste *et al.*, 1990).

3.1 Meccanismo d'azione delle BMP

Per comprendere la regolazione e il meccanismo d'azione delle BMP è stata fatta molta attenzione nei confronti della classe di recettori ad esse associata. Si è visto che per agire le BMP si legano a dei recettori di membrana di tipo serina – treonina chinasi formati da due unità distinte (I e II). Sono state identificati 3 tipi di unità I (BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-IA) (Koenig *et al.*, 1994) e tre di unità II (BMPR-II, ActR-II, ActR-IIB) (Yamashita *et al.*, 1995). I recettori BMPR-IA, IB, II sono specifici per le BMP, mentre i recettori ActR-II, IIB agiscono anche con altre proteine.

Il legame del ligando con il recettore permette la formazione di un complesso recettoriale attivato tetramerico formato da due unità I e due unità II (Moustakas and Heldi, 2002). Un ruolo importante, in questo meccanismo, viene svolto dalle proteine SMAD 1, 5, 8 che si trovano a livello delle unità I (Nishimura *et al.*, 1998); il legame di una BMP al recettore provoca la fosforilazione della proteina SMAD che si stacca dall'unità I e passa nel citoplasma dove è in grado di legarsi con SMAD 4. Il complesso così formato trasloca nel nucleo dove va ad attivare diversi fattori di trascrizione a seconda del tipo di cellula.

Ovviamente questo complicato meccanismo di trasmissione del segnale ha diversi sistemi di regolazione: a livello di membrana esiste un antagonista recettoriale per le BMP, Noggin (Groppe *et al.*, 2002), a livello citoplasmatico SMAD 6 può legarsi all'unità I e impedire la fosforilazione di SMAD 1, 5, 8 (Iamamura *et al.*, 1997); sempre nel citoplasma si trovano TOB, che è in grado di interagire con le proteine SMAD attivate e impedire che arrivino al nucleo (Yoshida *et al.*, 2000), e Smurf 1, un enzima ubiquitina ligasi E3, che promuove la degradazione delle proteine SMAD 1 e 5, dei fattori di trascrizione di tipo osteogenico e delle unità I del recettore (Zhu *et al.*, 1999) (Figura 2).

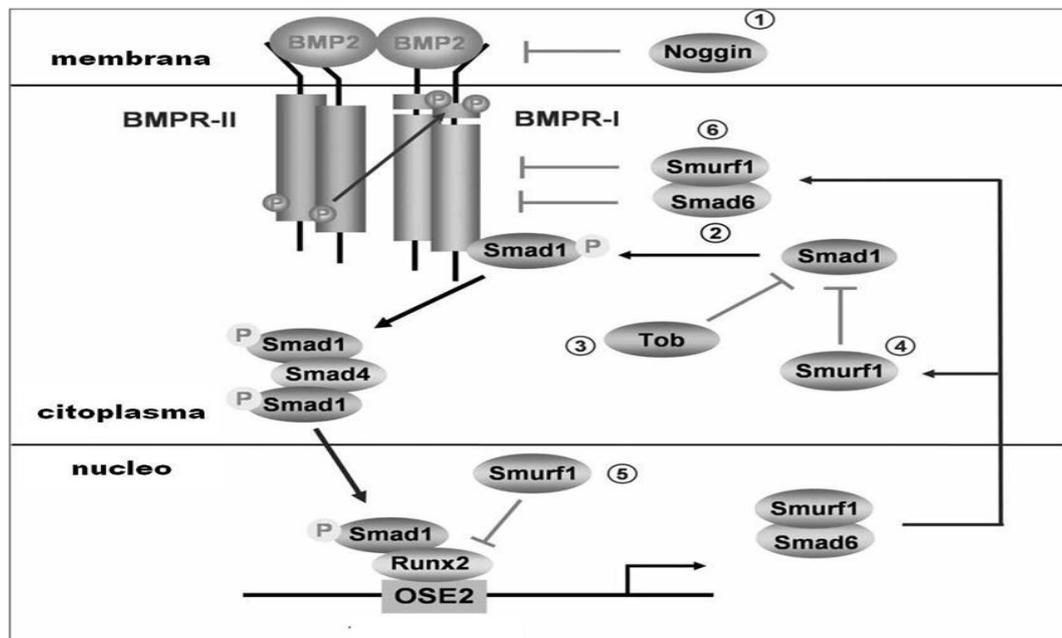


Figura 2. Schema del processo di trasmissione del segnale BMP dipendente. Sono inoltre rappresentati gli inibitori e la loro localizzazione all'interno della cellula (Chen *et al.*, 2004).

3.2 Ruolo fisiologico e farmacologico delle BMP

Per capire il ruolo fisiologico nella formazione di tessuto osseo delle BMP e dei loro recettori sono state utilizzate proteine ricombinanti in forma matura o delecta oppure si è indotta una sovraespressione delle unità recettoriali o dei loro antagonisti. Tutto ciò ha portato a capire che questa classe di proteine gioca un ruolo importante nella formazione di tessuto osseo, sia prima che dopo la nascita, sia per quanto riguarda la normale crescita che in seguito ad un trauma (Wozney, 2002). Si è capito inoltre che sono in grado di stimolare *in vivo* cellule staminali mesenchimali ed indirizzarle verso la linea osteogenica (Reddi, 2001).

Mediante l'utilizzo di animali transgenici si è potuto capire l'importanza dei geni delle BMP nello sviluppo di un organismo sano, in particolare la mancanza dei geni per le BMP-2 e 4 porta all'aborto spontaneo per il mancato sviluppo dello scheletro e degli annessi placentari (Winnier *et al.*, 1995 – Zhang *et al.*, 1996). La mancanza del gene per BMP-7 porta alla morte pretermine per gravi difetti dello scheletro, dei reni e degli occhi (Jena *et al.*, 1997).

Lo studio degli effetti di queste proteine *in vivo* è reso più complicato dal fatto che la loro forma attiva è costituita da un dimero, che molto spesso può anche essere costituito da due BMP diverse e, dato il considerevole numero di BMP, le probabili combinazioni sono notevoli. Gli eterodimeri sono difficilmente caratterizzabili in quanto sia l'espressione in forma ricombinante che la purificazione sono decisamente più difficoltose delle singole proteine. Nonostante questo si è riusciti a studiare alcuni eterodimeri e si è visto che questi hanno funzioni diverse rispetto ai rispettivi omodimeri (Israel *et al.*, 1996).

Rimane da capire ancora molto sul meccanismo d'azione di queste proteine e sulle loro interazioni, è comunque interessante notare che, anche se *in vivo*, la matrice contiene molte BMP che agiscono sinergicamente, *in vitro* l'utilizzo di una sola proteina è sufficiente per dare il via al processo osteoinduttivo (Sampath *et al.*, 1992).

Questo fatto ha reso più facile l'utilizzo clinico delle BMP nei casi in cui sia necessaria la formazione di nuovo tessuto osseo. Ad oggi esistono già dei farmaci a

base di BMP-2 e 7 ottenute con la tecnica del DNA ricombinante (Israel et al., 1992); un altro prodotto utilizzato per esperimenti sugli animali è a base di BMP estratte da matrice ossea di bovino. Questi prodotti possono avere effetti diversi a seconda del modo di utilizzo, infatti si sono ottenuti risultati migliori veicolando queste molecole tramite sistemi a base di collagene o di polimeri biodegradabili allo scopo di avere un effetto più localizzato e una minore perdita di proteina nel circolo sanguigno (Wozney, 2002).

Gli studi fatti hanno dimostrato che queste proteine sono in grado, una volta inoculate, di stimolare le cellule staminali mesenchimali dell'ospite, pertanto non è necessario, come per altri fattori di crescita, ricorrere all'estrazione e all'isolamento *ex vivo* di cellule donate dal paziente e del loro successivo reimpianto.

Ad oggi, le BMP sono l'unico modo per stimolare la crescita, il differenziamento cellulare e il rimodellamento tissutale *in vivo* ricorrendo semplicemente a degli appropriati sistemi di trasporto del farmaco.

Prima del loro utilizzo clinico è necessario comunque conoscere quali sono gli effetti collaterali. Nell'animale l'uso di queste proteine è risultato essere sicuro, solo in alcuni casi si è notato l'insorgere di eritema ed infiammazione nella sede di inoculo (Harwood *et al.*, 2005).

Esiste però un grosso limite all'utilizzo clinico delle BMP che è l'elevato costo di produzione sia delle proteine che dei sistemi di trasporto (Gautschi *et al.*, 2007). Infatti ad oggi le BMP con migliore attività sono prodotte in *E. Coli* e successivamente rinaturate *in vitro*. Questa tecnica ha una bassissima resa ed elevati costi di realizzazione. Per questi motivi l'uso clinico di queste molecole è ancora molto limitato (Vallejo *et al.*, 2002; Marcucci *et al.*, 2005).

4. *Osteogenic protein 1: OP-1*

Tra le BMP umane la prima ad essere clonata nel 1990 è stata OP-1 (*Osteogenic Protein 1*), chiamata anche BMP-7 (Ozkaynac *et al.*, 1990). Negli anni immediatamente successivi è stato dimostrato che anche OP-1 in forma ricombinante è in grado di indurre la formazione di nuovo tessuto osseo tramite la stimolazione di cellule staminali mesenchimali (Sampath *et al.*, 1992).

Dallo studio della sequenza genica si è dimostrato che questa proteina presenta al C-terminale il dominio con 7 cisteine caratteristico dei membri della famiglia del TGF- β (C...CXGXC...CC...CXCX).

La corretta configurazione prevede la formazione di tre ponti disolfuro tra le cisteine in posizione 300-396, 359-428 ed infine 363-430, la cisteina in posizione 395 rimane libera.

Come tutti i membri di questa famiglia anche OP-1 viene secreta in forma di precursore circa 4 volte più lungo della forma matura e attiva che va dalla serina 300 all'istidina 431. Per quanto riguarda la porzione attiva esiste un'alta omologia di sequenza con tutte le altre proteine della famiglia, mentre non è così per la porzione N-terminale. Tra il precursore e il dominio con le 7 cisteine c'è un piccolo peptide di 6 aminoacidi (serina 300 – lisina 305) che funge da segnale per il sito di taglio da parte di una proteasi tripsino-simile (Brunner *et al.*, 1988) (*Figura 3*).

Anche se la funzione viene svolta dal dominio C-terminale la porzione a monte è molto importante per consentire *in vivo* la corretta configurazione della parte attiva.

Come tutte le BMP anche OP-1 per agire a livello dei recettori deve dar luogo ad un dimero tramite un ponte disolfuro che si forma tra le cisteine in posizione 395 di due monomeri diversi.

Sono stati eseguiti molti studi per capire quale fosse la struttura tridimensionale di OP-1, questo è indispensabile per comprenderne il meccanismo d'azione e l'esatta interazione con i recettori.

La forma matura di OP-1 correttamente ripiegata dà luogo ad un motivo a chiave greca di dimensioni approssimative 60Å x 20Å x 15Å (Griffith *et al.*, 1996). Caratteristica del motivo a chiave greca è che l'ordine dei filamenti β antiparalleli non segue l'ordine che essi hanno nella catena peptidica. Per questa ragione, uno dei *loop* presenti in questo motivo risulta essere molto lungo.

OP-1 è formata da 8 filamenti a foglietto β che danno luogo a due porzioni distinte, *finger 1* e *finger 2*, ed un filamento ad α -elica compreso tra il terzo ed il quinto residuo di cisteina disposti nello spazio come mostrato in *figura 4*.

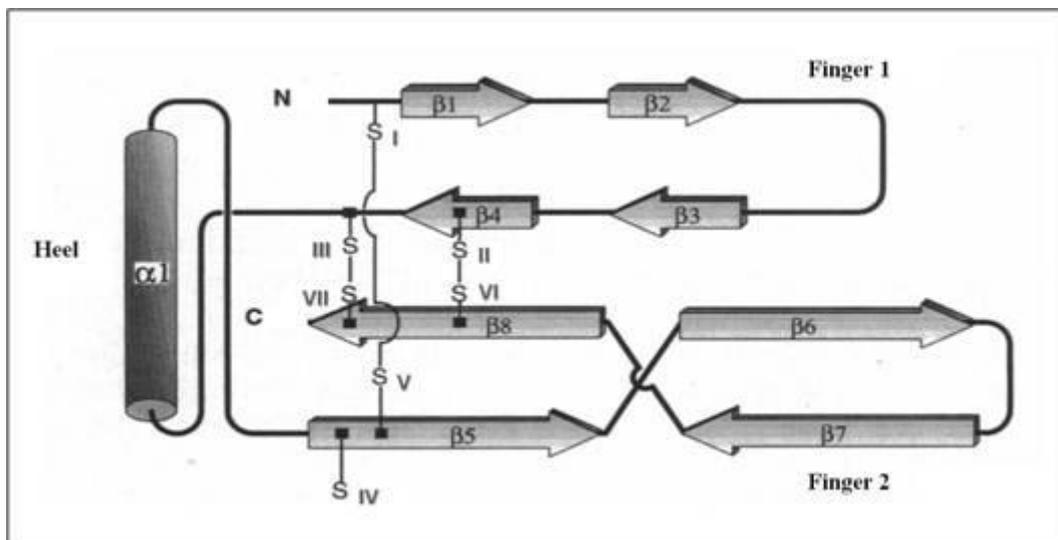


Figura 4. Rappresentazione grafica di OP-1 matura (residui 299-431) nella corretta configurazione: le 7 cisteine formano 3 ponti disolfuro (II-VI, III-VII, I-V) attorno agli 8 frammenti a foglietto β . Questi danno luogo a due estroflessioni (*Finger 1* e *Finger 2*) che hanno origine dalla porzione ad α -elica (*Heel*) (Griffin *et al.*, 1996).

I filamenti β sono costituiti da: $\beta 1$, lisina 331 – istidina 333; $\beta 2$, tirosina 336 – serina 338; $\beta 3$, acido glutammico 352 – alanina 355; $\beta 4$, tirosina 357 – acido glutammico 362; $\beta 5$, cisteina 395 – asparagina 402; $\beta 6$, isoleucina 404 – acido aspartico 410; $\beta 7$, asparagina 414 – tirosina 420; ed infine $\beta 8$, valina 424 – istidina 431. In particolare i filamenti da $\beta 1$ a $\beta 4$ danno origine alla porzione *finger 1*, mentre da $\beta 5$ a $\beta 8$ a *finger 2*.

La porzione ad α -elica si estende dalla tirosina 82 all'isoleucina 94 e dà luogo ad un'elica lunga 3,5 giri con caratteristiche anfipatiche, pertanto contiene sia

residui amminoacidici idrofobici che idrofilici. La struttura elicoidale contribuisce inoltre a stabilizzare la formazione del dimero (Griffin *et al.*, 1996).

Pertanto si può concludere che il dimero si forma dall'associazione della regione ad α -elica di un monomero con le regioni *finger* 1 e 2 di un altro monomero, tale legame è reso stabile dalla formazione del ponte disolfuro tra le cisteine in posizione 395 dei due monomeri.

5. Domini di trasduzione proteica: TAT

Le nuove frontiere della medicina rendono sempre più necessario poter far utilizzare alle cellule proteine o peptidi con azione terapeutica. Ad oggi la tecnica maggiormente impiegata è quella della terapia genica. Con questo termine si intende l'inserzione di materiale genetico, DNA, all'interno delle cellule per fare in modo che queste poi provvedano all'espressione del gene di interesse. Esistono diversi modi per raggiungere tale scopo, è possibile infatti ricorrere a tecniche di trasfezione virale che prevedono l'utilizzo di adenovirus (Kugler *et al.*, 2003), virus adenoassociati (Shimazaki *et al.*, 2000), lentivirus (Kordower *et al.*, 2000) ed herpes virus (Antonawich *et al.*, 1999). Tutti questi sistemi presentano delle limitazioni all'uso *in vivo*, in quanto possono scatenare una risposta immunitaria sia immediata, che a lungo termine, in alcuni casi possono dare neurotossicità o presentare delle limitazioni nelle dimensioni del materiale genetico da inserire. Inoltre sono ancora sconosciuti gli effetti a lungo termine sul paziente (Check E. *et al.*, 2002).

Pertanto si è pensato di ricorrere ad altri sistemi, tra questi ricordiamo le proteine ricombinanti. Queste vengono prodotte, purificate e rinaturate *in vitro* e successivamente somministrate. Anche questo sistema non è molto efficiente in quanto le proteine ricombinanti spesso non possiedono la stessa attività delle proteine naturali o, comunque, prodotte direttamente dalle cellule. È molto difficile ottenere buone quantità di proteina in forma nativa utilizzando le tecniche *in vitro*, il processo oltre ad avere generalmente una bassissima resa, risulta essere anche molto costoso. Inoltre la somministrazione di proteine *in vivo* presenta dei

problemi legati ai normali processi di trasporto e di degradazione presenti all'interno dell'organismo (Schwarze *et al.*, 1999).

Un grosso passo in avanti è stato fatto con la scoperta di peptidi con la funzione di trasportatori proteici, denominati domini di trasduzione proteica (PTD). I PTD si sono dimostrati capaci di trasportare farmaci e proteine con dimensioni fino a 110 kDa all'interno di diversi tipi cellulari (Dietz *et al.*, 2004). È stata inoltre dimostrata l'efficacia di questi domini nel trasporto sistemico di proteine *in vivo* (Schwarze *et al.*, 1999).

Tra questi il più utilizzato è un dominio appartenente al virus dell'HIV denominato TAT. Questo dominio è stato scoperto e caratterizzato nel 1988 da due gruppi di ricerca distinti: Green e Loewenstain e Frankel e Pabo (Green and Loewenstain, 1988; Frankel and Pabo, 1988).

Nel virus dell'HIV TAT è una proteina di 86 amminoacidi ed è responsabile del trasporto delle proteine virali all'interno della cellula.

Si è visto che la porzione attiva coinvolta nel trasporto proteico è costituita da 11 amminoacidi, di questi molti hanno caratteristiche basiche: **Y G R K K R R Q R R R** (Fawell *et al.*, 1994). La presenza di amminoacidi basici è una caratteristica che accomuna tutti i PTD fino ad ora caratterizzati.

Studi successivi hanno dimostrato che questo dominio è in grado di trasportare anche proteine diverse da quelle virali. In particolare si è visto che un trasporto più efficiente si ottiene quando le proteine sono nello stato denaturato. Una volta all'interno la cellula provvede alla rinaturazione e alla conseguente attivazione della proteina (Frankel and Pabo, 1988). Questo sistema consente di evitare tutti quei passaggi di rinaturazione *in vitro* che, come detto in precedenza, generalmente non hanno buone rese. Inoltre utilizzando questi trasportatori è possibile inoculare direttamente la proteina di interesse nella sede desiderata e, cosa molto importante, il processo di internalizzazione è molto più rapido rispetto alle proteine non veicolate. È possibile così evitare gran parte dei processi di degradazione proteolitica presenti nell'organismo.

Nonostante i numerosi studi a riguardo non è ancora noto tutto il meccanismo che permette ai PTD di portare il loro carico all'interno della cellula.

Si è capito che un ruolo importante viene svolto dagli amminoacidi basici, si pensa che siano coinvolti una serie di legami idrogeno tra il foglietto fosfolipidico idrofobico della membrana plasmatica e i gruppi idrofilici degli amminoacidi basici (Wright *et al.*, 2003). Questo però non è sufficiente per spiegare l'intero meccanismo. Si è visto che TAT, come tutti gli altri PTD, non utilizza i classici sistemi di trasporto, non esiste infatti un trasportatore specifico, e non vengono nemmeno utilizzati sistemi mediati da endosomi (Joliot *et al.*, 1991). L'elevata densità di carica a pH fisiologico posseduta da questi peptidi esclude il trasporto passivo dovuto alla differenza di gradiente di concentrazione (Kim *et al.*, 2006), alcuni esperimenti hanno messo in evidenza, infatti, che in alcuni tipi cellulari il trasporto coinvolge un dispendio di energia, sottoforma di ATP, mentre in altre cellule questo fenomeno è completamente assente (Mann and Frankel, 1991).

Si sono osservati comportamenti diversi variando le caratteristiche e le dimensioni delle proteine da trasportare.

Tutti questi aspetti limitano l'uso di questi sistemi *in vivo*, almeno per il momento, infatti ciascun prodotto di fusione con un PTD necessita di studi appropriati sia per quanto riguarda l'efficienza del trasporto che l'attività una volta all'interno della cellula. Anche gli aspetti di tossicità variano molto da caso a caso. Pertanto un grosso limite all'utilizzo dei PTD, in genere, è il grosso lavoro di ricerca e sviluppo necessario per ogni singolo prodotto. Questo aspetto rende molto lunghi i periodi di sperimentazione e validazione dei costrutti (Lindsay, 2002).

6. La proteina ricombinante TAT-OPI

La proteina ricombinante utilizzata in questo lavoro di tesi è costituita da 162 amminoacidi e può essere suddivisa in due porzioni.

L'N-terminale è formato da 30 amminoacidi ed è costituito dagli 11 amminoacidi di TAT e le sei istidine necessarie per il processo di purificazione della proteina come descritto nella Parte Sperimentale.

Il C-terminale è formato da 132 aminoacidi che corrispondono ai residui 300 – 431 della proteina nativa e costituiscono la porzione attiva di OP-1. Questa porzione comprende quindi sia il peptide di 6 aminoacidi che funge da segnale per il sito di taglio da parte di un enzima tripsino-simile che il dominio con le sette cisteine (Figura 5).

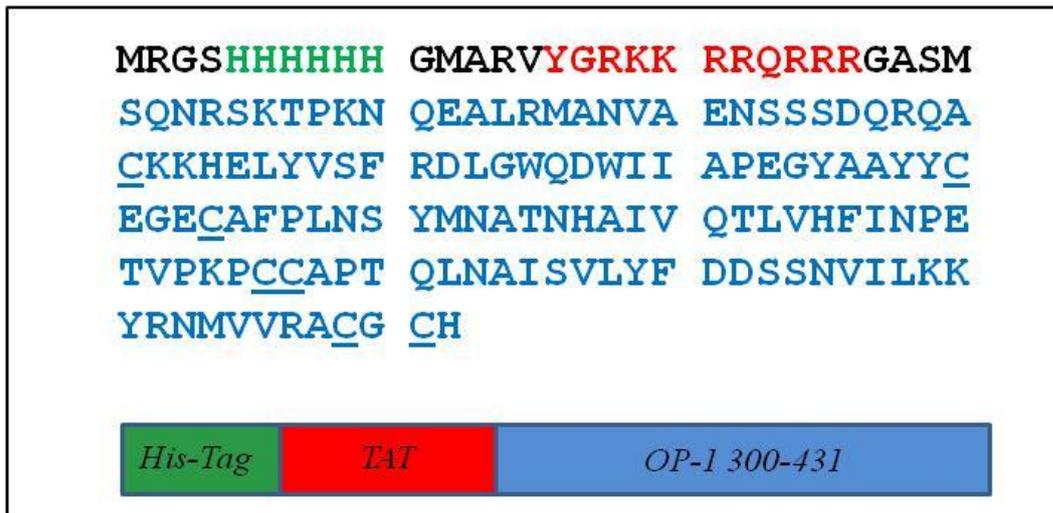


Figura 5. Sequenza e rappresentazione schematica di TAT-OP1.

Per come è stato ideato TAT-OP1 si presenta come un costrutto ideale per applicazioni in ingegneria tissutale per la rigenerazione del tessuto osseo.

È presente infatti la porzione attiva della proteina OP-1 che, come detto, è un potente fattore stimolante il differenziamento osteogenico. Possiede inoltre la sequenza TAT, che rende possibile la traslocazione intracellulare della proteina.

Proprio la presenza del peptide TAT costituisce un grosso vantaggio per l'utilizzo del costrutto per studi *in vitro* ma, soprattutto per una sua eventuale applicazione *in vivo*. Sarà quindi possibile utilizzare la proteina ricombinante OP-1 senza dover ricorrere a processi di rinaturazione *in vitro*, che, come detto in precedenza, sono molto costosi e hanno rese molto basse. Il dominio TAT rende inoltre possibile la somministrazione della proteina evitando molti processi di degradazione enzimatica normalmente presenti nell'organismo.

PARTE SPERIMENTALE

1. Materiali

I composti chimici più semplici utilizzati in questo lavoro di tesi, sodio cloruro, sodio fosfato monobasico e bibasico, potassio cloruro, potassio fosfato mono e bibasico, EDTA, DTT, agarosio, acido cloridrico, TRIS, Etidio Bromuro, glicerolo etc. etc. sono stati acquistati dalla Fluka (Basel, Svizzera), dalla Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri) o dalla Merck (Darmstadt, Germany) e possedevano un grado di purezza elevata idonea all'utilizzo. Il materiale plastico per la biologia cellulare è stato fornito dalla BD Falcon (San Jose, California), mentre terreni, siero FBS e antibiotico da Gibco-Invitrogen. Di altri materiali è stata specificata la provenienza commerciale nel testo.

2. Clonaggio del gene di OP-1

Per effettuare il clonaggio del gene di interesse sono state utilizzate tecniche di biologia molecolare qui di seguito riportate.

