

Relazione scientifica sull'attività di ricerca svolta.

Nel corso dei tre mesi passati nel laboratorio del dott. John Schwabe presso l'LMB-MRC di Cambridge sono state da me svolte le seguenti attività:

1) espressione e purificazione del Ligand Binding Domain (LBD) del recettore nucleare PPAR α :

Ho effettuato l'espressione in Escherichia Coli ed ho purificato la proteina prima in colonna di Ni-NTA e successivamente, dopo taglio della coda di istidine con trombina, in colonna a scambio ionico (Hi-trap Q Sepharose). Ho utilizzato la proteina, ottenuta ad un elevato grado di purezza, per effettuare tentativi di cristallizzazione in presenza di ligandi con attività agonista. Le cristallizzazioni sono state effettuate utilizzando un robot che consente lo screening di più di 1500 diverse condizioni utilizzando una quantità minima di proteina.

Ho poi utilizzato il four-corner robot (che consente di variare in modo automatico pH e concentrazione di precipitante) per trovare le migliori condizioni di cristallizzazione della proteina con i ligandi LT160, LT175 ed LT127. Ho anche effettuato tentativi di cristallizzazione di PPAR α in presenza del coattivatore SRC-1 e del ligando LT160.

Dopo qualche giorno sono apparsi cristalli di PPAR α con il ligando LT175 ed ho subito fatto dei test di diffrazione con diffrattometro ad anodo rotante. I cristalli però diffrangevano non oltre 7 angstrom, risultando quindi inadatti ad una completa raccolta dati.

2) nuova espressione e purificazione di PPAR α -LBD :

Ho utilizzato il nuovo batch di proteina purificata per effettuare nuovi tentativi di cristallizzazione con differenti condizioni : uso di additivi (ad es. differenti detergenti), diverse concentrazioni del precipitante, tecniche di microseeding utilizzando piccoli cristallini di PPAR α , ottenuti precedentemente, con il ligando LT160,.

3) espressione e purificazione delle proteine di fusione GST- PPAR γ , GST-ACTR e del LBD di PPAR γ :

Queste tre proteine, ottenute ad un elevato livello di purezza, sono state da me utilizzate per effettuare misure cinetiche e termodinamiche con lo strumento Biancore, che consente di analizzare in tempo reale l'interazione proteina-proteina o proteina-ligando.

In un primo esperimento ho immobilizzato su un sensor chip la proteina di fusione GST-PPAR γ . Ho fatto fluire successivamente sul sensore i ligandi LT160, LT127, LT175 ed il Rosiglitazone (controllo positivo), per verificare in tempo reale l'interazione proteina-ligando.

In un secondo esperimento ho immobilizzato sul chip la proteina di fusione GST-ACTR (un coattivatore di PPAR α e PPAR γ) facendo poi passare sul sensore PPAR α (e PPAR γ) con o senza ligando. Ho potuto così verificare le diverse interazioni proteina-coattivatore in presenza di ligandi con differenti attività di transattivazione.

4) esperimenti di “dynamic light scattering” :

Ho effettuato misure di dynamic light scattering su PPAR α per verificare il suo stato di aggregazione. PPAR α è presente, nelle condizioni usate per le cristallizzazioni, sotto forma di dimero.

5) uso dell'apparecchiatura di “crystal dehydration” :

Ho condotto dei test preliminari di disidratazione controllata su cristalli di PPAR α /LT175 per verificare quali siano le condizioni ottimali di umidità per avere la massima risoluzione nei dati di diffrazione RX.

Durante il periodo trascorso presso il laboratorio del dott. John Schwabe è stato possibile sviluppare un fecondo rapporto di collaborazione con reciproci scambi di idee e di esperienze nel campo dei recettori nucleari. Ho inoltre acquisito esperienza nelle tecniche di espressione e purificazione delle proteine e nell'uso di nuove apparecchiature per la cristallizzazione delle proteine e per l'analisi dell'interazione proteina-proteina e proteina-ligando.