



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in **BIOLOGIA DEI SISTEMI**
Ciclo XIV — Anno di discussione 2016

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa *Antonietta Leone*

***Progettazione di un biosensore ottico per la
determinazione atmosferica del benzene***

settore scientifico disciplinare di afferenza: **INF/01**

Dottorando

Dott. *Alessandro Capo*

Tutore

Chiar.mo Prof. *Roberto Tagliaferri*

Co-tutore

Chiar.mo Dott. *Sabato D'Auria*

ABBREVIAZIONI	
ABSTRACT	- 1 -
SOMMARIO	- 3 -
INTRODUZIONE	- 5 -
1.1 INQUINAMENTO ATMOSFERICO	- 5 -
1.1.1 IL BENZENE	- 6 -
1.2 I BIOSENSORI	- 8 -
1.2.1 BIOSENSORI OTTICI A FLUORESCENZA	- 10 -
1.3 INTRODUZIONE: APPLICAZIONI DELLE LIPOCALINE	- 12 -
1.3.1 LA FAMIGLIA DELLE LIPOCALINE	- 12 -
1.3.2 LE ODORANT BINDING PROTEIN	- 16 -
1.3.2.1 RUOLO FISIOLÓGICO DELLE ODORANT BINDING PROTEIN	- 17 -
1.3.3 PORCINE ODORANT BINDING PROTEIN	- 18 -
SCOPO DELLA TESI	- 21 -
RISULTATI E DISCUSSIONE	- 23 -
3.1 IDENTIFICAZIONE DELL'ELEMENTO MOLECOLARE DI RICONOSCIMENTO: ANALISI <i>IN-SILICO</i> - 23 -	
3.2 PURIFICAZIONE DELLA <i>PORCINE ODORANT BINDING PROTEIN</i>	- 28 -
3.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA POBP	- 31 -
3.4 SAGGIO FRET COMPETITIVO PER LA DETERMINAZIONE DEL BENZENE	- 35 -
3.5 VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DI LEGAME DELLA POBP AL BENZENE	- 39 -
3.6 IMMOBILIZZAZIONE DELLA POBP SU SUPPORTO DI SILICIO	- 49 -
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	- 51 -
MATERIALI E METODI	- 53 -
5.1 MATERIALI	- 53 -
5.2 DOCKING INVERSO: IDTARGET	- 53 -
5.3 DOCKING DIRETTO: AUTODOCK 4.2	- 53 -
5.4 TRASFORMAZIONE DELLA POBP IN CELLULE ESCHERICHIA COLI BL21(DE3)	- 54 -
5.5 ESPRESSIONE DELLA POBP	- 55 -
5.6 PURIFICAZIONE DELLA POBP	- 55 -

5.7 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN CONDIZIONI DENATURANTI - 56 -
5.8 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA..... - 56 -
5.9 SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA - 56 -
5.10 MISURE DI DICROISMO CIRCOLARE - 57 -
5.11 SAGGIO COMPETITIVO FLUORIMETRICO..... - 57 -
5.12 VIRTUAL SCREENING DOCKING: PYRX - 57 -
5.13 IMMOBILIZZAZIONE COVALENTE DELLA POBP SU SUPPORTO DI SILICIO - 58 -

BIBLIOGRAFIAI

RINGRAZIAMENTI.....

Abbreviazioni

1-AMA:	1-Amminoantracene
Å:	<i>Angstrom</i>
Abs:	Assorbanza
AGPs:	α-Acido Glicoproteine
APTES:	3-Aminopropiltrirossilano
Blg:	β-Lattoglobulina
bOBP:	<i>Bovine Odorant Binding Protein</i>
Bsa:	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BTEX:	Benzene, Toluene, Etilbenzene, Xileni
CD:	Dicroismo Circolare
Cys:	Cisteina
D.Lgs.:	Decreto Legislativo
EPA:	<i>Environmental Protection Agency</i>
FID:	<i>Flame Ionization Detector</i>
FRET:	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FTIR:	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GST:	Glutazione S-Transferasi
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC:	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBMP:	2-Isobutil-3-Metossipirazina
Ile:	Isoleucina

Abbreviazioni

IPTG:	β-D-1-Tiogalattopiranoside
IUPAC:	<i>The International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDa:	<i>Kilo Dalton</i>
LB:	Lauria-Bertani
Leu:	Leucina
LOD:	<i>Limit of Detection</i>
Met:	Metionina
MRE:	<i>Molecular Recognition Element</i>
O.D:	Densità Ottica
OBP:	<i>Odorant Binding Protein</i>
Phe:	Fenilalanina
pOBP:	<i>Porcine Odorant Binding Protein</i>
ppm:	Parti per Milione
RBP:	<i>Retinol Binding Protein</i>
SCR:	Regione Strutturalmente Conservata
TLV-TWA:	<i>Threshold Limit Value-Time Weighted Average</i>
Trp:	Triptofano
Tyr:	Tirosina
UV/Vis:	Ultra-Violetto/Visibile
UV:	Ultra Violetto
Val:	Valina
VWD:	Van Der Walls

Abstract

In recent years, environmental pollution, particularly air pollution, is a subject of great scientific and public interests. The reason is due to the strong impact on human health. Air pollution is due to the placing in the atmosphere of polluting substances coming mostly from fossil fuel use in the various combustion processes, used to power the engine vehicles, industrial machinery and for the production of electrical energy. The primary air pollutants, waste products of combustion are carbon monoxide, sulphur oxides and nitrogen, particulates and aromatic hydrocarbons.