2.1 PCR: reazione polimerasica a catena

La PCR (Mullis *et al.*, 1986) consente di amplificare *in vitro* uno specifico frammento di DNA compreso tra due segmenti oligonucleotidici detti *primer*. La reazione procede attraverso una serie di cicli che permettono, mediante la variazione periodica della temperatura, la denaturazione del DNA stampo, l'appaiamento degli oligonucleotidi alle sequenze complementari e la polimerizzazione del DNA da parte di una DNA polimerasi termostabile (TAQ polimerasi).

Il protocollo prevede che in un apposito tubo da PCR vengano uniti insieme: 1 µl di una miscela di deossiribonucleotidi trifosfato, 1 µl di soluzione del DNA

contenente la sequenza di OP-1 (10-100 ng), 40 µl di acqua mQ, 1 µl di enzima TAQ polimerasi (kit per PCR della Roche, Basel, Switzerland) e 1 µl di ciascuno dei due *primer* (sintetizzati da SIGMA-Genosys):

5' GCACTAGTATGAGCCAAAACCGCTCAAAGACGC 3'

Spe I

5' CGGAATTCTAGTGCAGCCACAGGCCCGGACC 3'

EcoR I

A questa soluzione viene aggiunta una goccia di olio per impedire l'evaporazione del solvente. Per far avvenire la reazione è stato utilizzato il DNA-Thermal Cycler (Perkin Elmer, Cupertino, California) programmato nel seguente modo:

1. 94°C per 30 secondi per permettere la denaturazione del DNA e la separazione dei filamenti;
2. 54°C per 1 minuto in modo da rendere possibile l'appaiamento (annealing) dei *primer* con le sequenze complementari sul DNA stampo;
3. 72°C per 3 minuti per consentire all'enzima TAQ polimerasi di lavorare in condizioni ottimali e permettere quindi la polimerizzazione del DNA stampo.

Al termine della reazione, un'aliquota di campione è stata controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

2.2 Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi del DNA viene eseguita attraverso elettroforesi su gel di agarosio all'1%. Tale tecnica sfrutta le cariche negative portate dai gruppi fosfato presenti nella doppia elica, queste permettono la migrazione verso il polo positivo della molecola di DNA se sottoposta ad un campo elettrico.

Per la preparazione di un gel all'1% si pesano 0,6 g di agarosio, si aggiungono 60 ml di tampone di corsa, detto TAE contenente: 0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA, e si scalda il tutto fino ad ebollizione e al completo scioglimento dell'agarosio. A questo punto si raffredda e si aggiunge 1 µl di Etidio Bromuro (10 mg/ml). Questa sostanza, intercalante del DNA, ha proprietà fluorescenti se esposta alla luce ultravioletta (300 nm) e permette quindi di rilevare i diversi frammenti migrati nel gel alla fine della corsa elettroforetica. Dopo aver aggiunto l'Etidio Bromuro si lascia polimerizzare il gel per circa 20 minuti. Si possono caricare quantità di DNA pari a 1-2 µg, mescolati con 2 µl di soluzione colorante (0,25% blu di Bromofenolo, 30% glicerolo). Il glicerolo rende densa la soluzione in modo da non disperdere il campione al di fuori del pozzetto, mentre il blu di bromofenolo rende possibile la visualizzazione del fronte durante la corsa. Questa viene condotta a temperatura ambiente su apparecchiatura per elettroforesi orizzontale Hoefer HE 33 mini (Hoefer, San Francisco, California) applicando una corrente costante di 80V utilizzando il DNA apparatus (Biorad, Richmond, California). È stato utilizzato uno standard di pesi molecolari di DNA (Sigma) in modo da determinare, per confronto, il peso dei frammenti di interesse. Al termine della corsa, le bande sono state evidenziate per mezzo di un transilluminatore a raggi UV di tipo Hoefer Macro Vue UVis-20 (Hoefer), dotato di una lampada a 302 nm.

Quando necessario è possibile purificare i frammenti di DNA dopo la corsa elettroforetica mediante il taglio della banda dal gel e utilizzo del kit di estrazione GENE CLEAN Turbo Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le istruzioni date dal fornitore.

2.3 Taglio enzimatico del DNA con endonucleasi di restrizione

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica che riconoscono e tagliano in modo specifico il DNA così da poter selezionare determinate sequenze utili per il clonaggio. Ognuno di questi enzimi ha un'attività ottimale a determinati valori di pH e salinità. Per questo motivo quando si effettua

un'analisi di restrizione si deve preparare una miscela di 20 μ l contenente: 2 μ g di DNA, 10U di enzima di restrizione (Roche), diluito nel suo tampone ottimale, si porta quindi a volume con acqua mQ e si mette il tutto a 37°C per 2 ore o più. In questo lavoro sono stati utilizzati gli enzimi: *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI*, *NheI*.

2.4 Ligazione

La ligazione è una metodica utilizzata per inserire frammenti di DNA negli appositi vettori di espressione tramite l'uso dell'enzima T4 DNA ligasi. La reazione, in questo caso, ha previsto l'utilizzo di 7 μ l di DNA (2 μ l di vettore pTAT- α -synA30P e 5 μ l di inserto corrispondente alla sequenza matura di OP-1 ad una concentrazione di 0,5 μ g/ μ l), 10 μ l di acqua mQ, 2 μ l di soluzione di ligazione (10 mM ATP, 0,5 M Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 μ g/ml BSA, pH 7,6), 1 μ l di enzima T4 ligasi (Roche). Si incuba la miscela tutta la notte a 14°C.

La temperatura è un parametro importante in quanto deve assicurare sia l'appaiamento della doppia elica del DNA, che si ottiene a basse temperature, sia la funzionalità dell'enzima, che lavora in condizioni ottimali a 37°C, pertanto la temperatura di esercizio è una temperatura di compromesso. Questa reazione porta alla formazione del plasmide pTAT-OP1. Per ottenere quantità di DNA plasmidico adatte per i successivi esperimenti è stato necessario ricorrere alla trasformazione in batteri *E. Coli* sia di tipo TOP10 che BL21.

2.5 Preparazione di cellule competenti

Per trasformare i batteri con i plasmidi utilizzati in questo lavoro di tesi è stato necessario renderli competenti. Questo trattamento consiste nel rendere permeabile la membrana plasmatica al materiale genetico proveniente dall'ambiente esterno. Nel nostro caso le cellule sono state rese competenti grazie al trattamento con 0,1 M CaCl₂. Le cellule batteriche sono state piastrate su una piastra Petri senza antibiotico e fatte crescere tutta la notte a 37°C. Al termine dell'incubazione è stata prelevata una colonia ed è stata fatta crescere in 5 ml di terreno LB (10 g di

triptone, 5 g di estratto di lievito e 10 g di NaCl per ogni litro di terreno, il tutto sterilizzato in autoclave a 121°C) per una notte a 37°C sotto agitazione. I batteri ottenuti sono stati centrifugati, risospesi in 200 ml di terreno LB e fatti crescere fino ad una densità ottica a 590 nm di 0.45-0,55 O.D. Dopo diversi stadi di lavaggio con una soluzione di 0,1 M CaCl₂ fredda e successiva centrifugazione a 2000 rpm per 10 minuti a 4°C, i batteri sono stati risospesi in 0,1 M CaCl₂ contenente 15% di glicerolo e lasciati a 4°C per una notte. Successivamente sono stati suddivisi in aliquote, congelati in ghiaccio secco e conservati a -80°C.

2.6 Trasformazione batterica

Una volta resi competenti è possibile trasformare i batteri *E. Coli* con il plasmide di interesse. Il protocollo prevede l'utilizzo di 500 ng di DNA plasmidico per ciascuna aliquota di cellule competenti (100 µl circa). Il mix viene lasciato per 30 minuti in ghiaccio (4°C). Successivamente si procede con lo *shock termico*, portando prima la temperatura a 42°C per un tempo breve, variabile a seconda del ceppo batterico (1,5 minuti per le TOP10, 40 secondi per le BL21) e riportandola poi a 4°C per 2 minuti. Questo trattamento rende più alta la resa di trasformazione. A questo punto si aggiunge 1 ml di terreno LB e si mette ad incubare sotto lenta agitazione (a circa 200 rpm) a 37°C per un tempo variabile: 40 minuti per le TOP10, 1 ora e 15 minuti nel caso delle BL21. Al termine del periodo di crescita, la sospensione batterica viene centrifugata a 4000 rpm per 5 minuti e seminata su una piastra Petri con ampicillina (100 µg/ml). Questo serve per permettere la crescita solo delle colonie che hanno assunto il DNA, infatti in tutti i plasmidi utilizzati è presente un gene che codifica per la resistenza nei confronti dell'ampicillina.

2.7 Ceppi utilizzati

Per questo lavoro di tesi sono stati utilizzati due ceppi batterici di *E. coli*: TOP10 e BL21, forniti da Stratagene (Cedar Creek, Texas), adatti per scopi

diversi. Il ceppo TOP10 è stato geneticamente modificato in modo da renderlo idoneo per l'amplificazione dei vettori di clonaggio ed è in grado di replicare il DNA plasmidico in maniera efficiente evitando eventuali riarrangiamenti che potrebbero modificare la sequenza nucleotidica che si vuole amplificare. Il ceppo BL21, invece, è utilizzato per esprimere le proteine ricombinanti, esso è stato ingegnerizzato per poter controllare l'espressione del gene di interesse in modo da far esprimere la proteina ricombinante solo al momento opportuno e ridurre così l'eventuale tossicità di questa per il microrganismo ospite. In questo ceppo batterico è stata introdotta il gene per la RNA polimerasi del fago T7 posto sotto il controllo dell'operone lac presente nel DNA batterico ma represso costitutivamente dal prodotto del gene lac I. L'operone è inducibile con lattosio o con analoghi come l'isopropil β -tiogalattopiranoside (IPTG) che, non essendo un prodotto batterico, deve essere aggiunto dall'esterno. In questo modo la polimerasi T7 non viene trascritta in quantità significativa finché non viene attivato l'operone lac.

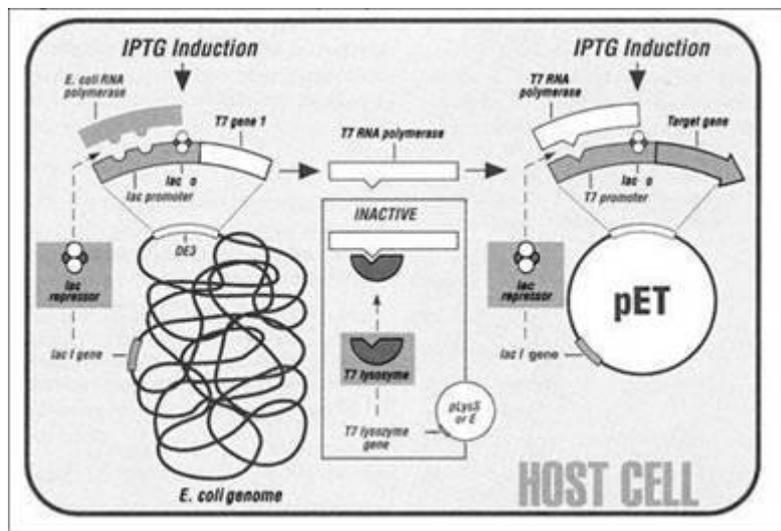


Figura 6. Funzionamento del sistema di espressione presente in *E. coli* (BL21): La figura mostra il sistema di repressione e l'induzione dell'espressione per aggiunta di IPTG che sblocca il repressore.

Per fare in modo che la proteina non venga espressa prima del tempo si trasforma questo tipo di cellule batteriche con un plasmide che contenga il gene di

interesse posto sotto il controllo del promotore T7. Pertanto il messaggero e la relativa proteina non vengono sintetizzati fino a quando la RNA polimerasi T7 non viene sintetizzata, e questo avviene solo in seguito all'aggiunta dell'IPTG nel terreno di coltura che induce il distacco del repressore lac I sia dal promotore della T7 RNA polimerasi, sia dal promotore posto sul plasmide (*Figura 6*).

2.8 Screening delle colonie

Lo screening delle colonie ricombinanti serve per isolare la colonia in cui è presente il plasmide pTAT-OP1. Infatti gli eventi di ligazione non sono molto efficienti in quanto la cinetica di chiusura del vettore su se stesso è favorita rispetto all'inserzione di DNA estraneo. Per controllare l'avvenuta inserzione è necessario estrarre e purificare il DNA plasmidico delle singole colonie, frammentarlo con enzimi di restrizione e sottoporlo ad analisi elettroforetica su gel di agarosio per verificare la corretta lunghezza dei frammenti ottenuti.

2.9 Purificazione del DNA plasmidico

Il processo di purificazione, descritto di seguito, prevede la trasformazione del vettore di clonaggio in TOP 10 e la crescita su piastra Petri *overnight*. In questo modo si ottengono, sulla piastra, una serie di colonie separate. A seconda delle esigenze è possibile seguire due diverse purificazioni:

Mini Prep (Qiagen kit): con questo termine viene identificata la tecnica meno precisa che consente lo screening di un alto numero di colonie, ad un costo economico modesto e in tempi molto veloci, serve per individuare la colonia più idonea alla successiva purificazione più accurata.

Diverse colonie (di solito 24) vengono prelevate dalla piastra Petri, vengono fatte crescere in 3 ml di terreno LB a 37°C, sotto agitazione, per 6-7 ore. La sospensione batterica, dopo la crescita, viene centrifugata (1 minuto a 14000 rpm), il surnatante viene eliminato e il pellet batterico sottoposto a purificazione utilizzando le istruzioni fornite con il *kit Qiagen*.

Midi Prep mediante colonna Qiagen: con questa tecnica, che utilizza il Qiagen Plasmid Kit, è possibile ottenere DNA più puro e di conseguenza più stabile nel tempo, adatto per essere sottoposto a sequenziamento. In questo caso si procede alla purificazione di una singola colonia che viene fatta crescere in 50 ml di terreno LB, addizionato di antibiotico, per una notte a 37°C e sotto agitazione. Il giorno dopo si centrifuga la sospensione a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. Si effettua quindi la risospensione, la lisi alcalina e la neutralizzazione seguendo il protocollo fornito con il kit.

Dopo aver purificato il DNA plasmidico è necessario conoscere la sua esatta concentrazione. Quest'analisi viene condotta per via spettrofotometrica servendosi di uno spettrometro UV-VIS (Lambda-20, Perkin-Elmer), su un'aliquota del campione. Per una stima quantitativa della concentrazione di DNA si valuta l'assorbanza a 260 nm, dove assorbono maggiormente gli anelli aromatici dei nucleotidi, di un campione opportunamente diluito, generalmente 1:100, in acqua mQ. La misura si basa sul fatto che ad 1 unità di densità ottica a 260 nm corrispondono 50 µg/ml di DNA a doppia elica.

3. Espressione e purificazione di TAT-OP1

3.1 Mini espressione di proteine

Prima di far esprimere la proteina ricombinante TAT-OP1 su larga scala si può effettuare una mini espressione per verificare che la proteina in esame venga effettivamente espressa dalle cellule batteriche. Il protocollo prevede la trasformazione con il plasmide di espressione procariotico pTAT-OP1, nel quale il gene clonato è posto sotto il controllo del promotore del fago T7, in ceppo batterico BL21 (Studier e Moffatt, 1986). In seguito si preleva uno striscio di colonie dalla piastra e si fa crescere sotto agitazione per 3 ore a temperatura ambiente in 4 ml di LB dove sono stati aggiunti sia l'antibiotico (ampicillina 100 mg/ml) che l'induttore della sintesi della proteina ricombinante IPTG (100 mg/l). Trascorso questo tempo vengono prelevati 500 µl della sospensione batterica e

centrifugati per 1 minuto a 14000 rpm. Dopo aver eliminato il surnatante si risospende il pellet in 150 μ l della soluzione di lisi (tampone LSB: Laemmli Sample Buffer) contenente SDS e β -mercaptoetanolo. I campioni vengono quindi preparati per essere sottoposti ad elettroforesi SDS-PAGE.

3.2 Espressione di proteine su vasta scala

Questa metodica serve per ottenere maggiori quantità della proteina di interesse. Il protocollo è analogo al precedente ma, in questo caso, si devono trasferire tutte le colonie presenti nella piastra Petri in 2 litri di terreno LB, addizionato di ampicillina (100 mg/l). L'inoculo viene fatto crescere sotto agitazione a 37°C fino a una densità ottica di circa 0,6 O.D. (misurata a 600 nm) e quindi si aggiunge IPTG (100 mg/l) per dare inizio alla produzione della proteina. Dopo 4 ore dall'induzione si centrifuga la sospensione batterica a 5500 rpm per 15 minuti e si risospende il pellet in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2). Infine si centrifuga nuovamente a 3500 rpm per 20 minuti e si elimina il surnatante. Il pellet così ottenuto può essere conservato a -20°C.

3.3 Purificazione di proteine dal pellet batterico

Le proteine estranee contenenti *His-tag*, ed espresse in batteri con tecniche ricombinanti, possono essere estratte mediante sonicazione e purificate mediante cromatografia IMAC.

Dopo aver scongelato il pellet batterico si procede con un primo lavaggio in PBS in modo da eliminare i residui del terreno di cultura. Si risospendono i batteri in una soluzione di cloruro di guanidinio 6 M a pH 8,0 e si procede alla sonicazione fino a completa rottura della parete e della membrana batterica. Ad ogni stadio di sonicazione si aumenta il volume e, tra una sonicazione e l'altra, la sospensione viene tenuta in ghiaccio per evitare di danneggiare le proteine. Si

centrifuga infine a 12000 rpm per 20 minuti e si conserva il surnatante per la cromatografia IMAC.

3.4 Cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati (IMAC)

Le proteine sono in grado di dare dei complessi con alcuni ioni metallici grazie alla presenza di gruppi chimici polarizzabili presenti nei residui amminoacidici contenenti N, O, S, come His, Tyr, Cys, Trp. Questa caratteristica viene sfruttata nella cromatografia IMAC: Ion Metal Affinity Chromathography (Porath *et al.*, 1975; Hochuli, 1990). La resina (Qiagen), con la quale viene impaccata la colonna per cromatografia IMAC, è stata derivatizzata con dei gruppi chimici capaci di dare dei chelati con i metalli. Per aumentare il potere risolutivo di questa tecnica cromatografica e facilitare la separazione della proteina di interesse dalle altre si usa l'artificio di introdurre sei istidine addizionali e contigue (*6xHis-tag*) nella sequenza della proteina tramite l'utilizzo di un apposito plasmide. La porzione *His-tag* è inserita all'estremità N o C-terminale. In questo modo la molecola proteica acquista un'elevata affinità per la fase stazionaria grazie alle interazioni di 6 anelli imidazolici in grado di formare legami di coordinazione con il metallo.

La proteina di interesse TAT-OP1 contiene la *6His-tag* e si legherà fortemente alla resina IMAC mentre le altre, meno affini, saranno eluite con il fronte o eliminate durante le fasi di lavaggio. Nel protocollo da noi utilizzato, la miscela proteica, proveniente dalla lisi batterica, è stata messa a contatto con la resina IMAC per 1 ora a temperatura ambiente sotto lenta agitazione. La resina utilizzata è del tipo NiNTA (Qiagen) e contiene Ni⁺⁺ fissato a *beads* di Sepharose mediante il chelante nitrilotriacetato (NTA). La proteina, contenendo la coda di 6 His, ha una elevata affinità e si complessa saldamente alla resina. Dopo il periodo di contatto, la resina viene impaccata in una colonna cromatografica e lavata con 75 ml di tampone 6 M Guanidinio cloruro, pH 8,0, e, successivamente, con 75 ml di tampone 8 M Urea pH 8,0 per eluire le proteine poco affini. Infine TAT-OP1 è stata staccata applicando un'alta concentrazione di Imidazolo 0,5 M in Urea 8,0 M

a pH 4,5. L'imidazolo agisce da competitore nei confronti delle istidine della proteina.

Le frazioni sono state raccolte monitorando il segnale di assorbimento a 280 nm con un rivelatore nell'ultravioletto.

3.5 Cromatografia di gel filtrazione

Le frazioni di interesse contenenti la proteina TAT-OP1 sono state sottoposte a cromatografia di gel filtrazione per eliminare l'urea presente. Per questa cromatografia è stata utilizzata la colonnina PD10 preimpaccata con gel Sephadex G-25 (Pharmacia). La PD10 è stata lavata con 60 ml di PBS contenente 15% glicerolo (v/v) e successivamente è stato caricato il campione contenente TAT-OP1. L'eluizione è stata condotta con lo stesso tampone di lavaggio. Le frazioni raccolte sono state controllate con SDS-PAGE per verificare la presenza di TAT-OP1 ed analizzate allo spettrofotometro UV-VIS per quantificare la concentrazione proteica. I campioni sono stati suddivisi in piccole aliquote e conservati a -80°C.

3.6 Cromatografia RP-HPLC

Per ottenere un prodotto puro la proteina TAT-OP1 è stata sottoposta a cromatografia a fase inversa HPLC (cromatografo LKB-Pharmacia). Il campione in PBS contenente 15% glicerolo è stato sottoposto a riduzione dei legami a disolfuro mediante aggiunta di un uguale volume di soluzione 8 M guanidinio cloruro, pH 8,3, contenente 20 mM DTT e riscaldamento per 20 minuti a 37°C. A questo punto è stato caricato in colonna Vydac C4 prodotta dalla "The Separation Group" (Hesperia, California) avente diametro interno di 4 mm e lunghezza di 15 cm, caratterizzata da particelle di silice, derivatizzata con gruppi n-butile, di forma sferica e con dimensione media 5 µm. Gli eluenti utilizzati sono acqua (A) e MeCN (B) (Labscan) contenenti entrambi lo 0,05% (v/v) di TFA, sia A che B prima

dell'uso sono stati degassati sotto vuoto. Il gradiente utilizzato, denominato vyd4_op1, è riportato in *tabella 1*.

Tempo(min)	Flusso (ml/min)	% di B	Rivelazione (nm)
0	1.00	1,5	220
20	1.00	80	220
22	1.00	100	220
24	1.00	100	220
25	1.00	1,5	220
30	1.00	1,5	220

Tabella 1. Gradiente vyd4_op1 usato per la cromatografia RP-HPLC su colonna Vydac-C4. Gli eluenti utilizzati sono rispettivamente: A) Acqua con 0,05% v/v TFA e B) MeCN con 0,05% v/v TFA. Entrambi i solventi sono stati degassati sotto vuoto prima dell'uso. La rivelazione è stata effettuata a 220 nm.

I picchi di interesse sono stati raccolti sulla base del profilo cromatografico e conservati a 4°C.

3.7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Per verificare la presenza e la purezza della proteina TAT-OP1 sono state eseguite diverse elettroforesi SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), secondo la procedura di Laemmli (Laemmli, 1970). Per gli esperimenti è stata utilizzata una cella Mini Protean II della Biorad e per ottenere una stima del peso molecolare è stata eseguita una calibrazione con proteine a PM noto contenute nello standard LMW Pharmacia. Tutte le corse elettroforetiche sono state condotte con sistema di tipo discontinuo, con un gel di focalizzazione (*stacking gel*) al 4% di acrilamide a pH 6,8 posto sopra ad un gel di corsa (*running gel*) al 12% di acrilamide a pH 8,8, che permette di risolvere le proteine sulle base del diverso peso molecolare. Il gel preparato viene posto tra due lastre di vetro di dimensioni 10 x 8,2 cm, utilizzando spaziatori di 0,75 mm.

Running gel: (gel al 12%)

- ✓ 1,2 ml di acrilammide/bis-acrilammide mix al 40% (Fluka Basel, Switzerland)
- ✓ 1,95 ml di acqua mQ
- ✓ 0,08 ml di SDS al 10%
- ✓ 0,025 ml di APS: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 10% (Biorad, Richmond, California)
- ✓ 0,005 ml di TEMED (Fluka Basel, Switzerland)
- ✓ 0,8 ml di Tris/HCl 1.5 M pH8.8

Stacking gel: (gel al 4%)

- ✓ 0,2 ml di acrilammide/bis-acrilammide mix al 40%
- ✓ 1,35 ml di acqua mQ
- ✓ 0,04 ml di SDS al 10%
- ✓ 0,020 ml di APS: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 10%
- ✓ 0,005 ml di TEMED
- ✓ 0,4 ml di Tris/HCl 1.5 M pH6.8

I campioni prima di essere caricati sono stati sottoposti, in alcuni casi, a denaturazione e riduzione mediante l'aggiunta di una "soluzione campioni con riducente" composta da 2% SDS, 10% glicerolo, 10% di β -mercaptoetanolo e 0,02% Blu di Bromofenolo che funge da indicatore della migrazione. In altri casi i campioni sono stati sottoposti solo a denaturazione utilizzando la "soluzione campioni senza riducente" pertanto senza il 10% di β -mercaptoetanolo. Per portare a termine la reazione di denaturazione i campioni sono stati fatti bollire per 3 minuti a b.m. e quindi caricati. Lo standard LMW caricato nel gel conteneva in 10 μl di soluzione 4 μg circa di ciascuna delle seguenti proteine: fosforilasi b, albumina, ovalbumina, anidrasi carbonica, inibitore della tripsina e α -lactalbumina. La proteina TAT-OP1 è stata caricata in un volume massimo di 20 μl contenente qualche μg o meno di campione.

L'elettroforesi è stata condotta applicando una corrente costante di 10 mA fino all'uscita del marker Blu di Bromofenolo. La corsa viene effettuata con tampone contenente Tris base 25 mM, glicina 0,192 M ed SDS 0,1% pH 8,3. Il gel, subito dopo la corsa elettroforetica, viene posto in agitazione per 45 minuti in

una soluzione costituita da 0,2% di Coomassie Brilliant Blue R-250 in Metanolo-Acido Acetico-Acqua (50:12:38). Per la decolorazione del gel viene impiegata invece una soluzione costituita da Metanolo-Acido Acetico-Acqua (40:7:53). L'immagine del gel colorato viene acquisita mediante "Scanner" Trust Imagery 4800SP (Taiwan) collegato ad un personal computer.

4. Caratterizzazione chimica di TAT-OP1

4.1 Riduzione e carbamidometilazione di TAT-OP1

Prima di sottoporre la proteina TAT-OP1 ad analisi di spettrometria di massa è stata effettuata la riduzione dei ponti a disolfuro. Per caratterizzare il dominio C-terminale la riduzione è stata seguita da una reazione di carbamidometilazione.

La riduzione è stata condotta secondo due diversi protocolli in relazione alle analisi successive. Per determinare la massa molecolare della proteina nativa essa è stata preventivamente ridotta usando DTT 20 mM in 4 M guanidinio cloruro, 0,2 M ammonio bicarbonato e 1 mM EDTA a pH 8,3. Operando in atmosfera di azoto la soluzione è stata tenuta a 37°C per 20 minuti e quindi la reazione è stata bloccata per aggiunta di TFA fino a pH 2. Per determinare la massa molecolare della proteina carbamidometilata la riduzione è stata effettuata utilizzando tributilfosfina (TBU) come riducente per garantire una reazione quantitativa. La reazione è stata condotta con 0,5 mM TBU in 4 M guanidinio cloruro, 0,2 M ammonio bicarbonato e 1 mM EDTA a pH 8,3. Al termine dell'incubazione del campione a 37°C per 25 minuti sono stati aggiunti cristalli di iodoacetammide fino ad ottenere una concentrazione finale di 0,2 M e si è lasciato a 10 minuti al riparo dalla luce ed a temperatura ambiente. A questo punto la reazione è stata bloccata per aggiunta di TFA fino a pH 2. La tributilfosfina in eccesso è stata estratta con eptano. La carbamidometilazione è stata eseguita per contare le cisteine totali, infatti, a seguito della riduzione dei ponti disolfuro si liberano i residui di cisteina libera che verranno poi carbamidometilati; essendo ogni gruppo carbamido pesante

57 Da si prevede un aumento di massa della proteina TAT-OP1 carbamidometilata di circa 400 Da se effettivamente contiene 7 cisteine. In entrambi i casi (sola riduzione o riduzione/carbamidometilazione) prima di effettuare lo spettro di massa i campioni sono stati sottoposti ad RP-HPLC.

4.2 Determinazione del peso molecolare tramite spettrometria di massa ESI-TOF di TAT-OP1

Per determinare la massa molecolare esatta di TAT-OP1 sia nella forma ridotta che ridotta e carbamidometilata è stato usato uno spettrometro API-TOF Mariner della PerSeptive Biosystems (Stratford, Texas). Il software di utilizzo dello spettrometro è la versione 4.1 rilasciata dalla Applied Biosystems. Esso comprende la sezione di controllo ed acquisizione degli spettri e la sezione denominata Data Explorer che permette l'elaborazione degli spettri acquisiti e numerose funzioni ausiliarie (calibrazione degli spettri, calcolo dello spettro teorico, calcolo della frammentazione di peptidi, estrapolazione di una composizione elementare, etc.).

La taratura è stata effettuata usando uno standard Mariner contenente angiotensina-I, bradichinina e neurotensina in Acqua/MeCN 1/1 acidificata con 1% di HCOOH. La soluzione viene iniettata nello spray con flusso di 5 µl/minuto.

Per l'analisi alla massa sono state preparate soluzioni di TAT-OP1 aventi una concentrazione di circa 5 pmoli/µl in solvente costituito da Acetonitrile/Acqua 1/1 contenente 1% di HCOOH. La soluzione proteica è stata infusa a flusso costante di 10 µl/min nello electrospray dello strumento usando un'apposita pompa e quindi è stato acquisito lo spettro. Per l'infusione degli standard e dei campioni è stata usata una siringa micrometrica Harvard Pump 11 (Holliston).

4.3 Analisi spettroscopiche

4.3.1 Spettroscopia di assorbimento UV

Le analisi in spettroscopia UV sono state condotte con uno spettrofotometro Lambda-2 della Perkin-Elmer usando cuvette di quarzo Suprasil (Helma) con cammino ottico di 1,0 cm. Gli spettri sono stati registrati nell'intervallo di lunghezza d'onda 350-240 nm, con velocità di scansione di 120 nm/min e a temperatura ambiente.

Sono state analizzate diverse soluzioni di TAT-OP1, sia in tampone fosfato, pH 7,2, contenente 15% glicerolo, che in soluzione di acqua/MeCN 40/60 (v/v) contenente 0,05% TFA, pH 2,2.

Gli spettri sono stati eseguiti sia per determinare la concentrazione esatta, sia per seguire lo stato di degradazione della proteina.

Dal valore di assorbanza è possibile risalire alla concentrazione tramite l'equazione di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bc$$

Dove b corrisponde alla lunghezza del cammino ottico (1 cm) e c alla concentrazione molare.

Nel caso particolare di soluzioni proteiche la concentrazione viene stimata sulla base della relazione di Edelhoch (Edelhoch, 1967) riportata di seguito dove il valore di assorbanza di una soluzione 1 mg/ml viene indicato con $A_{280}^{0,1\%}$:

$$A_{280}^{0,1\%} = \frac{5690 \times n^{\circ} \text{ residui di Trp} + 1280 \times n^{\circ} \text{ residui di Tyr} + 120 \times n^{\circ} \text{ residui di Cys}}{\text{PM}}$$

TAT-OP1 ha 2 residui di Trp, 7 residui di Tyr e 3 ponti disolfuro, il PM è 18549,4 Da pertanto $A_{280}^{0,1\%}$ è 1,11.

Per seguire lo stato di degradazione sono stati eseguiti più spettri, sia in tampone pH 7,4 che in tampone pH 2,2, a intervalli di tempo diversi che vanno dal momento dell'uscita dalla colonna RP-HPLC di TAT-OP1 fino a 3 mesi di conservazione della proteina a 4°C.

4.3.2 Misure di dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state condotte con un dicrografo J-810 (JASCO, Tokyo) dotato di cella termostata. Lo strumento è stato calibrato con acido d-(+)-10-canforsolfonico. La velocità di scansione è stata impostata a 20 nm/min e sono stati eseguiti 4 accumuli per spettro con costante di tempo 2 secondi. Sono stati registrati gli spettri di TAT-OP1 nel lontano UV (250-195 nm) utilizzando soluzioni con una concentrazione di 0,15 mg/ml e cuvette in quarzo Suprasil con cammino ottico di 1 mm. L'acquisizione è stata fatta a 25°C.

5. Coltura di cellule di linea MC3T3-E1

Per i nostri scopi è stata utilizzata una linea di cellule MC3T3-E1 (osteoblasti di linea di origine murina) mantenuta in coltura con terreno di crescita di tipo α -MEM arricchito con un 10% di FBS (Fetal Bovine Serum, ossia siero fetale di bovino), 2 mM di glutammina, 100 μ g/ml di penicillina e 100 μ g/ml di streptomina. Le cellule, per la proliferazione, sono state seminate alla densità di 7000 cell/cm² in piastre Petri da 100 mm di diametro, a 37°C ed in presenza di 5% CO₂ nell'atmosfera. Per gli esperimenti invece le cellule sono state lavate con PBS (Phosphate Buffer Sample: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2), staccate dal fondo della fiasca con tripsina 0,25% - EDTA 0,02% (Gibco) e seminate in piastre Petri da 6 cm o in piastre con pozzetti di diverse dimensioni, a seconda delle esigenze, mantenendo costante la densità di semina. Per gli esperimenti di immunocitochimica, le cellule sono state seminate in pozzetti contenenti vetrini coprioggetto sterilizzati in autoclave a 121°C.

L'induzione del differenziamento osteogenico a 7, 14 e 21 giorni, a seconda dei test effettuati, è stata fatta aggiungendo al terreno di crescita desametasone 100 nM, β -glicerofosfato 10 nM, acido ascorbico-2-fosfato 0,05 mM.

6. Separazione e coltura di cellule UCBMSC

I campioni di UCB sono stati forniti dall'Unità Clinica Ospedaliera di Ginecologia e Ostetricia dell'ospedale di Trecenta (RO) previo consenso delle madri. Per la raccolta di UCB sono state utilizzate provette contenenti EDTA come anticoagulante.

6.1 Colture primarie di cellule provenienti da UCB

Per isolare le cellule mononucleate (Mononuclear cells, MNC), ogni campione di UCB è stato diluito 1:1 con PBS/2mM EDTA e caricato delicatamente su una soluzione di Histopaque-1077 (Sigma). Dopo centrifugazione a 2500 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente, le cellule mononucleate sono state rimosse dall'interfase e lavate 2 volte con PBS/2mM EDTA e quindi poste in coltura in piastre Petri 100x20mm con terreno di proliferazione costituito da DMEM low glucose + HEPES (Euroclone), 20% FBS specifico per cellule mesenchimali (StemCell Technologies) e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica (10000 U/ml penicillina, 10 mg/ml streptomina solfato, 25 mg/ml anfotericina B, Sigma). Le cellule così ottenute sono state coltivate a 37°C in 5% di CO₂, cambiando 2 volte la settimana il terreno. Le colture primarie sono state osservate giornalmente al microscopio ottico (Leitz DMIRB, Leica) per determinare la comparsa di colonie di cellule fibroblastoidi. Una volta ottenuta la popolazione di interesse questa è stata staccata dalla piastra mediante incubazione con soluzione di tripsina 0,25% - EDTA 0,02% (Gibco) per 5 minuti a 37°C.

6.2 Caratterizzazione fenotipica di UCBMSC

Successivamente le cellule sono state sottoposte a caratterizzazione fenotipica per i seguenti marcatori: CD31, CD34, CD38, CD90, CD105, CD166, c-kit e nestina tramite immunofluorescenza.

Prima di eseguire la colorazione le cellule sono state fissate in metanolo freddo per 10 minuti a -20°C e lavate in PBS. A questo punto è stata eseguita l'immunofluorescenza come descritto nel paragrafo 8.4 di questo capitolo.

6.3 Induzione del differenziamento adipogenico e osteogenico in UCBMSC

Per testarne la capacità differenziativa le cellule isolate sono state seminate in chamber slides da 8 pozzetti ad una densità di 8000 cell/cm² e quindi sottoposte a stimolazione adipogenica e osteogenica mediante uso di terreni induttivi. Per il differenziamento adipogenico è stato utilizzato un terreno costituito da: DMEM low glucose, FBS (Fetal Bovine Serum), 1% di soluzione antibiotica-antimicotica, Insulina 10 µg/ml, IBMX (iso-butil-metil-xantina) 0,5 mM, Desametasone 1µM e Indometacina 60 µM. Per il differenziamento osteogenico è stato utilizzato lo stesso terreno già descritto per le cellule MC3T3-E1.

Come controllo negativo sono state utilizzate cellule coltivate con solo terreno di proliferazione. Successivamente, le colture sono state fissate dopo 7, 14 e 21 giorni dall'inizio del differenziamento. I terreni sono stati cambiati 2 volte alla settimana.

Per verificare il differenziamento le cellule trattate con terreno adipogenico sono state sottoposte a colorazione Oil-RedO, le cellule trattate con terreno osteogenico sono state sottoposte a colorazione di Von-Kossa, come descritto nel paragrafo 8.3 di questo capitolo.

6.3.1 Colorazione Oil-RedO

Questa colorazione mette in evidenza la presenza di granuli lipidici nelle colture cellulari indotte a differenziamento adipogenico.

Le cellule, al termine del periodo di induzione, sono state fissate per 10 minuti a 4°C in acetone freddo, sono state lavate in acqua e incubate per 15 minuti con una soluzione di isopropanolo allo 0,5% di Oil-Red-O (Sigma), filtrata e diluita

al 60% in acqua distillata. Successivamente le cellule sono state lavate in acqua e contrastate con ematosilina per un tempo variabile da 30 secondi a un minuto. Dopo ripetuti lavaggi in acqua, i preparati sono stati montati con Histovitrex (Carlo Erba). I campioni ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico in contrasto di fase Leica DMR, dotato di telecamera Leica DC500 per l'acquisizione informatica delle immagini

7. Induzione del differenziamento osteogenico con TAT-OP1

Per testare l'attività biologica di TAT-OP1 sia su cellule di linea MC3T3-E1 che su UCBMSC sono stati seguiti due diversi metodi di induzione. La proteina, in entrambi i casi, è stata aggiunta al terreno di crescita, non sono stati aggiunti altri fattori.

1. *Pulse*: in questo caso TAT-OP1 è stata utilizzata alla concentrazione di 200 nM e tenuta a contatto con le cellule per 24 ore. Al termine del periodo di incubazione il terreno è stato sostituito con terreno di crescita fino al termine dell'esperimento.
2. *In continuo*: in questo caso TAT-OP1 è stata utilizzata in tre diverse concentrazioni rispettivamente 5,5 nM, 13,5 nM e 27 nM per tutta la durata dell'esperimento.

Questi due metodi di induzione sono stati adottati in base a dati di letteratura riguardanti proteine ad attività osteogenica associate a TAT (Dolgilevich *et al.*, 2002) e l'utilizzo di OP-1 ricombinante come fattore di differenziamento osteogenico (Yeh *et al.*, 1997).

L'induzione del differenziamento, a seconda degli esperimenti effettuati, ha avuto una durata di 7, 14 e 21 giorni.

8. Studio dell'attività biologica di TAT-OP1

8.1 Saggio di vitalità cellulare MTS

Il saggio di vitalità cellulare è stato allestito utilizzando il kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Questo saggio colorimetrico sfrutta la riduzione, da parte delle deidrogenasi mitocondriali di cellule metabolicamente attive, del composto tetrazolico MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio) nel prodotto colorato formazano. Il sale, viene rilasciato nel terreno di coltura, perciò l'assorbanza del prodotto colorato può essere misurata a 490 nm, avendo così una stima delle cellule vitali presenti in coltura.

Il saggio è stato effettuato su cellule MC3T3-E1 trattate con terreno di crescita (controllo) e terreno contenente TAT-OP1 sia con metodo *pulse* che *in continuo* (5,5 nM, 13,5 nM 27 nM).

Le cellule sono state seminate in pozzetti di una piastra da 96 *multiwells* in terreno di crescita, dopo 24 ore dalla semina è stato rimosso il terreno e addizionato terreno base con TAT-OP1 nelle opportune concentrazioni. Ogni trattamento è stato condotto in triplicato. Il saggio è stato eseguito dopo 7 e 14 giorni di trattamento.

Al termine del periodo di incubazione il terreno di coltura è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di terreno base arricchito con 20 µl di reagente MTS. Dopo incubazione della piastra per 2 ore a 37°C in incubatore, 100µl di terreno di ciascun campione sono stati sottoposti a lettura spettrofotometrica a 490 nm utilizzando il lettore ELISA Ultra Microplate Reader della Bio-Tek Instruments.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite test di Student (*t-test*). I risultati finali, media di almeno tre esperimenti, sono stati espressi come numero di cellule vitali.

8.2 Analisi su Western blotting di cellule MC3T3-E1

Per verificare la funzionalità del costrutto TAT-OP1 si è voluto vedere se era in grado di entrare e rimanere all'interno delle cellule. Per questo esperimento è stata utilizzata la tecnica del western blotting.

8.2.1 Coltura e raccolta di cellule MC3T3-E1 per Western blotting

Per prima cosa è stato necessario coltivare le cellule MC3T3-E1 da sottoporre all'analisi. Queste sono state seminate in piastre Petri da 60 mm alla densità di 7000 cell/cm², dopo 24 ore il terreno di crescita è stato sostituito con terreno contenente TAT-OP1 200 nM, la proteina è stata lasciata a contatto con le cellule per 24 ore. Al termine del periodo di incubazione il terreno è stato rimosso e le cellule sono state accuratamente lavate per 3 volte con PBS per eliminare la proteina eventualmente rimasta nella piastra. Le cellule raccolte durante il periodo di incubazione sono state anch'esse sottoposte ai tre lavaggi in PBS.

Per l'analisi le cellule sono state raccolte dopo 2, 4, 24, 48 ore, 5, 7, 9 giorni dall'aggiunta di TAT-OP1. Come controllo sono state utilizzate cellule coltivate solo con terreno base (T 0) e cellule trattate solo per pochi secondi con il terreno contenente TAT-OP1 (T 0+). Quest'ultimo controllo serve per verificare l'efficienza dei lavaggi.

Per raccogliere le cellule è stato necessario lavorare a basse temperature (4°C), dopo aver tolto il terreno ed aver effettuato i 3 lavaggi il fondo della piastra è stato grattato con un raschietto di plastica per staccare le cellule, portarle in sospensione, e poterle quindi raccogliere utilizzando 1 ml di PBS per campione. Il PBS è stato eliminato mediante centrifugazione a 8000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il pellet cellulare ottenuto è stato congelato a -80°C fino al momento dell'esperimento.

8.2.2 Western Blotting

Il protocollo del *Western blotting* prevede, prima una separazione delle proteine mediante SDS-PAGE (paragrafo 3.7 di questo capitolo), e poi il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di nitrocellulosa.

Prima del caricamento in gel SDS-PAGE al 12% i campioni sono stati trattati con il kit contenente l'acido bicinconinico (BCA Protein Assay Kit, Pierce), seguendo le istruzioni del fornitore per determinare l'esatta concentrazione proteica totale. Le cellule sono state, quindi, lisate in LSB (Laemmli Sample Buffer: 2% SDS, 10% glicerolo, 0,03% blu di bromofenolo, 5% β -mercaptoetanololo, 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8) e i campioni bolliti per 5 minuti prima di essere caricati su gel di poliacrilammide. Alla fine della corsa elettroforetica si può procedere con il trasferimento delle proteine su una membrana di nitrocellulosa (Biorad) precedentemente lavata in acqua mQ ed equilibrata nel tampone di trasferimento (192 mM glicina, 20% metanolo, 0,03% SDS 25 mM, Tris/HCl pH 8,4) per 10 minuti. Una volta assemblato il supporto con gel e membrana è stato applicato un campo elettrico costante (350 mA per 1 ora e 30 minuti) ortogonale al gel. Al termine del trasferimento la membrana è stata sottoposta a saturazione per una notte con una soluzione al 3% di BSA in TBS (Tris-HCl 50 mM pH7,5, NaCl 150 mM) per bloccare tutti i siti liberi di interazione idrofobica presenti sul foglio di nitrocellulosa. Successivamente, il *blot* è stato messo a contatto per 2 ore con l'anticorpo primario *anti 6His-Tag* monoclonale prodotto in topo (Sigma) diluito 1:1000 in BSA 1% - TBS. Al termine dell'incubazione sono stati effettuati tre lavaggi, ciascuno di 15 minuti, con una soluzione di TBS - BSA 1%, sotto lenta agitazione. Si è proceduto quindi con l'incubazione per 1 ora con l'anticorpo secondario prodotto in topo, coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina (Sigma), diluito 1:3000 in TBS - BSA 1% . A questo punto, dopo aver ripetuto i lavaggi in TBS - BSA 1%, la membrana è stata equilibrata per 10 minuti con il tampone di sviluppo (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 150 mM, Mg Cl₂ 5 mM pH 9,5). Nello stesso tampone è stata sciolta la pastiglia

contenente i substrati per la fosfatasi alcalina necessaria per lo sviluppo della membrana. La soluzione con i substrati è stata tenuta a contatto con la membrana fino alla comparsa delle bande, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di acqua.

8.3 Saggio di Von Kossa su cellule di linea MC3T3-E1 e su UCBMSC

La capacità di produrre matrice mineralizzata da parte delle cellule indotte a differenziamento osteogenico è stata valutata mediante colorazione di von Kossa (Jainswal *et al.*, 1997). Le cellule, al termine dell'induzione, sono state fissate in formalina al 10% in PBS per una notte a 4°C, sono state reidratate per 5 minuti con acqua deionizzata, e quindi messe a contatto con una soluzione acquosa di nitrato d'argento all'1% (Sigma) ed esposte a luce UV (Philips HPW) per 45 minuti. Successivamente le cellule sono state lavate con acqua deionizzata, trattate con soluzione acquosa contenente 3% di tiosolfato di sodio (Sigma) per 5 minuti, lavate e colorate con soluzione acquosa allo 0,2% di safranina (Sigma) filtrata. Infine i preparati sono stati montati con Eukitt (O.Kindler GmbH & Co.).

Come controllo sono state utilizzate cellule trattate con terreno di crescita. I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio a contrasto di fase Leica DMR, dotato di telecamera Leica DC500 per l'acquisizione informatica delle immagini.

8.4 Immunomarcatura di cellule fissate mediante immunofluorescenza

La marcatura delle proteine cellulari mediante anticorpi è stata eseguita su cellule fissate in metanolo freddo per 10 minuti a -20°C. Nel caso dell'identificazione di marcatori citoplasmatici o nucleari, è stata eseguita la permeabilizzazione della membrana cellulare mediante trattamento con una soluzione di acqua distillata contenente triton X-100 (Sigma) all'1% per 6 minuti a temperatura ambiente. In seguito, i campioni sono stati lavati con PBS e incubati con una soluzione di PBS mantenuta a 4°C contenente il 10% di siero di cavallo

(HS), animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario, per 1 ora e 15 minuti a temperatura ambiente, per ottenere il blocco dei siti aspecifici.

A questo punto è stato aggiunto l'anticorpo primario diluito 1:100 in PBS - 10% HS per 60 minuti a temperatura ambiente. Gli anticorpi primari utilizzati nei diversi esperimenti sono: CD31, CD34, CD38, CD90, CD105, CD166, Nestina, c-kit, per la caratterizzazione fenotipica di UCBMSC, osteocalcina, osteopontina e Cbfa1/Runx2, per lo studio del differenziamento osteogenico su cellule MC3T3-E1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Dopo tre lavaggi di 15 minuti con PBS - HS 10% è stato aggiunto l'anticorpo secondario biotinylated pan-specific (Vector) diluito in PBS - 1,5% HS secondo le istruzioni del fornitore per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggio in PBS le cellule sono state trattate per 10 minuti al buio a temperatura ambiente con fluorocromo Fluorescein Avidin DCS del Fluorescent Avidin Kit (Vector) diluito 1:500 in soluzione di HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M. I preparati così ottenuti sono stati montati con un montante per fluorescenza contenente o meno DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindolo) (Vector).

Come controllo negativo sono state usate cellule non incubate con anticorpo primario. I preparati sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza Leica DMR, dotato di telecamera Leica DC500 per l'acquisizione informatica delle immagini.

8.5 Quantificazione della fosfatasi alcalina su cellule MC3T3-E1

Il saggio per la quantificazione della fosfatasi alcalina è stato allestito utilizzando il kit alkaline phosphate yellow liquid substrate for elisa (Sigma). Questo saggio colorimetrico contiene il p-nitrofenilfosfato (p-NPP) che è un substrato dell'enzima in esame, pertanto in presenza della fosfatasi forma un complesso di colore giallo, solubile nel terreno di coltura, perciò l'assorbanza del prodotto colorato può essere misurata a 405 nm, avendo così una stima della concentrazione di fosfatasi nel terreno.

Il saggio è stato effettuato su cellule MC3T3-E1 trattate con terreno di crescita (controllo) e terreno contenente TAT-OP1 sia con metodo *pulse* che *in continuo* (5,5 nM, 13,5 nM 27 nM).

Le cellule sono state seminate in pozzetti di una piastra da 96 *multiwells* in terreno di crescita, dopo 24 ore dalla semina è stato rimosso il terreno e addizionato terreno base con TAT-OP1 nelle opportune concentrazioni. Ogni trattamento è stato condotto in triplicato. Il saggio è stato eseguito dopo 7, 12, 14 e 21 giorni di trattamento.

Al termine del periodo di incubazione il terreno di coltura è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di substrato. Dopo incubazione della piastra per 30 minuti a 37°C in incubatore, 100µl di substrato di ciascun campione sono stati sottoposti a lettura spettrofotometrica a 405 nm utilizzando il lettore ELISA Ultra Microplate Reader della Bio-Tek Instruments.

Tutti i campioni sono stati trattati con il kit contenente l'acido bicinconinico (BCA Protein Assay Kit, Pierce), seguendo le istruzioni del fornitore per determinare l'esatta concentrazione proteica totale.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite test di Student (*t-test*). I risultati finali, media di almeno tre esperimenti, sono stati espressi come attività della fosfatasi alcalina rispetto al controllo, espressa in valore percentuale. Tutti i dati sono stati normalizzati in modo da evitare l'influenza del numero totale di cellule presenti.

8.6 Quantificazione della mineralizzazione della matrice su cellule MC3T3-E1

Questo saggio prevede l'utilizzo del colorante Alizarin Red S (Sigma) per quantificare la presenza di calcio nella matrice extracellulare. Alizarin Red S è un derivato antrachinonico in grado di complessarsi con gli ioni calcio, il composto che si forma è di colore rosso ed è solubile in cetilpiridinio cloruro (CPC) (Sigma).

Per questo saggio le cellule MC3T3-E1 sono state seminate in piastre da 12 pozzetti in terreno di crescita, dopo 24 ore dalla semina è stato rimosso il terreno e addizionato terreno base con TAT-OP1 nelle opportune concentrazioni. Ogni

trattamento è stato condotto in triplicato. Il saggio è stato eseguito dopo 7 e 14 giorni di trattamento, i campioni sono stati trattati con terreno di crescita (controllo) e terreno contenente TAT-OP1 sia con metodo *pulse* che *in continuo* (5,5 nM, 13,5 nM 27 nM). Al termine del periodo di incubazione le cellule sono state lavate velocemente in PBS e fissate per 1 ora in etanolo 70% (v/v) a -20°C. A questo punto le cellule sono state reidratate con acqua deionizzata e messe a contatto per 10 minuti a temperatura ambiente con una soluzione acquosa di Alizarin Red S 40 mM pH 4,2. Una volta eliminato il colorante le cellule sono state lavate per 5 volte con acqua deionizzata e tenute per 15 minuti in PBS sotto lenta e costante agitazione. Per solubilizzare il colorante è stata preparata una soluzione al 10% (p/v) di CPC in tampone fosfato 10 mM pH 7,0. Questa soluzione è stata tenuta a contatto con le cellule per 15 minuti, al termine dell'incubazione 200 µl di soluzione di estrazione di ciascun campione sono stati sottoposti a lettura spettrofotometrica a 570 nm utilizzando il lettore ELISA Ultra Microplate Reader della Bio-Tek Instruments.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite test di Student (*t-test*). I risultati finali, media di almeno tre esperimenti, sono stati espressi come assorbanza a 570 nm.

8.7 Colorazione della fosfatasi alcalina su UCBMSC

Questa colorazione è stata eseguita su UCBMSC indotte a differenziamento osteogenico per verificare la presenza della fosfatasi alcalina. Le cellule, al termine dell'induzione, sono state fissate in formalina al 3,7% in PBS per 10 minuti a 37°C, sono state lavate velocemente con PBS, e quindi messe a contatto per 20 minuti a 37°C al riparo dalla luce con una soluzione acquosa composta da 50 µl di Naftolo AS-MX fosfato 0,1 mg/ml in 0,5% N,N dimetilformammide con 2 mM MgCl e 9,95 ml di Fast Blue BB salt 0,6 mg/ml in tampone Tris/HCl 0,1 M pH8,5

Successivamente le cellule sono state disidratate con veloci passaggi in etanolo a concentrazione crescente. Infine i preparati sono stati montati con Eukitt (O.Kindler GmbH & Co.). Come controllo sono state utilizzate cellule trattate con

terreno di crescita. I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio a contrasto di fase Leica DMR, dotato di telecamera Leica DC500 per l'acquisizione informatica delle immagini.

9. Coltura tridimensionale in Puramatrix HydrogelTM di UCBMSC

È noto in letteratura che i sistemi di coltura tridimensionali possono fornire un adeguato microambiente in cui è garantito il complesso gioco di interazioni cellula – cellula e cellula – matrice che sono riconosciuti essenziali per la funzionalità metabolica cellulare (Hwang *et al.*, 2006). Tali sistemi risultano utili per lo studio dell'attività biologica di proteine bioattive quali fattori di crescita e fattori differenziativi.

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata come matrice tridimensionale il Puramatrix Hydrogel TM (Zhang *et al.*, 1993), un peptide auto assemblante ampiamente utilizzato per l'allestimento di studi in vitro di differenziamento cellulare (Semino, 2003).

Sono stati preparati campioni di 3×10^5 cellule in 300 μ l di gel diluito allo 0,5% in soluzione acquosa di saccarosio (20%). Dopo mantenimento in coltura per 24 ore in terreno di proliferazione, i campioni sono stati sottoposti a differenziamento osteogenico con lo stesso terreno utilizzato per le MC3T3-E1 e con terreno contenente la proteina TAT-OP1 (200 nM). È stato inoltre utilizzato un sistema di rilascio controllato composto da microsfele di PLGA (Woo *et al.*, 2001). Questo sistema garantisce nel tempo una concentrazione della proteina TAT-OP1 di 200 nM. Le microsfele sono state preparate e fornite dal professor O. Schiavon del dipartimento di Scienze Farmaceutiche Università di Padova.

Come controllo sono state utilizzate cellule tenute in coltura con terreno di proliferazione.

9.1 Caratterizzazione mediante microscopia elettronica a trasmissione

La capacità osteoinduttiva di TAT-OP1 sulle colture 3D di UCBMSC è stata valutata dopo 27 giorni di trattamento sia con le microsfele sia con 200 nM TAT-OP1 per tutto la durata dell'esperimento.

I campioni, al termine dell'induzione, sono stati fissati a 4°C con glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato 0,08 M, pH 7,3, lavati in tampone fosfato 0,08 M e postfissati in 1% tetrossido d'osmio in tampone fosfato 0,1 M. Infine le cellule sono state incluse in resina epossidica Epon 812 (Società Italiana Chimici).

Con un ultramicrotomo SuperNova LKB (Richert, Austria) sono state ricavate sezioni ultrasottili di 60 nm, colorate con acetato di uranile e piombo secondo Sato (Sato, 1968) e quindi osservate al microscopio elettronico Hitachi H-300 (Hitachi, Tokyo, Japan).

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Clonaggio del gene di OP-1

La sequenza nucleotidica codificante per la porzione matura di OP-1 è stata recuperata dal plasmide pSV-OP1, che contiene la sequenza completa del gene OP-1 umano (Stanchi O., Negro A., Callegaro L.: *United States Patent 5,641,649*, 1997).

Per ottenere la sequenza utilizzata in questo lavoro di tesi, che si estende dal nucleotide 898 al 1296, sono stati disegnati i due primer seguenti:

5' GCACTAGTATGAGCCAAAACCGCTCAAAGACGC 3'
Spe I

5' CGGAATTCTAGTGCAGCCACAGGCCCGGACC 3'
EcoR I

Questi oligonucleotidi mappano rispettivamente al 5' e al 3' del gene in modo da comprendere l'intera sequenza d'interesse. All'interno di questi due oligonucleotidi sono presenti due siti di restrizione, *SpeI* ed *EcoRI*, necessari per recuperare la sequenza matura di OP-1 e rendere possibile il successivo inserimento del gene nel plasmide pTAT- α -synA30P che è un vettore di espressione procariotico (Recchia *et al.*, 2007).

Questi due siti di restrizione sono stati scelti sia perché non compaiono nella sequenza di OP-1 sia perché compatibili con il successivo clonaggio nel plasmide pTAT- α -synA30P per ottenere il plasmide pTAT-OP1.

In *figura 7* vengono rappresentati in maniera schematica i vari passaggi di clonaggio che portano dal plasmide pSV-OP1 a pTAT-OP1.

L'amplificato ottenuto tramite PCR in seguito al primo passaggio è stato purificato da gel di agarosio e controllato mediante sequenziamento. I dati ottenuti hanno confermato che il frammento corrisponde alla porzione matura di OP-1. A questo punto per ottenere la proteina di fusione TAT-OP1, è stato utilizzato il plasmide pTAT- α -synA30P che contiene la sequenza per il peptide TAT e la coda

di sei istidine necessarie per la successiva purificazione della proteina tramite IMAC.

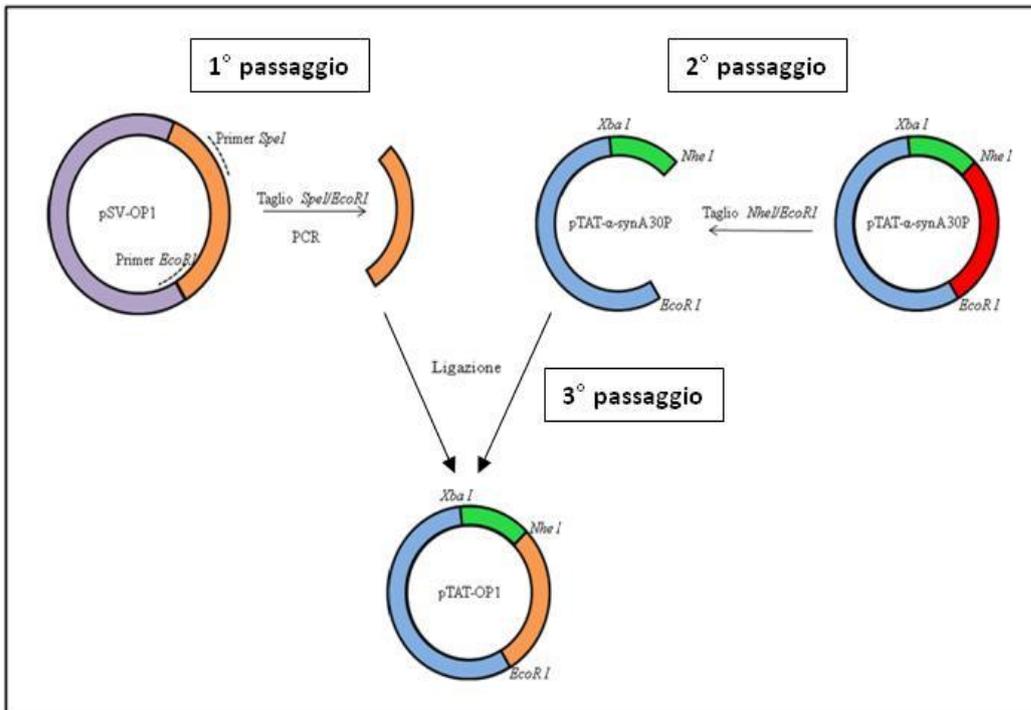


Figura 7. Schema riassuntivo del clonaggio della porzione matura di OP-1: 1° passaggio: dal plasmide pSV-OP1 tramite i due primer viene recuperata la porzione di interesse di OP-1 (frammento arancione); 2° passaggio: dal plasmide pTAT-α-synA30P viene eliminata la sequenza dell'α-synA30P (frammento rosso), e viene mantenuta la sequenza di TAT (frammento verde); 3° passaggio: tramite l'enzima ligasi il frammento di OP-1 viene inserito nel plasmide pTAT-OP1.

Per poter inserire il gene di interesse per prima cosa è stata eliminata la sequenza per α-synA30P tramite taglio con enzimi di restrizione *NheI* ed *EcoRI*, così viene conservato tutto il dominio di TAT. In questo plasmide è possibile inserire il gene per OP-1 in quanto i due siti di restrizione (*SpeI* ed *EcoRI*) creati con l'utilizzo dei due primer nel gene di OP-1, sono compatibili con i due siti di restrizione presenti nel plasmide (*NheI* ed *EcoRI*). A questo punto tramite l'enzima ligasi è possibile inserire nel plasmide la sequenza di interesse.

Di seguito viene riportato il gel di agarosio eseguito per controllare l'esattezza del clonaggio (Figura 8). Come si può notare, in seguito a digestione con gli enzimi di restrizione *XbaI* ed *EcoRI*, i plasmidi prodotti dalle colonie 2 e 4

hanno dato luogo ad un frammento della lunghezza di circa 500 bp, molto vicino al frammento atteso di 495 bp. Per quanto riguarda la colonia 5 si possono notare 2 frammenti, dovuti probabilmente ad una mutazione che ha generato un altro sito di restrizione ed è pertanto sicuramente inesatta. Le colonie 1 e 3 invece hanno dato luogo a dei frammenti di lunghezza di circa 450 bp e quindi più corti del frammento atteso. Il successivo sequenziamento ha confermato l'esattezza del plasmide prodotto dalla colonia numero 2.

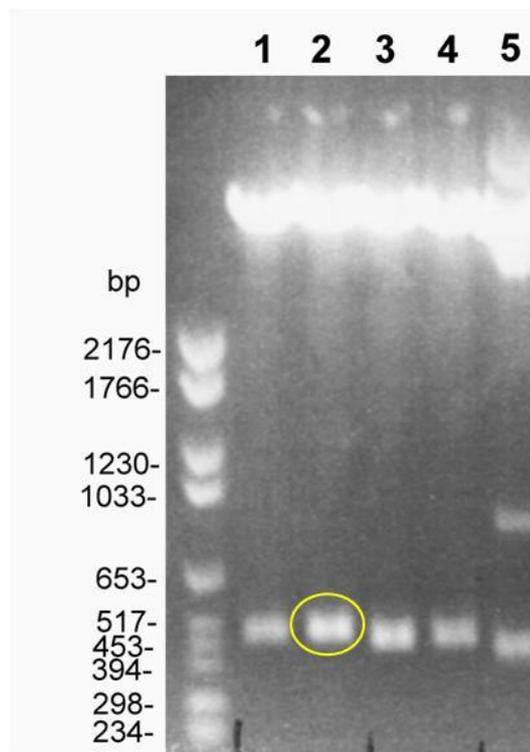


Figura 8. Elettroforesi in gel di agarosio del plasmide pTAT-OP1 digerito con *XbaI* ed *EcoRI*: la banda cerchiata in giallo è risultata essere quella corrispondente alla sequenza di TAT-OP1

2. Espressione e purificazione di TAT-OP1

Una volta ottenuto il costrutto pTAT-OP1 si è proceduto con l'espressione della proteina da parte di batteri *E. Coli* di tipo BL21, adatti per poter produrre proteine a partire da DNA plasmidico. Come si può vedere nel gel SDS-PAGE riportato in *figura 9* i batteri trasformati con il plasmide pTAT-OP1 hanno espresso una proteina del peso molecolare di circa 18500 Da che corrisponde al peso molecolare atteso. La proteina TAT-OP1, infatti, ha un peso teorico calcolato sulla base della sequenza amminoacidica di 18551 Da.

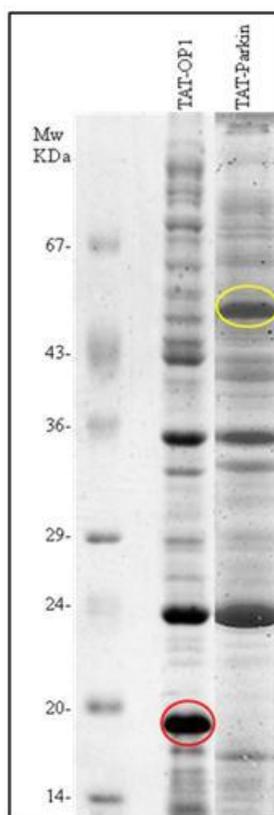


Figura 9. Gel SDS-PAGE al 12%: la colorazione con il Coomassie Brilliant Blue mette in evidenza la presenza di una banda a circa 18500 Da che corrisponde al peso molecolare atteso (banda cerchiata in rosso); controllo ceppo batterico trasformato con il plasmide pTAT-Parkin (banda cerchiata in giallo).

Come controllo è stato utilizzato un ceppo batterico trasformato con il plasmide pTAT-Parkin che codifica per una proteina di 53000 Da. Come si vede la banda a 18500 Da è del tutto assente dal controllo.

Successivamente i batteri sono stati lisati tramite sonicazione e il surnatante ottenuto è stato sottoposto ad una prima purificazione con metodo IMAC. Questo tipo di cromatografia può essere utilizzata perché il costrutto sintetizzato possiede sei istidine nella porzione N-terminale in grado di formare un legame molto forte con la resina della colonna, in questo modo durante i lavaggi vengono eliminate tutte le proteine batteriche e la proteina di interesse può essere eluita successivamente, applicando un'elevata concentrazione di imidazolo.

Il passo successivo è stato quello di eseguire una cromatografia di gel filtrazione per ottenere un prodotto più pulito e privo di sali, urea e guanidinio, utilizzati durante il primo stadio di purificazione, come spiegato nella Parte Sperimentale.

Al termine di questi processi cromatografici, per verificare l'esattezza e la purezza del prodotto ottenuto, è stata eseguita un'elettroforesi SDS-PAGE (Figura 10).

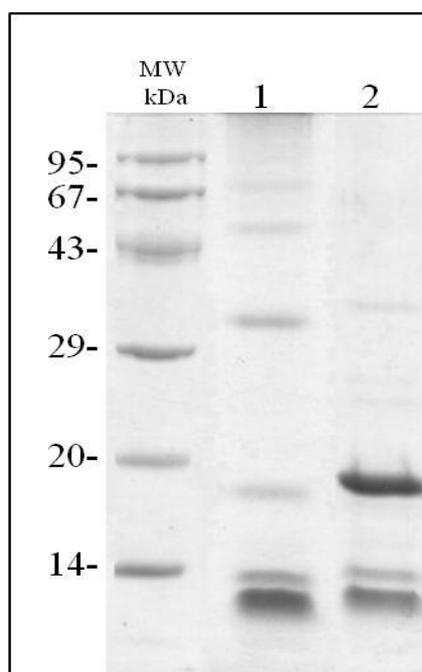


Figura 10. Analisi mediante SDS-PAGE al 12% della proteina TAT-OP1 recuperata da IMAC: la colorazione con il Coomassie Brilliant Blue mette in evidenza la presenza di una banda a circa 18500 Da che corrisponde al peso molecolare atteso sia nel campione 1 non ridotto che nel campione 2 ridotto. Nel campione 1 si nota la presenza del dimero e di altri aggregati che scompaiono in condizioni riducenti. In entrambi i campioni sono presenti delle bande dovute ad impurezze con peso molecolare di circa 14000 Da.

L'esperimento è stato condotto sia in condizioni riducenti, per la presenza di β -mercaptoetanololo, che in condizioni non riducenti. Questo è stato fatto per mettere in evidenza l'eventuale presenza del dimero. La proteina in esame, infatti, tende a formare il dimero tramite un ponte a disolfuro intermolecolare che si forma per ossidazione a partire dalle cisteine libere presenti nei monomeri. Essendo presenti ben 7 gruppi cisteinici è possibile anche la formazione di trimeri, tetrametri, etc.

Dal risultato riportato in *figura 10* si può notare che in entrambi i campioni (1 non ridotto e 2 ridotto) è presente una banda a circa 18500 Da corrispondente al peso molecolare atteso per il costrutto TAT-OP1. Nel campione 1 la banda risulta meno marcata in quanto parte della proteina si trova sottoforma di dimero ed altri aggregati a peso molecolare maggiore. Mentre nel campione 2 la riduzione dei ponti a disolfuro comporta un aumento netto di intensità della banda a peso molecolare corretto e la scomparsa degli aggregati a peso molecolare elevato, pur mantenendosi presente una piccola quantità di dimero. Il leggero spostamento verso l'alto della banda di TAT-OP1 ridotta rispetto a quella di TAT-OP1 senza riducente potrebbe essere dovuto al fatto che la proteina, in assenza di riducente, presenta già dei ponti a disolfuro intramolecolari; risulta spesso che le proteine, a seguito della riduzione dei ponti disolfuro, aumentano il loro volume idrodinamico e quindi migrano meno della forma ossidata nel gel di poliacrilammide.

L'elettroforesi ha messo in evidenza anche la presenza di alcune bande a peso molecolare di circa 14000 Da, sia nel campione 1 che nel 2. Tali bande sono dovute a impurezze presenti nel prodotto ottenuto dopo le prime due fasi di purificazione e sono dovute probabilmente a residui di proteine appartenenti all'*E.Coli*.

Per eliminare tali residui di natura proteica si è pensato di eseguire un'ulteriore passaggio di purificazione tramite cromatografia di tipo RP-HPLC con colonna Vydac-C4 (*Figura 11*). Per ottimizzare il recupero la proteina TAT-OP1, proveniente dai precedenti stadi cromatografici, è stata posta in 4 M Guanidinio cloruro e 20 mM DTT per 20 minuti a 37°C e a pH 8.3 e, successivamente, dopo acidificazione a pH 2.2, caricata in colonna a fase inversa C4.

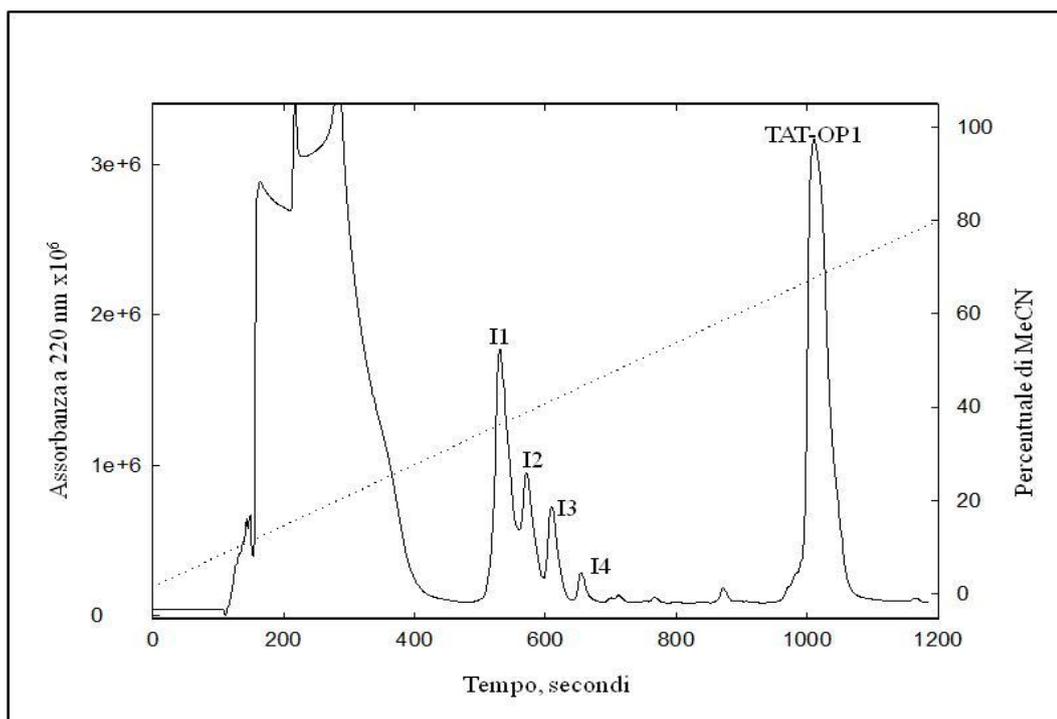


Figura 11. Purificazione di TAT-OP1 mediante RP-HPLC: la proteina è stata introdotta in colonna Vydac-C4 ed eluita con il gradiente Vydac 4-OP1 (vedi parte sperimentale). Come eluenti sono stati usati: Acqua ed MeCN entrambi addizionati dello 0.05 % v/v di TFA. Si è operato con flusso di 1.00 ml/min. a temperatura ambiente.

La cromatografia RP-HPLC è stata condotta utilizzando come eluenti acqua ed acetonitrile addizionati di TFA (pH 2.2); in tali condizioni quasi tutte le proteine perdono la struttura nativa e, generalmente, anche la loro attività biologica. Nel nostro caso il pH acido e l'azione denaturante dell'acetonitrile non costituiscono un problema, in quanto si è visto che hanno maggiore attività le proteine legate alla sequenza TAT che si trovano nella forma denaturata (Frankel and Pabo 1988).

Nel profilo cromatografico riportato in *figura 11* si nota un picco principale attorno al 60% di acetonitrile dovuto all'eluizione di TAT-OP1 ed una serie di picchi con tempi di ritenzione più brevi (I1, I2, I3, I4).

Ciascun picco è stato raccolto e opportunamente trattato per essere sottoposto ad elettroforesi SDS-PAGE (*Figura 12*). In questo caso i campioni corrispondenti al picco cromatografico principale sono stati sottoposti sia a trattamento riducente che non, mentre il campione corrispondente alla serie di picchi di intensità minore è stato sottoposto solo a trattamento riducente.

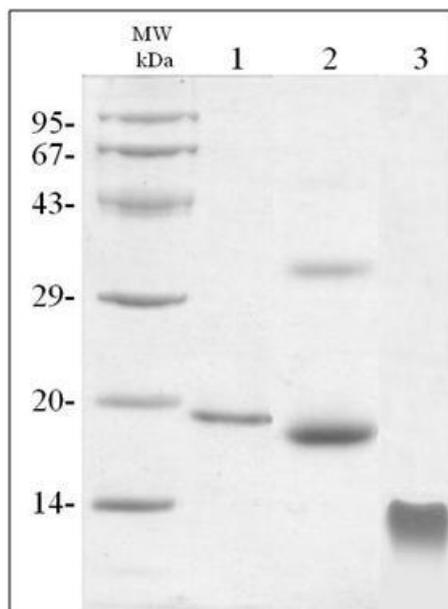


Figura 12. Analisi del materiale recuperato da cromatografia RP-HPLC mediante SDS-PAGE al 12%: la colorazione con il Coomassie Brilliant Blue mette in evidenza la presenza di una banda a circa 18500 Da che corrisponde al peso molecolare atteso sia nel campione 1 ridotto che nel campione 2 non ridotto. Nel campione 2 si nota la presenza del dimero che scompare in condizioni riducenti. Nel pozzetto 3 è stato caricato il materiale raccolto derivante dai picchi indicati con I1,I2,I3 e I4 nel cromatogramma di Figura 5.

Dal risultato dell'elettroforesi si deduce che il picco cromatografico principale di TAT-OP1 ha dato origine ad una banda di peso molecolare compatibile con quello atteso, ed il prodotto ottenuto, grazie alla RP-HPLC, presenta un elevato grado di omogeneità. I picchi con tempi di ritenzione più bassi (I1, I2, I3, I4), invece, producono una banda unica ed allargata con un peso molecolare stimato di circa 14000 Da, esattamente come le impurezze rilevate nel campione derivante dalla cromatografia a gel filtrazione.

Come ulteriore verifica della purezza del prodotto ottenuto viene di seguito riportato il cromatogramma RP-HPLC registrato al termine delle fasi di purificazione di TAT-OP1 (*Figura 13*).

Come si può notare è presente solo il picco corrispondente a TAT-OP1, le impurezze, grazie a quest'ultimo passaggio cromatografico sono state del tutto eliminate.

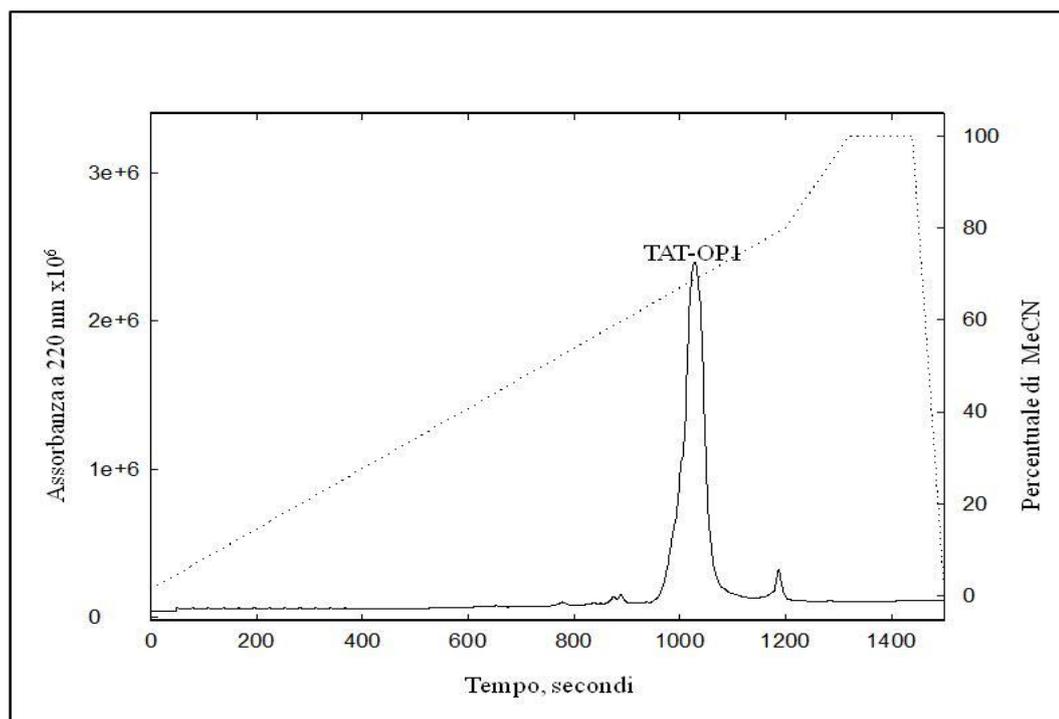


Figura 13. Cromatogramma RP-HPLC di TAT-OP1: la proteina è stata introdotta in colonna Vydac-C4 ed eluita con il gradiente Vydac 4-OP1 (vedi parte sperimentale). Come eluenti sono stati usati: Acqua MilliQ ed MeCN entrambi addizionati dello 0.05 % v/v di TFA. Si è operato con flusso di 1.00 ml/min. a temperatura ambiente.

Il picco cromatografico di TAT-OP1 è piuttosto largo alla base ad indicazione di una certa tendenza alla aggregazione di questa proteina ed infatti, in mancanza di un preventivo trattamento riducente, il recupero dalla cromatografia RP-HPLC è generalmente basso.

Si può quindi concludere che per ottenere la proteina ricombinante TAT-OP1 priva di impurezze è necessario sottoporla ad almeno tre diversi passaggi cromatografici: IMAC, gel filtrazione e RP-HPLC.

3. Caratterizzazione chimica di TAT-OP1

Nonostante i risultati ottenuti nella prima parte di questo lavoro non è ancora possibile affermare che il costrutto ottenuto sia esattamente la proteina in esame. Una volta terminata la fase di purificazione, infatti, lo studio è proseguito con la caratterizzazione chimica di TAT-OP1 per verificarne l'esattezza della sequenza e la stabilità in soluzione.

3.1 Determinazione del peso molecolare tramite spettrometria di massa ESI-TOF

Il peso molecolare accurato di TAT-OP1 è stato determinato mediante spettrometria di massa con l'utilizzo di uno spettrometro API-TOF Mariner. Tale strumento prevede la formazione degli ioni molecolari, attraverso la tecnica di ionizzazione ESI, a partire da una soluzione che viene iniettata in un tubo di acciaio avente un diametro di 100 µm e a cui è applicato un potenziale di 4000 Volts. L'evaporazione del solvente, assistita da un flusso di azoto, comporta una produzione di ioni del soluto, nel nostro caso ioni molecolari della proteina, con diverso numero di cariche positive legate che, sotto l'azione del campo elettrico e del vuoto, penetrano attraverso un foro di 0.5 mm nella sezione detta interfaccia dello strumento dove un quadrupolo li focalizza per poi entrare nell'analizzatore a tempo di volo TOF.

Per l'analisi è stata allestita una soluzione di proteina, precedentemente ridotta con DTT, avente una concentrazione di circa 5 pmoli/µl in solvente costituito da Acetonitrile/Acqua 1:1 con 1% di acido formico. In *figura 14, parte A*, è riportato lo spettro multicarica prodotto da TAT-OP1, mentre nella *parte B* della stessa figura è riportato lo spettro deconvoluto.

La massa molecolare ottenuta sperimentalmente per la proteina in esame è 18549,4 Da, del tutto in linea con il peso teorico di 18551 Da ricavato dalla somma dei pesi molecolari dei singoli amminoacidi che costituiscono la proteina.

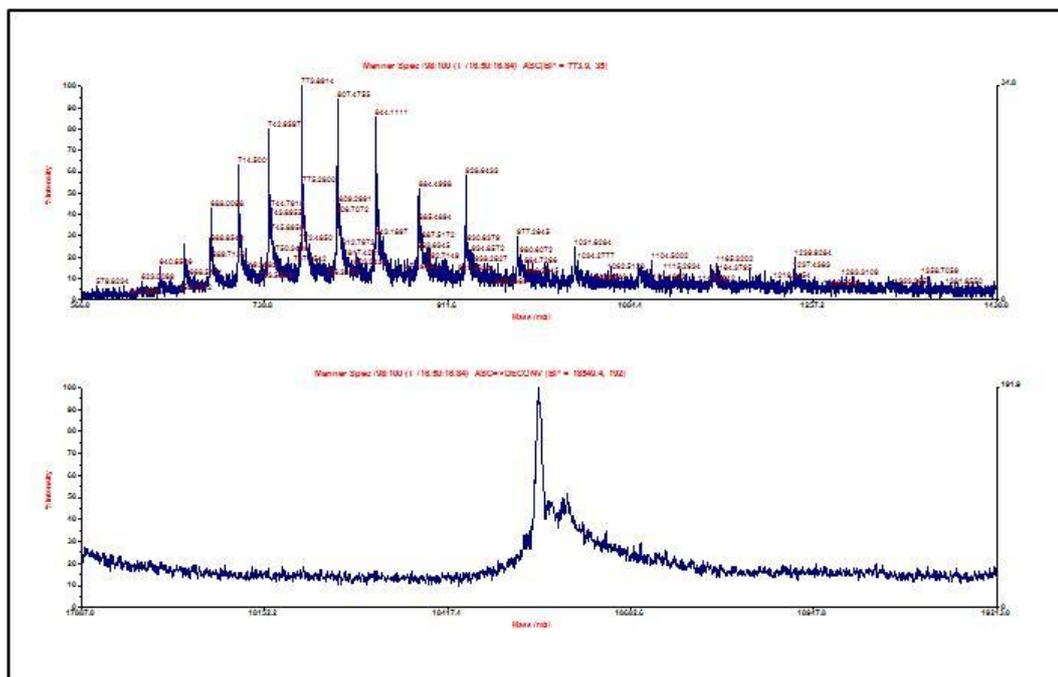
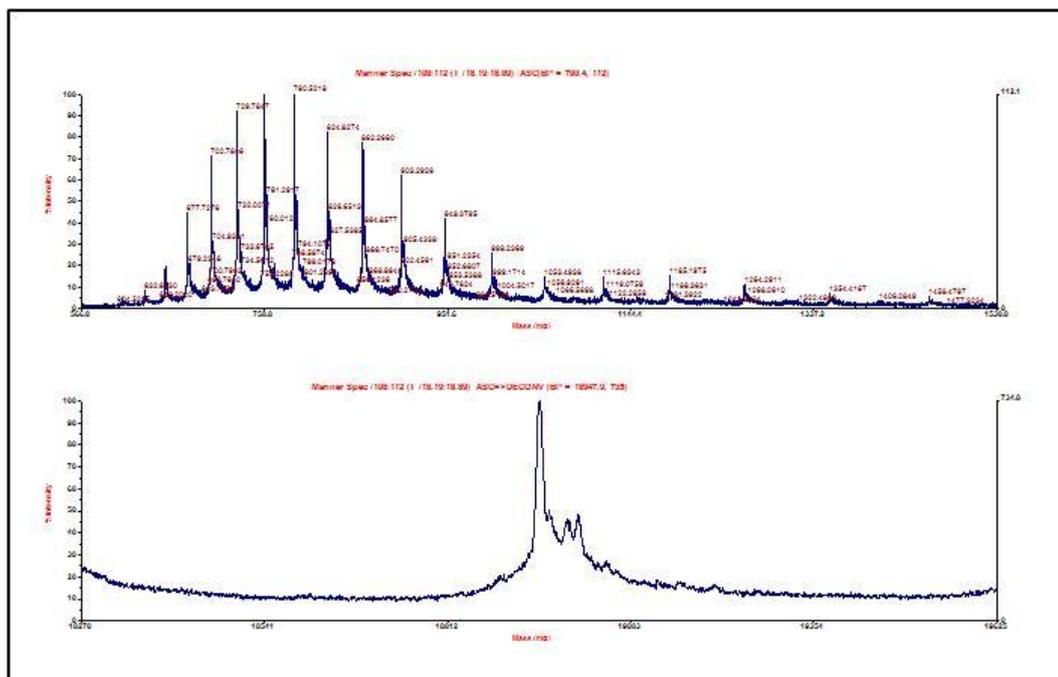


Figura 14. Spettri di massa ESI-TOF relativi a TAT-OP1 purificata: Una soluzione circa 5 pmoli/ μ l della proteina in MeCN/acqua 1:1 con 1% HCOOH è stata infusa nell'electrospray dello spettrometro Mariner e si è registrato lo spettro accumulando il segnale per 10 secondi. Lo spettro multicarica è riportato nella parte A mentre in B è riportato lo spettro (a carica zero) ottenuto mediante la deconvoluzione dello spettro multicarica.

Successivamente si è voluto verificare che la porzione attiva di OP-1, ovvero il dominio contenente le cisteine, fosse presente con tutte le sette cisteine previste e privo di mutazioni. Per fare questo i legami a disolfuro della proteina sono stati prima completamente ridotti, usando come riducente la tributilfosfina, e, successivamente, si è proceduto alla carbamidometilazione dei gruppi tiolici con idodoacetamide. Tale modifica permette di legare, unicamente ai residui di cisteina libera, un gruppo carbamido che ha un peso molecolare medio di 57 Da.

Una volta portata a termine la reazione si è recuperata la proteina modificata mediante RP-HPLC e di essa è stato di nuovo eseguito lo spettro di massa, riportato in *figura 14*. La massa molecolare di TAT-OP1 modificata è di 18947,9 Da e la differenza di massa tra proteina carbamidometilata e proteina nativa risulta di circa 400 Da. Dal momento che l'aumento di peso atteso per ogni singolo residuo di cisteina presente è di 57 Da possiamo concludere che la proteina possiede tutti e 7 i residui di cisteina che compongono il dominio C-terminale.



filtrazione con colonna PD10 sepharose la proteina si trova in soluzione di PBS e glicerolo 15%, condizioni ideali per la conservazione a lungo termine a -80°C. Studi in letteratura hanno confermato che le proteine legate a TAT in queste condizioni rimangono stabili fino a 2 anni ma una volta scongelate non possono essere ricongelate (Becker-Hapak *et al.*, 2001).

Si è notato, infatti, che TAT-OP1, una volta scongelata, tende a precipitare dando luogo a un corpo di fondo di natura gelatinosa molto difficile da riportare in soluzione, in questo modo si ha la perdita della proteina.

Per capire come poter conservare TAT-OP1 una volta scongelata sono state condotte delle analisi spettroscopiche, di tipo UV e di dicroismo circolare, che ci forniscono informazioni circa la struttura secondaria e terziaria delle proteine.

Gli spettri registrati tramite spettroscopia UV corrispondono alla zona spettrale 330-240 nm. In questa zona l'assorbimento della radiazione ultravioletta è dovuta principalmente ai cromofori tirosina, triptofano, fenilalanina e ponti disolfuro.

I dati mostrati in *figura 16 A* mostrano come solo dopo 24 ore a 4 °C l'assorbanza della soluzione di TAT-OP1 in soluzione in PBS e glicerolo 15% varia da 0,92 a 0,068. Da questo valore è possibile risalire, noto il coefficiente di assorbività a 280 nm per una soluzione di 1 mg/ml ($A_{280}^{0,1\%}$), che si ricava dalla equazione di Edelhoich (come riportato nella parte sperimentale), alla concentrazione della soluzione in esame. Per TAT-OP1 il coefficiente è di 1,11, pertanto la concentrazione varia da 0,83 mg/ml a 0,061 mg/ml questo corrisponde ad una perdita di più del 90% della proteina totale.

Pertanto il passo successivo è stato quello di sottoporre la proteina, immediatamente dopo lo scongelamento, ad un trattamento riducente in DTT 80 mM e guanidinio 8M per evitare la precipitazione. Subito dopo TAT-OP1 è stata sottoposta al terzo passaggio cromatografico di tipo RP-HPLC.

I dati mostrati in *figura 16 B* mostrano che la proteina in soluzione nell'eluente cromatografico (MeCN, acqua, TFA 0,05%) conservata a 4°C rimane stabile nel tempo, infatti i valori di assorbanza per una soluzione di TAT-OP1 1 mg/ml a distanza di tre mesi non variano, nel limite dell'errore strumentale.

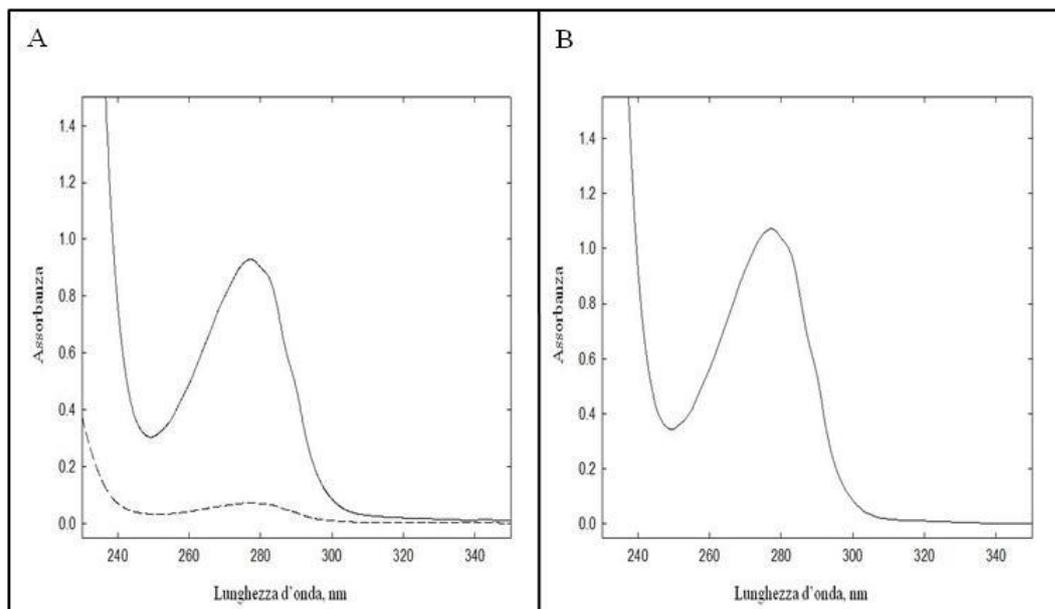


Figura 16. Spettri UV di TAT-OP1. A TAT-OP1 in soluzione di PBS e glicerolo 15%: in nero spettro registrato immediatamente dopo lo scongelamento da -80°C ; linea tratteggiata spettro registrato dopo conservazione per 24 h a 4°C . **B. TAT-OP1 alla concentrazione di 1mg/ml in soluzione di 60% MeCN contenente TFA 0,05%.** Gli spettri sono stati registrati con velocità di scansione di 120 nm/minuto usando cuvette di quarzo Suprasil aventi percorso ottico di 1.00 cm.

Studi successivi di dicroismo circolare hanno confermato i dati ottenuti con la spettroscopia UV.

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica basata sulla differenza di assorbimento delle due componenti della luce polarizzata (destrogiro e levogiro) da parte di una sostanza chirale. Questa metodica viene sfruttata per ottenere informazioni riguardanti la struttura secondaria e terziaria di proteine e polipeptidi in soluzione. Il segnale rilevato nel lontano UV (180-250 nm) è dovuto all'assorbimento dei legami peptidici e fornisce informazioni sulla struttura secondaria di una proteina (α -elica, struttura- β e struttura non-ordinata) mentre il segnale nel vicino UV (250-350 nm) dà indicazioni sulla struttura terziaria della proteina. Nel nostro caso è stato raccolto solo lo spettro di TAT-OP1 nel lontano UV.

In *figura 17 A* viene riportato lo spettro CD di TAT-OP1 dopo 24 ore a 4°C , si può osservare che il segnale dato dalla proteina (linea continua) è confrontabile con il segnale del bianco, questo indica la scomparsa della proteina dalla soluzione

di partenza. Se il precipitato che si forma dopo lo scongelamento viene trattato con una soluzione di SDS al 5% è possibile registrare uno spettro CD (linea tratteggiata) tipico di proteine con struttura secondaria di tipo α -elica. Questo sta ad indicare che la proteina in condizioni estremamente riducenti torna in soluzione.

In *figura 17 B* viene invece riportato lo spettro ottenuto dalla soluzione recuperata dopo passaggio in RP-HPLC dopo conservazione per 3 mesi a 4°C. In questo caso si osserva uno spettro dicroico nel lontano UV che è tipico di proteine con modesto contenuto in struttura secondaria di tipo α -elica. Utilizzando il programma Dicroprot ed in particolare l'algoritmo di Andrade *et al.*, 1993 viene stimato un contenuto di struttura α -elica del 16%, di struttura β in 28% e di "random" del 56%.

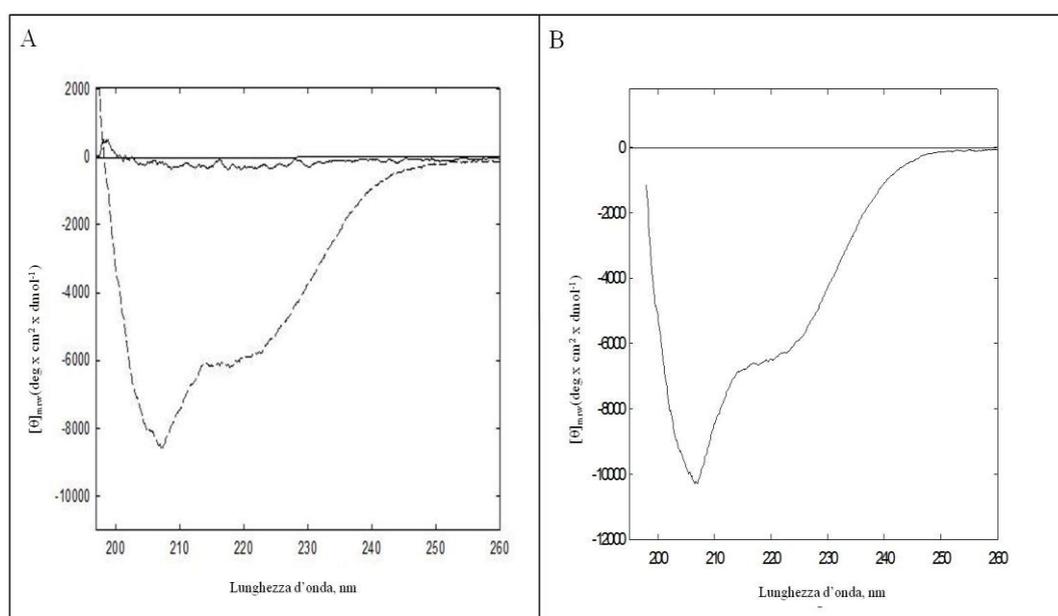


Figura 17. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV di TAT-OP1. **A:** TAT-OP1 in tampone fosfato 10 mM, pH 7,40, contenente NaCl 0,20 M dopo 24 h a -20°C. **B.** TAT-OP1 in 60% MeCN contenente lo 0,05% di TFA, spettro registrato dopo 3 mesi di conservazione a 4°C. E' stata utilizzata una cuvetta in quarzo Suprasil con cammino ottico di 1 mm. La velocità di scansione è stata impostata a 20 nm/min e sono state effettuate 4 scansioni con costante di tempo 2 secondi. Gli spettri sono stati registrati alla temperatura di 25°C.

Visti i risultati ottenuti si può concludere che TAT-OP1 può essere conservata a lungo termine a -80°C in soluzione PBS e glicerolo 15%. Per poterla utilizzare per i diversi tipi di esperimenti è necessario sottoporla, immediatamente

dopo lo scongelamento, ad un processo di riduzione dei legami a disolfuro ed a RP-HPLC. La soluzione recuperata dalla fase inversa può essere conservata a 4°C per un periodo di 3 mesi evitando, così, ulteriori passaggi di congelamento e scongelamento.

A questo punto l'unico problema è il fatto che la proteina viene conservata in una soluzione acida per TFA e contenente acetonitrile. Entrambe queste sostanze possono risultare tossiche per le cellule, ma, come verrà mostrato più avanti, le quantità utilizzate per le colture *in vitro* sono al di sotto della soglia di tossicità.

4. Studio di tossicità di TAT-OP1 su cellule MC3T3-E1

Come detto in precedenza la proteina ricombinante TAT-OP1 per rimanere stabile in soluzione a concentrazioni elevate (50 µM) necessita di pH acido e presenza di aceto nitrile. Entrambi questi fattori risultano essere dannosi per le cellule.

Pertanto prima di studiare l'attività biologica del costrutto in esame è stato necessario valutare la tossicità della soluzione proteica utilizzata una volta diluita alla concentrazione adatta per i test *in vitro*.

Gli studi di tossicità sono stati condotti utilizzando il saggio colorimetrico di vitalità cellulare MTS che sfrutta la conversione, da parte di cellule biologicamente attive, del sale MTS in sale colorato di formazano, che viene rilasciato nel terreno di coltura. Il valore di assorbanza di quest'ultimo può essere determinato con un lettore ELISA e rappresenta un indice quantitativo di vitalità cellulare.

Per questo esperimento sono state utilizzate cellule MC3T3-E1 trattate per 7 e 14 giorni a concentrazioni diverse di TAT-OP1. In particolare le cellule sono state sottoposte a due diversi trattamenti.

Nel primo caso, che verrà chiamato *pulse*, la proteina è stata utilizzata alla concentrazione di 200 nM e tenuta a contatto con le cellule per 24 ore. Al termine del periodo di incubazione il terreno è stato sostituito con terreno base fino al termine dell'esperimento.

Nel secondo caso, che verrà chiamato *in continuo*, la proteina è stata utilizzata in tre diverse concentrazioni rispettivamente 5,5 nM, 13,5 nM e 27 nM per tutta la durata dell'esperimento.

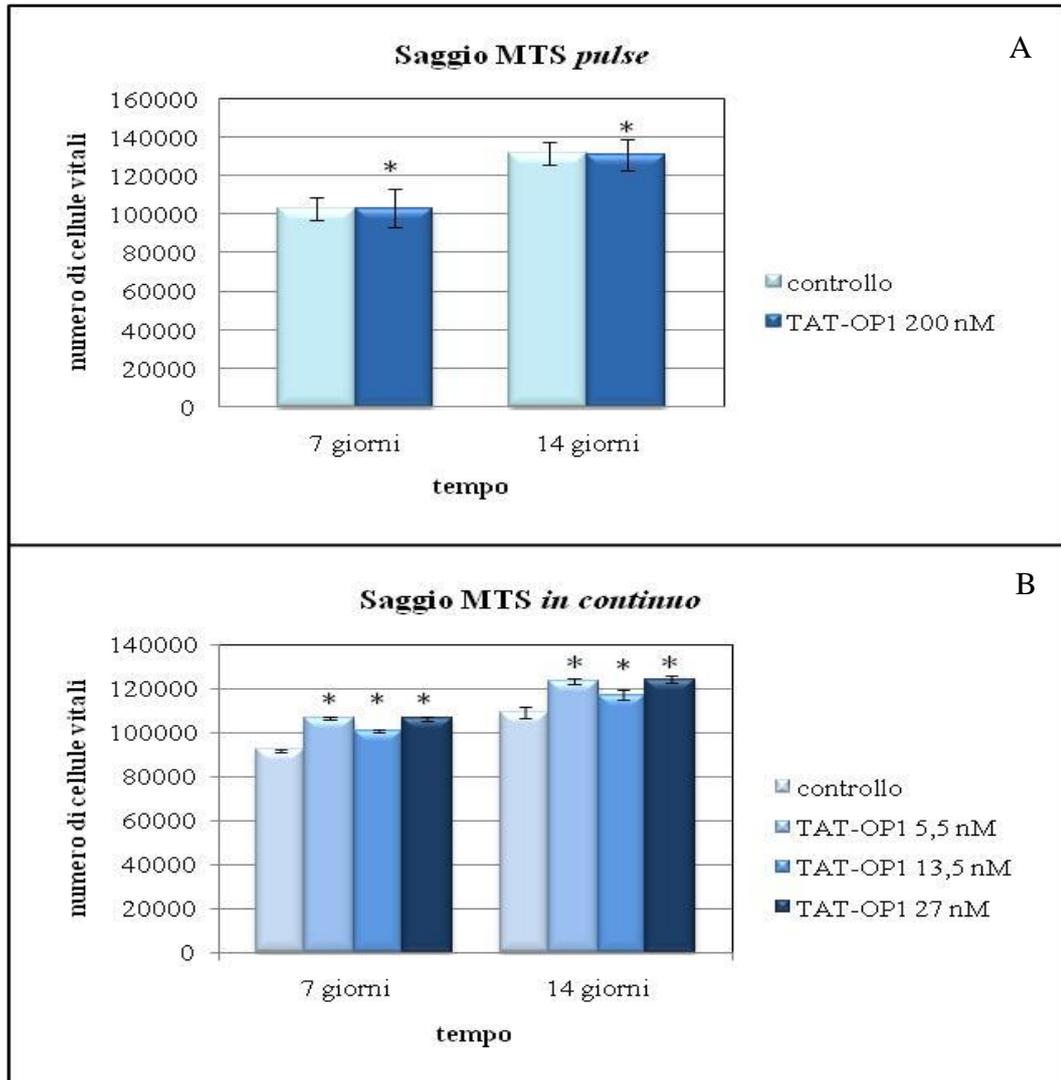


Figura 18. Saggio di vitalità cellulare con MTS. A: valori di vitalità cellulare dopo 7 e 14 giorni di trattamento con TAT-OP1 200 nM. **B:** valori di vitalità cellulare dopo 7 e 14 giorni con TAT-OP1 5,5 nM, 13,5 nM, 27 nM. I dati sono espressi come numero di cellule vitali. Barre di errore: \pm SD. * $P \leq 0,05$ rispetto al controllo (*t test*).

Questi due metodi di induzione saranno poi utilizzati anche per i successivi studi di attività biologica e sono stati adottati in base a dati di letteratura riguardanti proteine ad attività osteogenica associate a TAT (Dolgilevich *et al.*, 2002) e all'utilizzo di OP-1 ricombinante come fattore di differenziamento osteogenico (Yeh *et al.*, 1997).

In entrambi gli esperimenti come controllo sono state utilizzate cellule trattate solo con terreno base.

L'analisi statistica dei dati ottenuti evidenzia che i trattamenti eseguiti non sono risultati citotossici per le colture cellulari come mostrato in *figura 18 A e B*; anzi è stato registrato un incremento della vitalità cellulare significativo rispetto al controllo nei campioni trattati con TAT-OP1 con metodo *in continuo* sia a 7 che a 14 giorni.

5. Verifica della presenza di TAT-OP1 all'interno delle cellule

Prima di valutare la capacità osteoinduttiva di TAT-OP1 è stato necessario verificare che la molecola da noi realizzata fosse in grado di oltrepassare la membrana plasmatica, condizione necessaria per provocare una risposta da parte delle cellule.

Nel costrutto in esame, come già ricordato, non è stata utilizzata l'intera sequenza di OP-1 ma solamente la porzione matura legata al peptide di trasduzione proteica TAT.

Per verificare la presenza di TAT-OP1 all'interno delle cellule e per capire i tempi di degradazione, la proteina è stata messa in soluzione nel terreno di coltura alla concentrazione di 200 nM per 24 ore; al termine di questo periodo le cellule sono state lavate per 3 volte con PBS per eliminare la proteina eventualmente presente ed il terreno è stato sostituito con terreno base. Per questo esperimento sono state utilizzate cellule di linea MC3T3-E1. Le cellule sono state seminate alla densità di 7000 cell/cm² su piastre petri di 60 mm di diametro. Dopo 2, 4, 24, 48 ore, 5, 7, 9 giorni le cellule sono state raccolte e sottoposte a lisi. Il lisato cellulare è stato separato mediante elettroforesi SDS-PAGE, in condizioni riducenti, e trasferito su membrana di nitrocellulosa. Prima di effettuare l'elettroforesi è stato determinata l'esatta concentrazione proteica totale. Successivamente la membrana è stata sviluppata con l'anticorpo contro 6HIS-Tag che quindi riconosce la coda di 6 istidine presente nel costrutto in esame. Come controllo sono state utilizzate

cellule coltivate solo con terreno base (T 0) e cellule trattate solo per pochi secondi con il terreno contenente TAT-OP1 (T 0+).

Come si può vedere in *figura 19* entrambi i controlli non producono nessuna banda evidente. Mentre già dopo 2 ore di trattamento si può notare una banda corrispondente al peso molecolare di TAT-OP1, sia nella forma di monomero che di dimero. L'intensità delle bande cresce fino a 24 ore ma la proteina è presente all'interno delle cellule anche dopo 7 giorni dall'inizio del trattamento. La banda corrispondente al peso molecolare di TAT-OP1 non è più rilevabile dopo 9 giorni dall'inizio dell'esperimento.

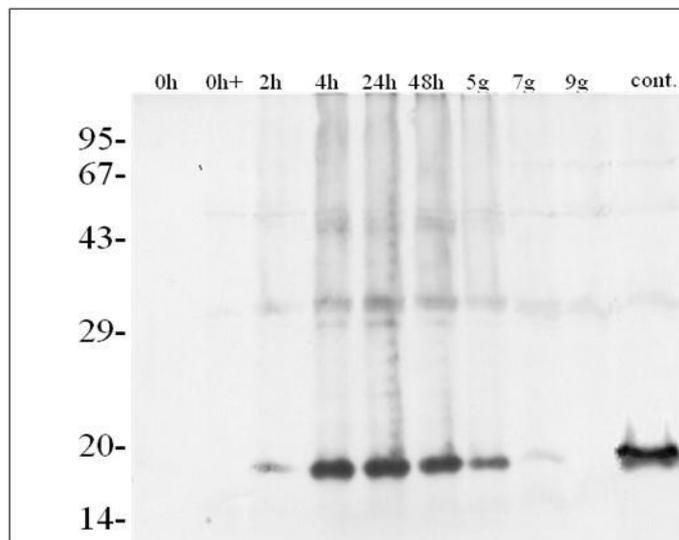


Figura 19. Immunoblotting di cellule MC3T3-E1: le cellule sono state tenute a contatto con terreno contenente TAT-OP1 200 nM per 24h. A tempi diversi sono state lisate, sottoposte a western-blot con anticorpo contro HIS-Tag. Come controllo sono stati utilizzati 150 ng di TAT-OP1.

Pertanto si può concludere che il costrutto TAT-OP1 è in grado di entrare all'interno delle cellule, dopo 24 ore raggiunge il massimo della concentrazione per poi essere completamente metabolizzato dopo 9 giorni. È interessante notare che il costrutto non viene degradato, infatti dal western-blot si può vedere che la banda corrispondente a TAT-OP1 mantiene sempre lo stesso peso. Anche se l'elettroforesi è stata condotta in condizioni riducenti, è inoltre rilevabile la presenza del dimero, che come detto nell'introduzione costituisce la conformazione attiva della proteina.

6. Studio dell'attività biologica di TAT-OP1 su cellule MC3T3-E1

Dagli esperimenti effettuati precedentemente si è potuto capire che la proteina TAT-OP1 non è tossica nelle concentrazioni utilizzate ed è in grado di penetrare all'interno delle cellule rimanendovi per circa 7 giorni e mantenendo invariata la struttura: non va quindi incontro a rapida degradazione pur essendo un prodotto estraneo alla cellula. Questa condizione è indispensabile per consentire alla proteina di innescare il processo differenziativo come evidenziato nei seguenti esperimenti.

Come primo modello sono stati utilizzati osteoblasti di linea MC3T3-E1 di origine murina, in quanto presentano caratteristiche costanti nel tempo e permettono l'ottenimento di risultati altamente riproducibili.

Per studiare il potere differenziativo di TAT-OP1 sono stati presi in considerazione due diversi metodi di induzione, come già spiegato nella Parte Sperimentale e nello studio di tossicità. I saggi effettuati hanno dato risultati sia qualitativi che quantitativi. Per quanto riguarda i test qualitativi sono state eseguite sia la colorazione di Von Kossa che l'immunofluorescenza per antigeni tipici del differenziamento osteogenico. I test quantitativi invece si sono basati sui dosaggi della fosfatasi alcalina e della mineralizzazione della matrice.

6.1 Saggio di Von Kossa su cellule MC3T3-E1

Questa colorazione permette di mettere in evidenza i depositi di sali di calcio tipici di cellule che si stanno differenziando in senso osteogenico. In *figura 20* sono riportate le immagini relative ad entrambi i metodi differenziativi (*pulse e in continuo*) dopo 7 e 14 giorni dall'inizio dell'esperimento.

Come controllo sono state utilizzate cellule trattate solo con terreno base (*Figura 20 A-E*) e cellule trattate con terreno differenziativo classico (*Figura 20 B-F*), come descritto nella parte sperimentale.

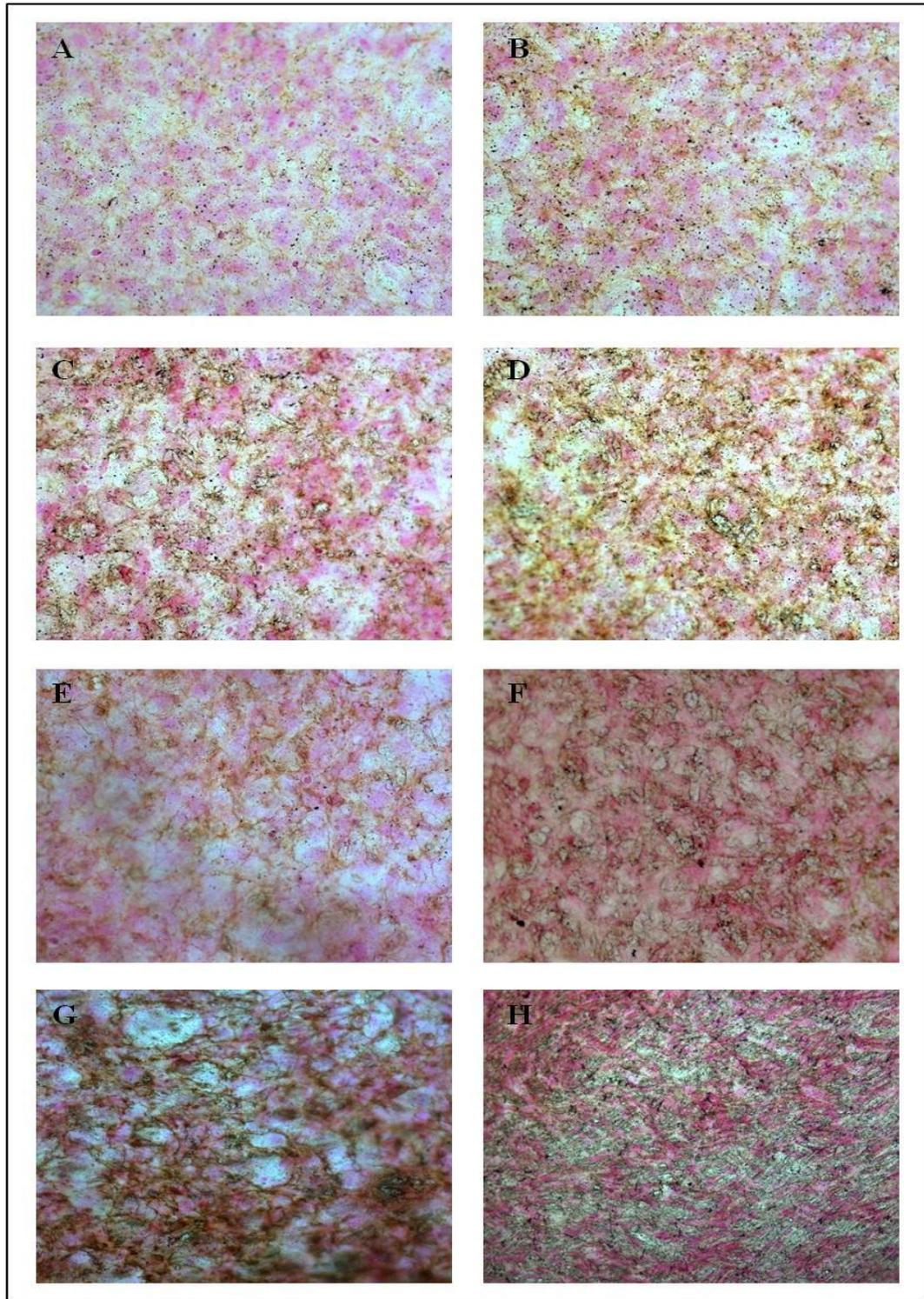


Figura 20. Colorazione Von Kossa su cellule MC3T3-E1. **A-E** controllo colture trattate con terreno base 7 e 14 giorni rispettivamente; **B-F** controllo colture trattate con terreno differenziativo 7 e 14 giorni rispettivamente; **C-G** colture trattate con TAT-OP1 metodo *pulse* (200 nM per 24 h) 7 e 14 giorni rispettivamente; **D-H** colture trattate con TAT-OP1 metodo *in continuo* (13,5 nM) 7 e 14 giorni rispettivamente. Ingrandimento x200.

Le colture trattate con metodo *pulse* già a 7 giorni (*Figura 20 C*) presentavano dei depositi, indicati in nero-marrone dalla colorazione, del tutto paragonabili alle colture trattate con terreno differenziativo. A 14 giorni (*Figura 20 G*) la colorazione metteva in evidenza una più marcata presenza di sali di calcio indice di un maggiore livello di mineralizzazione.

Per quanto riguarda i campioni trattati con metodo *in continuo* (*Figura 20 D-H*) si può osservare anche in questo caso la comparsa della colorazione positiva al saggio di Von Kossa sia a 7 che a 14 giorni di trattamento con TAT-OP1 13,5 nM.

Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti utilizzando la proteina ad una concentrazione di 27 nM (dati non mostrati). Invece per quanto riguarda le cellule trattate con TAT-OP1 5,5 nM non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti come mostrato in *figura 21*.

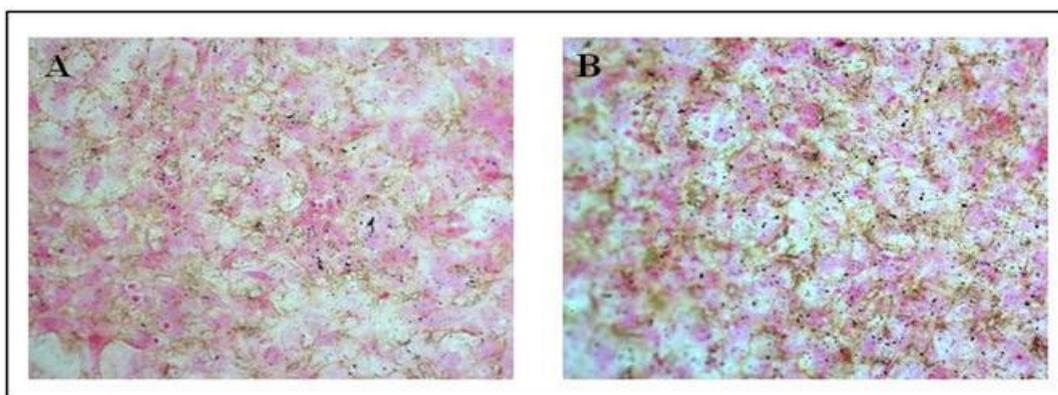


Figura 21. Colorazione Von Kossa su cellule MC3T3-E1. A-B colture trattate con TAT-OP1 metodo *in continuo* (5,5 nM) 7 e 14 giorni rispettivamente. Ingrandimento x200.

Da questi risultati preliminari si può già affermare che la proteina TAT-OP1 è in grado di indurre la formazione di depositi di sali di calcio in cellule di linea trattate sia con il metodo *pulse* che con il metodo *in continuo*. In quest'ultimo caso si ha una risposta positiva solo alle concentrazioni di 27 nM e 13,5 nM. Mentre la concentrazione di 5,5 nM non sembra essere sufficiente a dare il via alla mineralizzazione della matrice.

6.2 Quantificazione della mineralizzazione della matrice su cellule MC3T3-E1

Per quantificare il livello di mineralizzazione della matrice è stato utilizzato il saggio colorimetrico *Alizarin Red S*. Questo colorante è in grado di complessare il calcio presente sulla membrana e dare un complesso solubile di colore rosso. In questo modo è possibile, tramite misure di assorbanza, quantificare la concentrazione di calcio presente e di conseguenza il livello di mineralizzazione raggiunto dalle cellule differenziate.

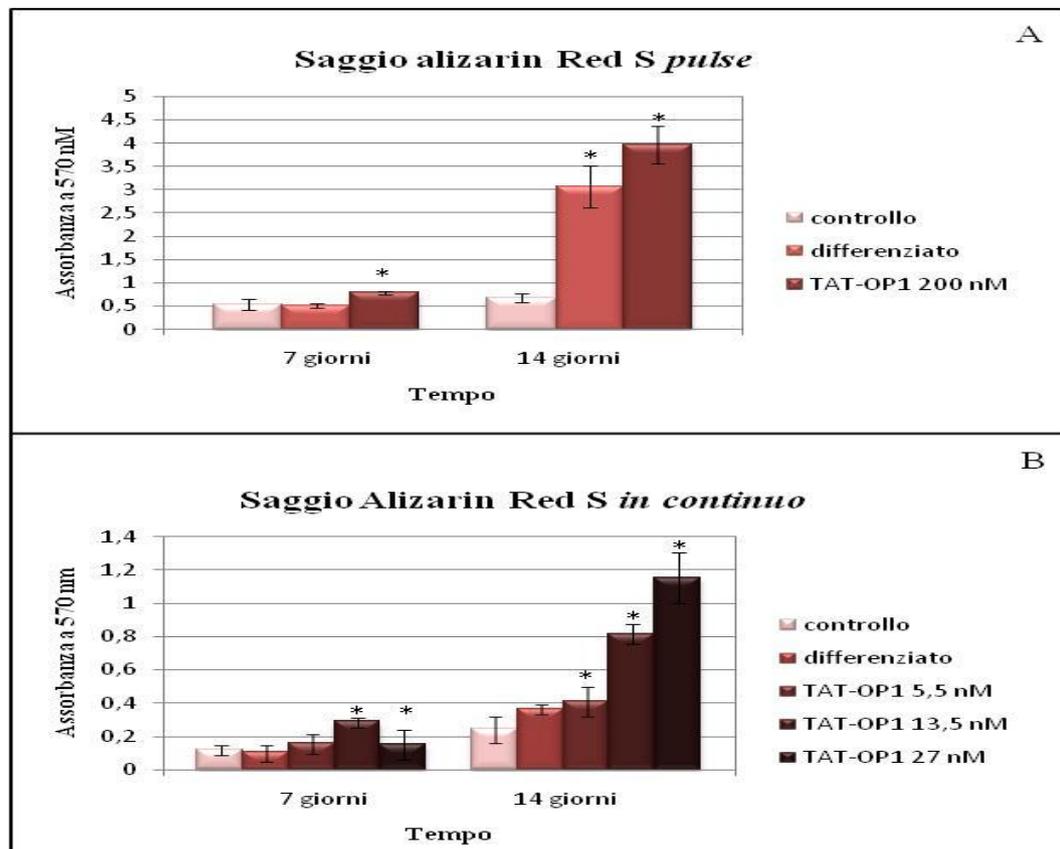


Figura 22. Saggio Alizarin Red S per la quantificazione dei livelli di mineralizzazione della matrice. A: valori di assorbanza dopo 7 e 14 giorni di trattamento con TAT-OP1 200 nM. **B:** valori di assorbanza dopo 7 e 14 giorni con TAT-OP1 5,5 nM, 13,5 nM, 27 nM. Barre di errore: \pm SD. * $P \leq 0,05$ rispetto al controllo (*t test*).

I dati raccolti con questo saggio colorimetrico confermano i risultati ottenuti con la colorazione del Von Kossa, infatti dai grafici riportati in *figura 22* si può vedere che a 14 giorni nei campioni trattati con TAT-OP1, sia con metodo *pulse*

(Figura 22 A) che *in continuo* (Figura 22 B), si ha un notevole incremento del valore di assorbanza rispetto al controllo, rappresentato da cellule trattate con terreno proliferativo. In entrambi i casi i valori di assorbanza sono maggiori per le colture trattate con la proteina in esame rispetto alle colture trattate con terreno differenziativo classico. Fa eccezione il campione trattato con il metodo *in continuo* 5,5 nM, per il quale sono stati registrati valori più bassi ma confrontabili con quelli relativi alle cellule trattate con terreno differenziativo. La colorazione del Von Kossa per questo campione sembrava essere negativa.

6.3 Immunofluorescenza su cellule MC3T3-E1

Per confermare il risultato qualitativo ottenuto tramite il saggio di Von Kossa è stata eseguita una caratterizzazione tramite immunofluorescenza dell'espressione dei marcatori tipici del differenziamento osteogenico. In particolare è stata seguita l'espressione dell'osteopontina (OPN), dell'osteocalcina (OC) e di Cbfa1/Runx2.

L'osteopontina è una fosfoglicoproteina della matrice ossea che viene espressa da vari tipi di cellule nelle quali attiva adesione, chemiotassi e trasduzione di segnali legandosi a molecole biologicamente attive. Per quanto riguarda il metabolismo del tessuto osseo, viene prodotta e depositata dagli osteoblasti nella matrice dove viene utilizzata dagli osteoclasti nei processi di riassorbimento.

L'osteocalcina è la più importante proteina non collagenosa della matrice ossea, viene prodotta e rilasciata dagli osteoblasti maturi e ha un ruolo importante nei processi di mineralizzazione e rimodellamento osseo.

Cbfa1/Runx2 è un fattore di trascrizione nucleare che regola l'espressione di geni coinvolti nel differenziamento osteogenico.

Per questo esperimento TAT-OP1 è stata utilizzata sia con il metodo *pulse* che *in continuo*, di quest'ultimo è stata presa in considerazione solo la concentrazione di 13,5 nM.

Come controllo sono state utilizzate colture trattate con terreno base e colture trattate con terreno differenziativo. L'induzione del differenziamento ha avuto una durata di 7 e 14 giorni.

Come mostrato in *figura 23*, le colture trattate per 7 giorni con TAT-OP1 con entrambi i metodi di induzione mostravano l'espressione sia di osteocalcina che di osteopontina, che sembrava essere maggiore rispetto al controllo costituito da colture trattate con terreno differenziativo.

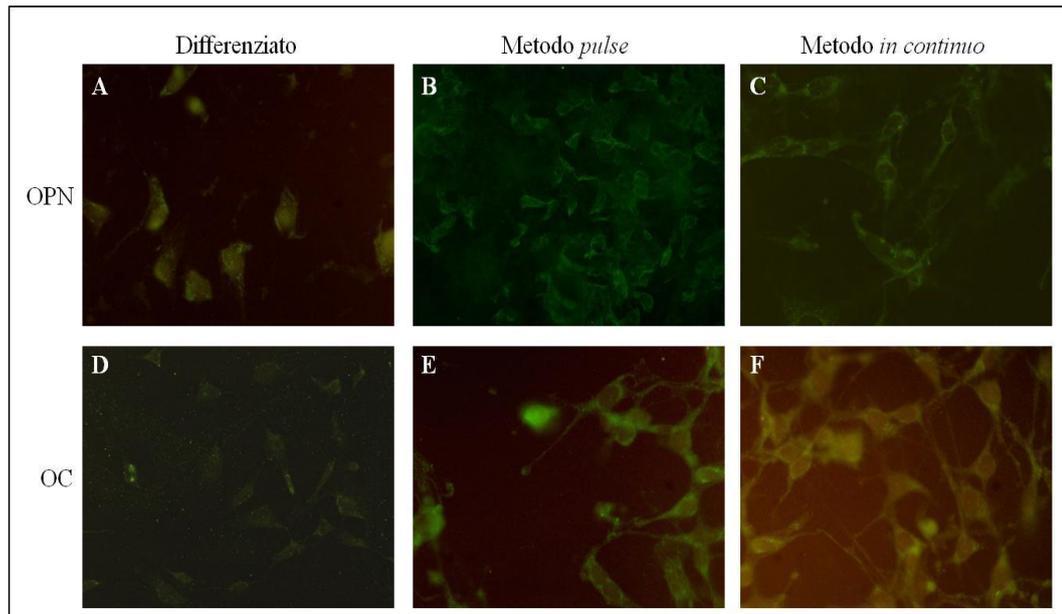


Figura 23. Microscopia a fluorescenza di cellule MC3T3-E1 eseguita utilizzando anticorpi anti-osteopontina (A-B-C) ed anti-osteocalcina (D-E-F): in A-D cellule trattate con terreno differenziativo; in B-E cellule trattate con metodo *pulse*; C-F cellule trattate con metodo *in continuo* 13,5 nM. Ingrandimento x200.

In tutti i campioni il fattore di trascrizione Cbfa1/Runx2 non veniva espresso (dati non mostrati).

Le colture trattate con terreno base sono risultate negative a tutti e tre i fattori presi in considerazione.

Dopo 14 giorni di trattamento si notava un'intensificazione del segnale in tutti i campioni trattati con TAT-OP1, che sembrava essere, ancora una volta, maggiore rispetto al controllo. In questo caso, soprattutto sui campioni trattati con la proteina in esame, compariva anche il segnale dato dall'anticorpo contro Cbfa1/Runx2 (*Figura 24*).

L'insieme dei dati ottenuti dimostra che la proteina TAT-OP1 è in grado di indurre, in cellule opportunamente stimulate, il differenziamento osteogenico. Queste infatti già dopo 7 giorni presentano mineralizzazione della matrice ed

espressione dei *markers* di differenziamento osteogenico. Dopo 14 giorni tutti questi fattori risultano più marcati, questo indica che il differenziamento progredisce fino agli stadi più avanzati.

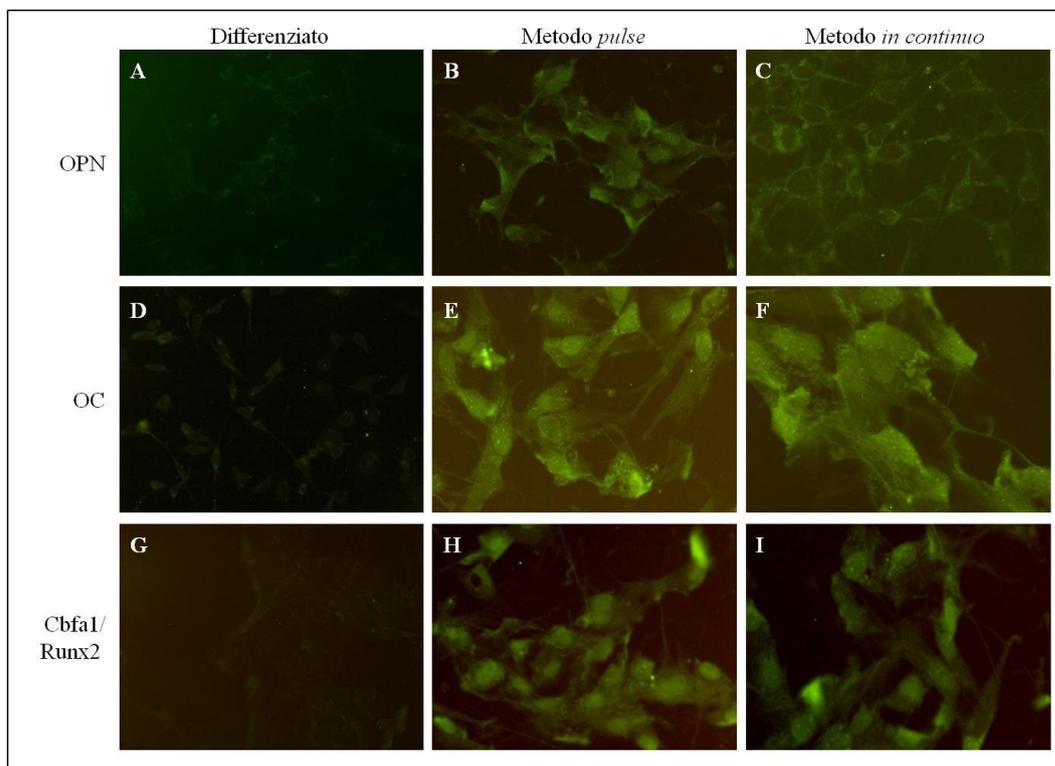


Figura 24. Microscopia a fluorescenza di cellule MC3T3-E1 eseguita utilizzando gli anticorpi anti-osteopontina (A-B-C), anti-osteocalcina (D-E-F) ed anti-Cbfa1/Runx2 (G-H-I): in A-D-G cellule trattate con terreno differenziativo; in B-E-H cellule trattate con metodo pulse; C-F-I cellule trattate con metodo in continuo 13,5 nM. Ingrandimento B-C-E-F-H-I x200, A-D-G x100.

6.4 Quantificazione della fosfatasi alcalina su cellule MC3T3-E1

La fosfatasi alcalina è un enzima presente sulla membrana plasmatica degli osteoblasti e nelle vescicole della matrice ossea, sito iniziale di formazione del cristallo di idrossiapatite.

Il saggio sfrutta la scissione del p-nitrofenilfosfato, substrato della fosfatasi alcalina, per liberare p-nitrofenolo, sostanza di colore giallo che può essere quantificata tramite una lettura spettrofotometrica.

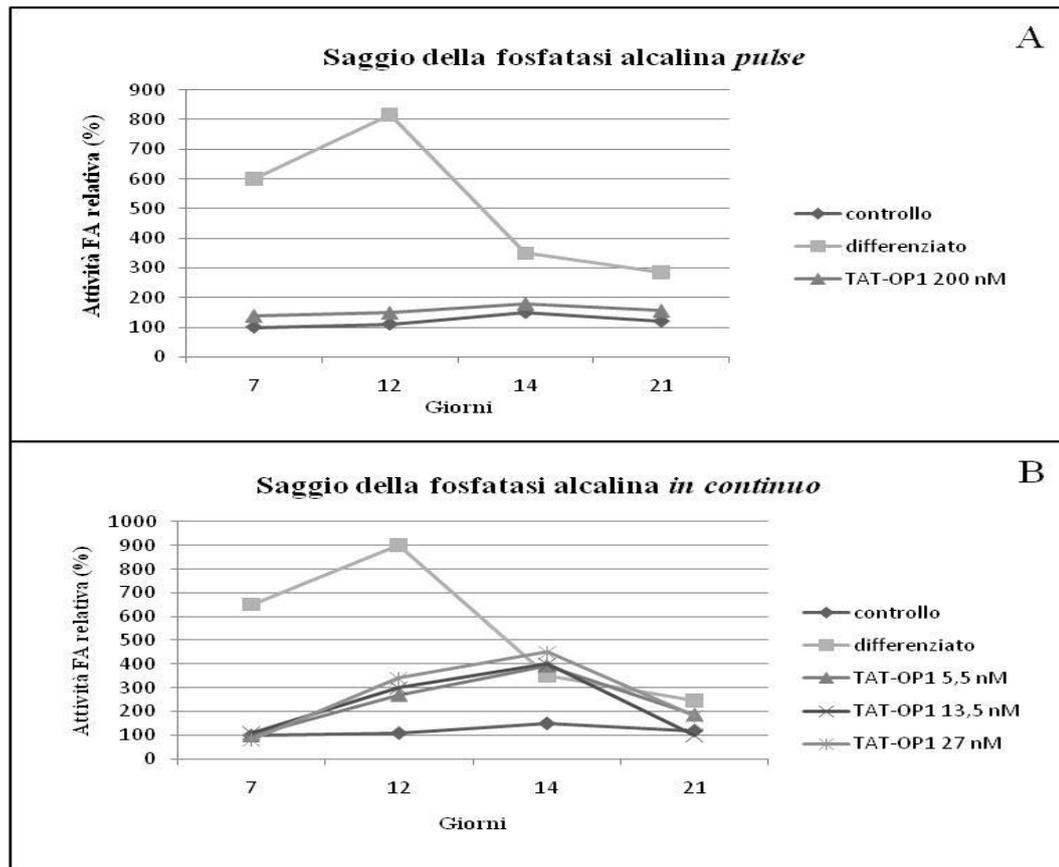


Figura 25. Saggio attività della fosfatasi alcalina. A: valori di relativi ai campioni trattati con il metodo *pulse* dopo 7, 12, 14 e 21 giorni di trattamento. **B:** valori relativi ai campioni trattati con il metodo *in continuo* dopo 7, 12, 14 e 21 giorni di trattamento.

Dal grafico riportato in *figura 25* si può notare che l'enzima presenta un'attività percentuale relativa al controllo maggiore nei campioni trattati con terreno differenziativo classico rispetto a quelli trattati con TATOP-1. Questo dato discorda con i risultati dei saggi precedenti.

7. Studio dell'attività biologica di TAT-OP1 su cellule UCBMSC

Visti i risultati positivi ed incoraggianti ottenuti nella prima parte di questo lavoro, utilizzando TAT-OP1 su cellule di linea, si è pensato di testare il potere differenziativo del costrutto in esame anche su cellule staminali mesenchimali estratte da sangue di cordone ombelicale (UCBMSC).

Dati in letteratura hanno dimostrato che le BMP sono in grado di indurre il differenziamento osteogenico in questo tipo di cellule (Reddi, 2001). In particolare sono stati condotti degli studi utilizzando OP-1 in forma ricombinante che hanno confermato questa capacità differenziativa (Sampath *et al.*, 1992).

Per raggiungere questo obiettivo per prima cosa è stato necessario ottenere una popolazione di cellule fibroblastoidi con le caratteristiche di staminalità, per poi indurre il differenziamento osteogenico utilizzando TAT-OP1.

7.1 Isolamento e caratterizzazione di cellule estratte da sangue di cordone ombelicale

Sono stati processati 20 unità di sangue cordonale ed è stata ottenuta una popolazione di cellule con morfologia fibroblastoide, visibile in coltura dopo 15 giorni dall'isolamento (*Figura 26*). Tali cellule sono state caratterizzate mediante immunofluorescenza e mantenute in coltura fino alla quindicesima generazione.

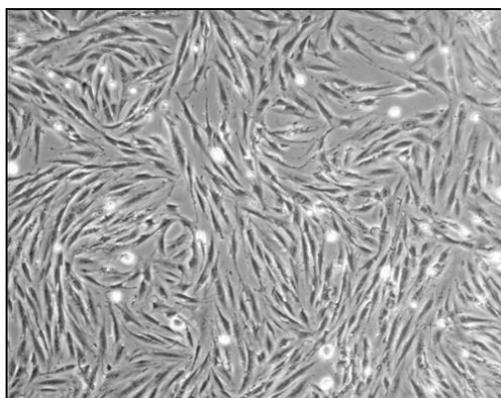


Figura 26. Microscopia ottica a contrasto di fase di cellule fibroblastoidi da UCB. Ingrandimento: x100

La caratterizzazione fenotipica mediante immunofluorescenza ha rivelato che la popolazione in esame esprimeva il CD105, il CD90, il CD166, la nestina e il c-kit, marcatori tipici di cellule staminali mesenchimali (MSC), mentre risultava negativa per il CD31, il CD34 e il CD38 (*Figura 27*). Questo profilo è compatibile con quello delle MSC. Infatti erano assenti i marcatori tipici della linea ematopoietica, quali il CD34 e il CD38. In particolare il CD34 fa parte della famiglia delle sialomucine ed è implicato nell'adesione cellulare e nel mantenimento dello stato indifferenziato dei progenitori ematopoietici (Fackler *et al.*, 1995) e il CD31 è un marcatore di linea endoteliale (DeLisser HM *et al.*, 1997).

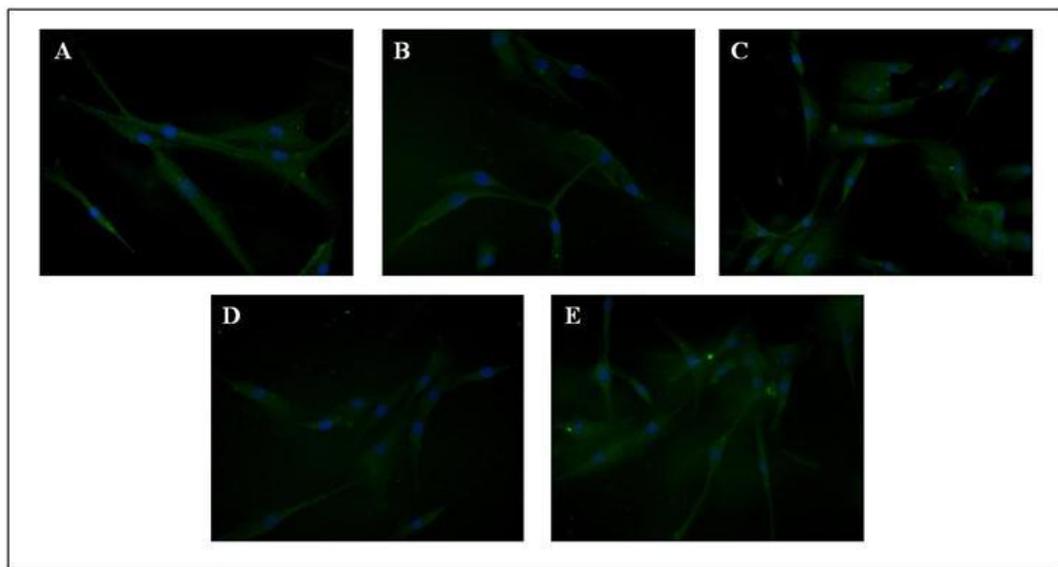


Figura 27. Microscopia a fluorescenza di cellule da UCB trattate con anticorpi anti: A - CD105, B -CD166, C -CD90, D -c-kit, E -nestina. Contrasto nucleare DAPI. Ingrandimenti x100.

Sulla popolazione in esame sono state condotte delle prove per testare la capacità differenziativa. È stato analizzato sia il differenziamento osteogenico che adipogenico. In entrambi i casi le cellule hanno risposto positivamente, infatti dopo 14 giorni di trattamento con gli appositi terreni differenziativi si osservava sia mineralizzazione della matrice (*Figura 28 B*) che comparsa di vacuoli lipidici (*Figura 28 D*), entrambi assenti nei rispettivi controlli.

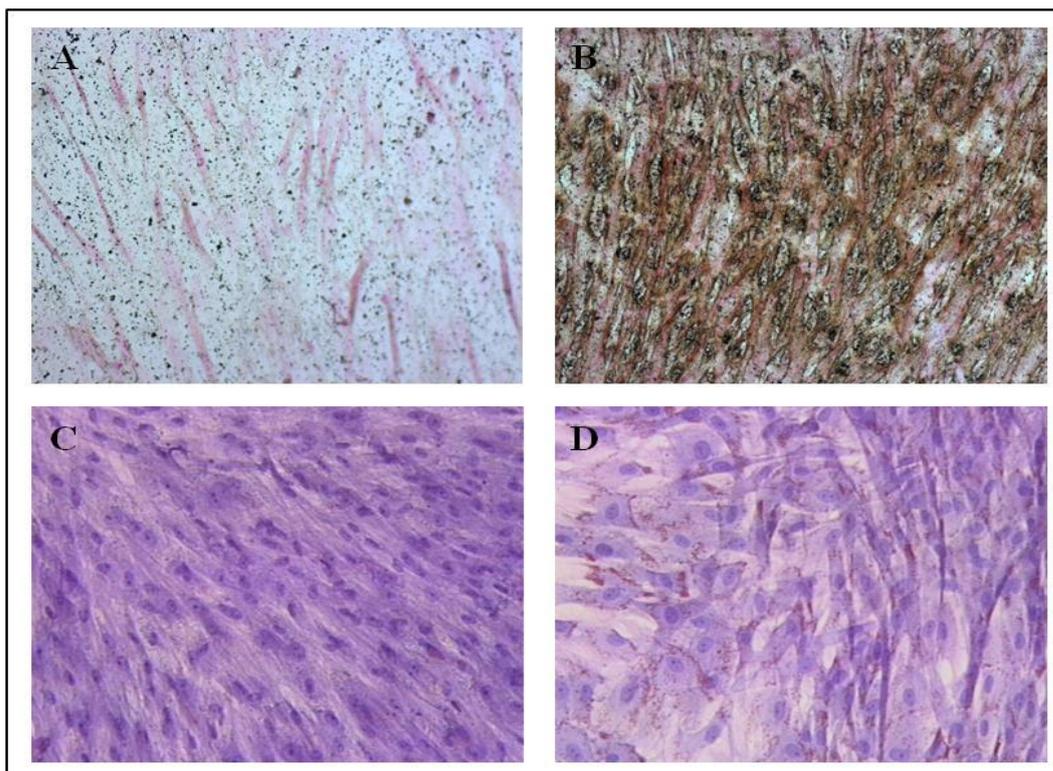


Figura 28. Studio di differenziamento osteogenico e adipogenico. A-B: Colorazione Von Kossa di cellule da UCB trattate con terreno osteogenico (B) e con terreno proliferativo (A) per 14 giorni. **C-D:** Cellule da UCB trattate con terreno adipogenico (D) e con terreno proliferativo (C) per 14 giorni . Ingrandimento x200

Da quanto ottenuto, si può concludere che la popolazione in esame possiede un profilo fenotipico compatibile con quello delle MSC, e, in opportune condizioni colturali, è in grado di differenziarsi verso la linea osteogenica e adipogenica. Tutti questi fattori contribuiscono a classificare questa popolazione come staminale mesenchimale (Dominici *et al.*, 2006).

7.2 Saggio di Von Kossa e fosfatasi alcalina su cellule UCBMSC

Una volta ottenuta la popolazione con le caratteristiche di staminalità, in grado di differenziarsi in senso osteogenico mediante la stimolazione con terreno differenziativo, si è pensato di stimolare le cellule con TAT-OP1. Per quanto riguarda i metodi di induzione sono stati presi in considerazione il metodo *pulse* e *in continuo* utilizzando la proteina, rispettivamente, alle concentrazioni di 200 e 13,5 nM.

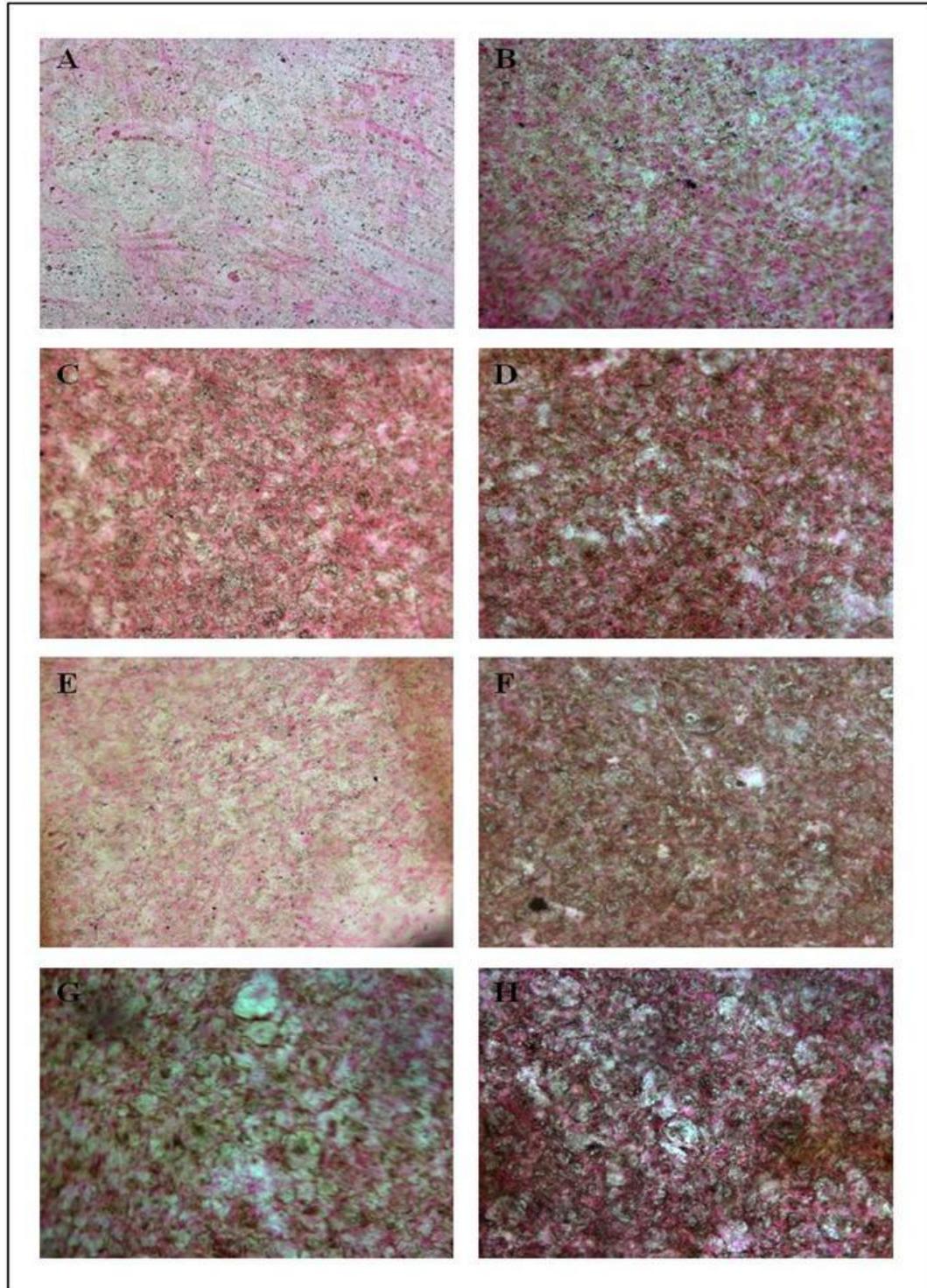


Figura 29. Colorazione Von Kossa su cellule UCBMSC. A-E controllo cellule trattate con terreno base 7 e 14 giorni rispettivamente; B-F controllo cellule trattate con terreno differenziativo 7 e 14 giorni rispettivamente; C-G cellule trattate con TAT-OP1 metodo *pulse* (200 nM per 24h) 7 e 14 giorni rispettivamente; D-H cellule trattate con TAT-OP1 metodo *in continuo* (13,5 nM) 7 e 14 giorni rispettivamente. Ingrandimento x200.

Per verificare il differenziamento sono state condotte analisi di tipo qualitativo, come il saggio di Von Kossa e della fosfatasi alcalina.

Come nel caso delle cellule di linea l'induzione ha avuto una durata di 7 e 14 giorni. Come controllo sono state utilizzate colture trattate con terreno proliferativo e colture trattate con terreno differenziativo classico.

Il saggio di Von Kossa già a 7 giorni metteva in evidenza la mineralizzazione della matrice, del tutto assente nel controllo.

Il dato veniva confermato anche dopo 14 giorni di induzione (*Figura 29*). Non si riscontravano differenze tra le colture trattate con terreno differenziativo e TAT-OP1.

Il saggio della fosfatasi alcalina è risultato positivo solo dopo 14 giorni di trattamento sia nelle colture utilizzate come controllo di differenziamento sia in quelle trattate con TAT-OP1 (*Figura 30*).

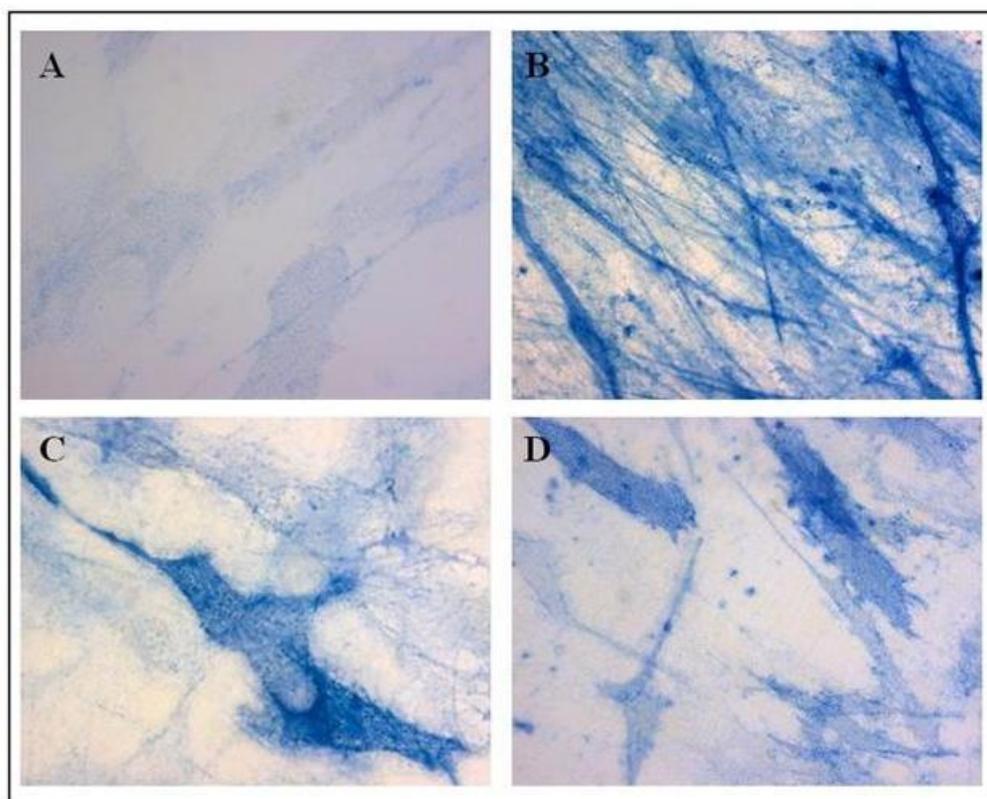


Figura 30. Colorazione della fosfatasi alcalina su cellule UCNMSC dopo 14 giorni di trattamento: **A** controllo cellule trattate con terreno proliferativo; **B** cellule trattate con terreno differenziativo; **C** cellule trattate con TAT-OP1 metodo *pulse* (200 nM per 24h); **D** cellule trattate con TAT-OP1 metodo *in continuo* (13,5 nM). Ingrandimento x200.

Visti i risultati preliminari ottenuti dai test qualitativi è possibile affermare che il costrutto TAT-OP1 è in grado di indurre la mineralizzazione della matrice e l'espressione della fosfatasi alcalina anche in cellule MSC, entrambi questi fattori sono indice di differenziamento osteogenico.

8. Coltura tridimensionale in Puramatrix HydrogelTM di UCBMSC

Valutata la capacità di TAT-OP1 di stimolare in senso osteogenico il differenziamento di UCBMSC coltivate in un sistema tradizionale bidimensionale, è stato interessante studiare la risposta cellulare mediante impiego di colture tridimensionali. Inoltre sono state impiegate microsfele di PLGA per ottenere un rilascio controllato di TAT-OP1 alla concentrazione voluta di 200 nM. In tale modo è stata garantita una diffusione continua della proteina nella matrice e una condizione ottimale di stimolazione.

Il Puramatrix è un biomateriale in forma di *hydrogel* che si ottiene per autoassemblaggio di monomeri rappresentati dalla sequenza RAD-16. E' costituito dal 99% di acqua e dal 1% di peptide. Questo è costituito da residui amminoacidici di arginina, carichi positivamente, che si alternano a residui di acido aspartico, carichi negativamente, separati da un amminoacido neutro, l'adenina (Zhang *et al.*, 1993). Questo tipo di peptidi in ambiente salino acquoso, e quindi anche in condizioni fisiologiche, si auto-assemblano formando strutture costituite da foglietti β , grazie all'alternanza di amminoacidi carichi e neutri.

Le cellule UCBMSC sono state incapsulate in Puramatrix® allo 0.25%, trattate con TAT-OP1 200 nM in soluzione nel terreno di coltura (trattamento 1) oppure con microsfele di rilascio controllato di TAT-OP1 (trattamento 2). Come controllo sono state utilizzate cellule trattate con terreno differenziativo classico.

All'analisi con microscopia elettronica a trasmissione, nelle colture sottoposte al trattamento 1 dopo 27 giorni di coltura si osservava la produzione di micro fibrille e la loro parziale aggregazione in fibre collagene (*Figura 31 A*), così come riscontrato nel controllo (*Figura 31 B*).

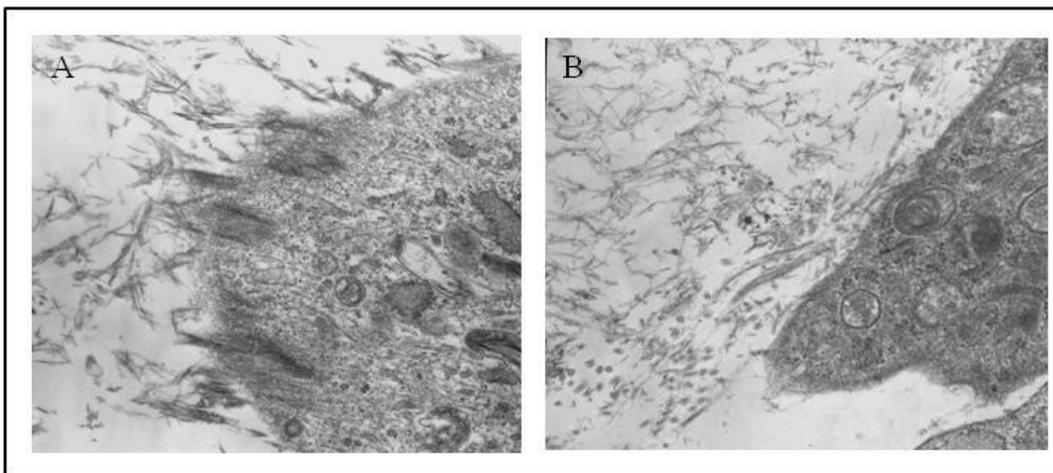


Figura 31. Immagini di microscopia elettronica a trasmissione di coltura di UCBMSC incapsulata in Puramatrix Hydrogel™. **A:** coltura differenziata con terreno preparato con TAT-OP1 200 nm dopo 27 giorni di trattamento. **B:** coltura differenziata con terreno osteogenico classico dopo 27 giorni di trattamento. Ingrandimento x30.000.

Oltre alla sintesi e all'aggregazione di micro fibrille, dopo trattamento 2 sono state evidenziate vescicole della matrice extra cellulare con piccoli cristalli di idrossi apatite (*Figura 32*).

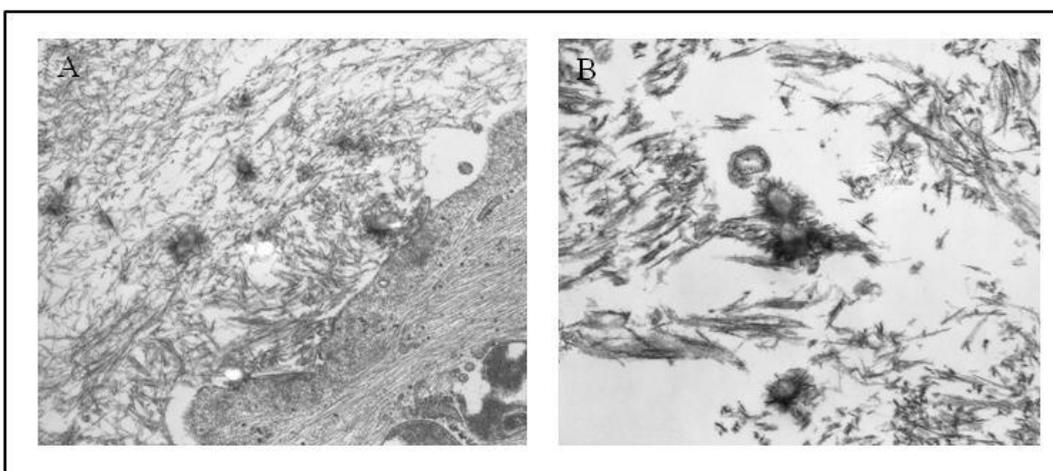


Figura 32. Immagini di microscopia elettronica a trasmissione di coltura di UCBMSC incapsulata in Puramatrix Hydrogel™ e trattate con microsfele di PLGA. **A-B:** coltura differenziata con microsfele di TAT-OP1 dopo 27 giorni di trattamento. **B:** coltura differenziata con terreno osteogenico classico dopo 27 giorni di trattamento. Ingrandimento x30.000. Ingrandimento x30.000 (A), x50.000 (B).

I risultati confermano lo stimolo da parte di TAT-OP1 sulle cellule UCBMSC a produrre matrice extracellulare simil-ossea in un microambiente dove l'organizzazione cellulare tridimensionale mima la condizione nativa. Inoltre il rilascio controllato mediante microsfele di PLGA ha contribuito all'ottimizzazione della stimolazione assicurando una concentrazione costante di TAT-OP1 e conseguentemente una sua migliore diffusione nel sistema 3D.

La presenza di cristalli di idrossiapatite, rilevata solo a tempi lunghi di trattamento, può essere interpretata alla luce della considerazione che in un sistema tridimensionale la risposta cellulare è di tipo ritardato rispetto a quanto osservato in un sistema tradizionale di coltura bidimensionale. In tali sistemi le cellule sono organizzate in monostrato e sono maggiormente reattive agli stimoli extracellulari in ragione di una riorganizzazione del *pattern* proteico di espressione sulla superficie non coinvolta nell'adesione alla piastra di coltura

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata prodotta la proteina ricombinante di fusione, TAT-OP1 che comprende il dominio di trasduzione proteica TAT e la porzione matura di OP-1, una proteina nota in letteratura per la sua capacità di indurre il differenziamento osteogenico.

Una volta ottenuto il plasmide pTAT-OP1 è stato possibile far esprimere la proteina da un ceppo batterico opportunamente ingegnerizzato di *E. Coli*. La purificazione tramite cromatografia di affinità IMAC e successiva cromatografia di gel filtrazione ha permesso di ottenere la proteina ad elevata omogeneità tuttavia, per gli studi *in vitro*, è stato necessario eliminare una piccola contaminazione di natura proteica a basso peso molecolare. Pertanto TAT-OP1 è stata sottoposta ad un ulteriore passaggio cromatografico di RP-HPLC.

Per caratterizzare la proteina purificata sono stati eseguiti studi di spettrometria di massa che hanno permesso di definire il peso molecolare esatto di TAT-OP1. Questo è risultato essere di 18549,4 Da, in ottimo accordo con il peso molecolare calcolato sulla base della sequenza amminoacidica. Inoltre mediante carbamidometilazione è stato possibile stabilire con esattezza la presenza delle sette cisteine che costituiscono la porzione attiva di OP-1.

Per risolvere i problemi di stabilità in soluzione TAT-OP1 è stata conservata in una soluzione acquosa contenente il 60% di acetonitrile e lo 0,05% di TFA. In queste condizioni è stato stabilito, mediante spettrometria UV e dicroismo circolare, che la proteina è stabile e non va incontro ad aggregazione e conseguente precipitazione. La presenza di acetonitrile e TFA nella soluzione di TAT-OP1 non è risultata tossica per le colture *in vitro* di cellule MC3T3-E1 data la notevole diluizione che si è operata sulla soluzione *stock* prima di effettuare gli studi di attività biologica.

È stato inoltre stabilito che il costrutto contenente il dominio di trasduzione proteica TAT è in grado di oltrepassare la membrana plasmatica e permanere all'interno delle cellule fino a 7 giorni dopo l'induzione senza andare incontro a fenomeni di degradazione.

Per testare il potere differenziativo di TAT-OP1 sono state utilizzate cellule di linea di tipo MC3T3-E1. I saggi effettuati ai diversi tempi di induzione: il Von Kossa per la mineralizzazione della matrice, l'immunofluorescenza dei marcatori del differenziamento osteogenico e il saggio del marcatore fosfatasi alcalina, hanno dimostrato che TAT-OP1 è in grado di stimolare il differenziamento osteogenico in cellule opportunamente trattate.

Per completare gli studi di attività biologica è stata presa in considerazione anche una popolazione di cellule fibroblastoidi estratta da sangue di cordone ombelicale. Dopo aver stabilito che la popolazione in esame possedeva le caratteristiche di staminalità, sia per quanto riguarda il fenotipo che per la capacità multidifferenziativa, è stato dimostrato che TAT-OP1 è in grado di indirizzare verso la linea osteogenetica anche colture come queste di cellule staminali mesenchimali. Questo è stato dimostrato sia su colture in monostrato, tramite saggio di Von Kossa e colorazione della fosfatasi alcalina, che su colture in matrice tridimensionale di Puramatrix Hydrogel TM. In quest'ultimo caso la stimolazione è stata effettuata anche con TAT-OP1 incapsulata in microsfele di PLGA preparate appositamente per il rilascio controllato. Sulle colture tridimensionali, grazie alla microscopia elettronica a trasmissione, è stato possibile verificare la presenza di fibre di collagene, mineralizzazione della matrice extracellulare e presenza di cristalli di idrossiapatite. Le colture trattate con le microsfele hanno risposto in modo ancora più positivo per gli stessi marcatori di differenziamento.

Sulla base di tutti i risultati ottenuti è possibile concludere che la proteina ricombinante TAT-OP1 è in grado di stimolare *in vitro* il differenziamento osteogenico sia di precursori di linea (MC3T3-E1) che di cellule a riconosciuta capacità staminale multidifferenziativa. Questo costrutto si presenta pertanto come un ottimo candidato per applicazioni di ingegneria tissutale alla luce delle potenzialità di impiego sia nella preparazione di sostituti ossei sia nell'allestimento di saggi *in vitro* di induzione differenziativa osteogenica. Inoltre, i prodotti a base di BMP ricombinanti, già disponibili alla sperimentazione clinica, necessitano di notevoli e costosi passaggi di rinaturazione *in vitro* con il conseguente svantaggio di bassa resa di produzione. La proteina da noi prodotta non richiede procedure di

rinaturazione prima del suo impiego in quanto, dopo ingresso nell'ambiente citoplasmatico mediato dal peptide di trasduzione TAT, va incontro ad attivazione per *refolding* da parte del corredo enzimatico cellulare. Per confermare l'attività biologica di TAT-OP1, saranno, in futuro, eseguiti studi *in vivo* in modelli animali di difetti ossei tessutali. L'impiego di sistemi a rilascio controllato mediante microsfele di PLGA garantirà una stimolazione continua, con definita cinetica di reazione oltre che l'impiego di una minima dose efficace.

BIBLIOGRAFIA

Antonawich F.J., Federoff H.J., Davis J.N. (1999): BCL-2 transduction, using a herpes simplex virus amplicon, protects hippocampal neurons from transient global ischemia. *Exp Neurol* . **156**: 130–137.

Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J. and Moran F. (1993): Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering*. **6**: 383-390.

Babensee J. E., McIntire L. V., Mikos A. G. (2000): Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm. Res.* **17**: 497-504.

Baldwin S. P., Saltzman W. M. (1998): Materials for protein delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Del. Rev.* **33**: 71-86.

Beker-Hapak M., McAllister S., Dowdy S. (2001): TAT-mediated protein transduction domain into mammalian cells. *Methods*. **24**: 247-256.

Brunner A.M., Gentry L.E., Cooper J.A., Purchio A.F. (1998): Recombinant type 1 transforming growth factor beta precursor produced in Chinese hamster ovary cells is glycosylated and phosphorylated. *Mol Cell Biol.* **8**(5): 2229-2232.

Celeste A.J., Iannazzi J.A., Taylor R.C., Hewick R.M., Rosen V., Wang E.A., Wozney J.M. (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci.* **87**(24): 9843-9847.

Check E. (2002): Gene therapy: shining hopes dented - but not dashed. *Nature.* **420**: 735.

Chen D., Zhao M., Mundy G. (2004): Bone morphogenetic protein. *Growth factors*. **22**(4): 233-241.

DeLisser H.M., Christofidou-Solomidou M., Strieter R.M., Burdick M.D., Robinson C.S., Wexler R.S., Kerr J.S., Garlanda C., Merwin J.R., Madri J.A., Albelda S.M. (1997): Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. **151**(3): 671-677.

Dietz G.P., Bahr M. (2004): Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse Approach. *Mol Cell Neurosci*. **27**: 85–131.

Dolgilevich S., Zaidi N., Song J., Abe E., Moonga B.S., Sun L. (2002): Transduction of TAT fusion proteins into osteoclasts and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. **299**(3): 505-509.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj, Horwitz E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**(4): 315-7.

Edelhoch H. (1967): Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*. **6**(7): 1948-1954.

Fackler M.J., Krause D.S., Smith O.M., Civin C.I., May W.S. (1995): Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood*. **85**(11): 3040-3047.

Fawell S., Seery J., Daikh Y., Moore C., Chen L.L., Pepinsky B. Barsoum (1994): Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci*. **91**: 664–668.

Frankel A.D. and Pabo C.O. (1988): Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. **55**: 1189-1193.

Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. (2007): Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg*. **77**(8): 626-31.

Green M. and Loewenstein P.M. (1988): Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. **55**: 1179-1188.

Griffith D. L., Keck P. C., Sampath T. K., Rueger D. C. and Carlson W. D. (1996): Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 878-883.

Groppe J., Greenwald J., Wiater E., Rodriguez-Leon J., Economides A.N., Kwiatkowski W., Affolter M., Vale W., Belmonte J.C.I. and Choe S. (2002): Structural basis of BMP signaling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*. **420**: 636–642.

Harwood PJ, Giannoudis PV (2005): Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin. Drug Saf.* **4**: 75–89.

Hochuli E. (1990): Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Protein. Eng.* **12**: 87-98.

Hwang N.S., Kim M.S., Sampattavanich S., Baek J.H., Zhang Z., Elisseff J. (2006): Effects of three-dimensional culture and growth factors on the

chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*. **24**(2): 284-291.

Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J., Kawabata, M. and Miyazono K. (1997): Smad6 inhibits signalling by the TGFbeta superfamily. *Nature*. **389**: 622–626.

Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. (1992): Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*. **7**(2): 139-150.

Israel D.I., Nove J., Kerns K.M., Kaufman R.J., Rosen V., Cox K.A., Wozney J.M. (1996): Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors*. **13**(3-4): 291–300.

Jainswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. (1997): Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J. Cell. Biochem*. **64**(2): 295-312.

Jena N., Martin-Seisdedos C., McCue P., Croce C.M. (1997): BMP7 null mutation in mice: Developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res*. **230**(1): 28–37.

Joliot, A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., and Prochiantz A. (1991): Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 1864-1868.

Kingsley D.M., (1994): The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. **8**(2): 133-146.

Kim D., Jeon C., Kim J.H., Kim M.S., Yoon C.H., Choi I.S., Kim S.H., Bae Y.S. (2006): Cytoplasmic transduction peptide (CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* **312**: 1277–88.

Koenig B.B., Cook J.S., Wolsing D.H., Ting J., Tiesman J.P., Correa P.E., Olson C.A., Pecquetl F., Ventura F., Grant R.A., Chen G., Wrana J., Massague´ J. and Rosenbaum J.S. (1994): Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5961–5974.

Kordower J.H., Emborg M.E., Bloch J., Ma S.Y., Chu Y., Leventhal L., McBride J., Chen E.Y., Palfi S., Roitberg B.Z., Brown W.D., Holden J.E., Pyzalski R., Taylor M.D., Carvey P., Ling Z., Trono D., Hantraye P., Déglon N., Aebischer P. (2000): Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science.* **290**: 767–773.

Kugler S., Kilic E., Bahr M. (2003): Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron specific longterm transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther.* **10**: 337–347.

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Langer R., Vacanti J.P. (1993): Tissue engineering. *Science.* **260**: 920-926.

Lindsay M.A. (2002): Peptide-mediated cell delivery: application in protein target Validation. *Curr Opin Pharmacol.* **2**: 587–594.

Macri L., Silverstein D., Clark R.A. (2007): Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* **59**(13): 1366-81. Review.

Mann D.A., Frankel A.D. (1991): Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat Protein. *EMBO J.* **10**: 1733–1739.

Marcucci G., Baldus C.D., Ruppert A.S., Radmacher M.D., Mrózek K., Whitman S.P., Kolitz J.E., Edwards C.G., Vardiman J.W., Powell B.L., Baer M.R., Moore J.O., Perrotti D., Caligiuri M.A., Carroll A.J., Larson R.A., de la Chapelle A., Bloomfield C.D. (2005): Over expression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* **23**(36): 9234–9242.

Moustakas A. and Heldt C. H. (2002): From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF β signal transduction. *Genes Dev.* **16**: 67–1871.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51** : 263-273.

Nimni, M. E. (1997): Polypeptide growth factors : targeted delivery systems. *Biomaterials.* **18**: 1201-1225.

Nishimura R., Kato Y., Chen D., Harris S. E., Mundy G. R. and Yoneda T. (1998): Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J. Biol. Chem.* **273**: 1872–1879.

Ozkaynak E., Rueger D.C., Drier E. A., Corbett C., Ridge R. J., Sampath T. K and Oppermann H. (1990): Op-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *Creat. Bio. Mol.* **9**(7): 2085-2093.

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258** : 598-599.

Recchia A., Rota D., Debetto P., Peroni D., Guidolin D., Negro A., Skaper S.D., Giusti P. (2007): Generation of a alpha-synuclein-based rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **30**(1): 8-18.

Reddi A.H. (2001): Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83-A** (Suppl. 1): S1-S6.

Sampath K. T., Maliakal J. C., Hsuschka T., Jones W. K., Sask H., Tucker R. F., White K. H., Coughlin J. E., Tucker M. M., Pang R. H. L., Corbett C., Ozkaynak E., Oppermann H. and Rueger D. C. (1992): Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J. Biol.*

Sato T. (1968): A modified method for lead staining of thin sections. *J Electron Microsc.* **17**(2): 158-159.

Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S.F. (1999): In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science.* **285**: 1569–1572.

Semino CE. (2003): Can We Build Artificial Stem Cell Compartments? *J Biomed Biotechnol.* **2003**(3): 164-169.

Shimazaki K., Urabe M., Monahan J., Ozawa K., Kawai N. (2000): Adeno-associated virus vector-mediated bcl-2 gene transfer into post-ischemic gerbil brain in vivo: prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Gene Ther.* **7**: 1244–1249.

Stanchi O., Negro A., Callegaro L. (1997): Expression of osteogenic factor OP-1 in cells of *Spodoptera frugiperda* infected with recombinant baculovirus. *United States Patent 5,641,649*.

Studier F.W., Moffatt B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-30.

Suh H. (2000): Tissue restoration, tissue engineering and regenerative medicine. *Yonsei Med J.* **41**(6): 681-4. Review.

Tabata Y. (2008): Current status of regenerative medical therapy based on drug delivery technology. *Reprod Biomed Online.* **16**(1): 70-80. Review.

Terada S., Sato M., Sevy A., Vacanti J. P. (2000): Tissue engineering in the twenty-first century. *Yonsei Med J.* **41**(6): 685-91. Review.

Urist M.R., Iwata H., Ceccotti P.L., Dorfman R. L., Boyd S. D., McDowell R. M. and Chien C. (1973): Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**: 3511–3515.

Vallejo L.F., Brokelmann M., Marten S., Trappe S., Cabrera-Crespo J., Hoffmann A., Gross G., Weich H.A., Rinas U. (2002): Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* **94**(2): 185–194.

Whitaker M. J., Quirk M. A., Howdle S. M. and Shakesheff K. M. (2001): Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J. of Pharmacy and Pharmacology*. **53**: 1427-1437.

Winnier G., Blessing M., Labosky P.A., Hogan B.L. (1995): Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.***9**(17): 2105-2116.

Woo B.H., Fink B.F., Page R., Schrier J.A., Jo Y.W., Jiang G., DeLuca M., Vasconez H.C., DeLuca P.P. (2001): Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res.* **18**(12): 1747-1753.

Wozney J.M. (2002): Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine.* **27**: S2-S8.

Wright L.R., Rothbard J.B., Wender P.A. (2003): Guanidinium rich peptide transporters and drug delivery. *Curr Protein Pept Sci.* **4**: 105–124.

Yamashita H., ten Dijke P., Huylebroeck D., Sampath T.K., Andries M., Smith J.S., Heldin C.H. and Miyazono K. (1995): Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J. Cell. Biol.* **130**: 217–226.

Yeh L.C., Adamo M.L., Olson M.S., Lee J.C. (1997): Osteogenic protein-1 and insulin-like growth factor I synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation and proliferation. *Endocrinology.***138**(10): 4181-4190.

Yoshida Y., Tanaka S., Umemori H., Minowa O., Usui M., Ikematsu N., Hosoda E., Imamura T., Kuno J., Yamashita T., Miyazono K., Noda M.,

Noda T. and Yamamoto T. (2000): Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*. **103**: 1085–1097.

Zhang H.B., Bradley A. (1996): Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. **122**: 2977–2986.

Zhang S., Holmes T.C., Lockshin C., Rich A. (1993): Spontaneous assembly of a selfcomplementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 3334- 3338.

Zhu H., Kavsak P., Abdollah S., Wrana J. and Thomsen G.H.A. (1999): SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*. **400**: 687–693.