Different scientific studies correlate the presence and increased atmospheric concentrations of aromatic hydrocarbons, in urban canter due to the emission of exhaust gases of vehicular traffic, with arise of a variety of tumors.

Among the aromatic hydrocarbons, benzene is a known carcinogen and is widely demonstrated its toxicity for the blood cells and hematopoietic organs, but it is also the cause of several tumors of the respiratory system. Scientific evidence shows that exposure to high concentrations or prolonged time is responsible of several forms of leukemia, between all acute myeloid leukemia. For these reasons, the emission limit values and the daily exposure are very low, fixed respectively to $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and 0.5 ppm.

Actually, conventional analytical methods used for detection of benzene need a preliminary step of sampling on field and then the subsequent laboratory analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Consequently, these methods are expensive and time-consuming.

It appears evident that a simple, rapid and sensitive method for detection of benzene that could work in continuous is needed. With this aim we proposed to develop a portable, highly sensitive and economic optical biosensor platform for monitoring in continuous the atmospheric level of benzene.

In particular, we have developed a fluorescent biosensor that use the porcine odorant binding protein (pOBP) as molecular recognition element (MRE). pOBP is a protein that belongs to the Lipocalin superfamily. *In-silico* experiments have showed the pOBP high specificity and affinity for benzene.

To monitor benzene we developed a competitive assay based on FRET principle. In particular, benzene is monitored as competition efficiency between the 1-aminoanthracene (fluorescent probe) and benzene for the pOBP binding site.

The competition efficiency is evaluated as reduction of the fluorescence intensity; the limit of detection of the developed assay is $3.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$, lower respect to the actual emission limit of benzene as regulated by law.

A next step of the project will be the development of a sensor chip using a silicon wafer for monitor in continuous the atmospheric levels of benzene.

Preliminary results obtained during the PhD project have showed the possibility to immobilize the pOBP on a chip surface. In order to monitor the presence of benzene in large areas it will be necessary to integrate the sensors into an automatic control and wireless communication system (sensor network). In addition, the enormous amount of data collected will require of "big data analysis" through the use of designed software in order to establish a correlation between the onset of cancer and the levels of hydrocarbons present in the atmosphere.

Sommario

Negli ultimi anni l'inquinamento ambientale, in particolare quello atmosferico, è un argomento di grande interesse pubblico e scientifico. Il motivo di tale interesse è dovuto al forte impatto sulla salute dell'uomo. L'inquinamento atmosferico è dovuto all'immissione in atmosfera di sostanze inquinanti provenienti per lo più dall'uso di combustibili fossili nei vari processi di combustione, utilizzati per alimentare i veicoli a motore e i macchinari e per la produzione di energia elettrica. I principali inquinanti atmosferici, prodotti di scarto della combustione, sono il monossido di carbonio, gli ossidi di zolfo ed azoto, il particolato e gli idrocarburi aromatici.

Preoccupante è il costante aumento dei livelli atmosferici di idrocarburi aromatici nei grandi centri urbani, dovuto all'emissione dei gas di scarico del traffico veicolare. Numerosi studi scientifici correlano la presenza e l'aumento delle concentrazioni atmosferiche di idrocarburi aromatici con l'induzione di una varietà di tumori.

Tra gli idrocarburi aromatici, il benzene è un noto cancerogeno e la sua tossicità è ampiamente dimostrata per le cellule sanguigne e gli organi ematopoietici, ma è causa anche di diversi tumori a carico dell'apparato respiratorio. Evidenze scientifiche dimostrano che l'esposizione ad elevate concentrazioni o prolungata nel tempo è causa di diverse forme di leucemia, tra tutte la leucemia mieloide acuta. Per questi motivi assistiamo ad una continua riduzione dei valori soglia di emissione ($5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e di esposizione giornaliera (0,5 ppm).

Attualmente i metodi di rilevamento convenzionali prevedono una fase di campionamento in loco e la successiva analisi del campione mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa; ciò determina un'analisi lenta e costosa. Queste osservazioni hanno determinato la necessità di un monitoraggio continuo dei livelli di benzene nell'aria con il fine di migliorare la salute pubblica. Nell'ottica, quindi, del monitoraggio in loco e della determinazione in continuo dei livelli atmosferici di benzene, è stato proposto lo sviluppo di una piattaforma biosensoristica ottica, portatile, altamente sensibile ed economica.

Il biosensore progettato è basato sull'utilizzo, come elemento di riconoscimento molecolare, della porcina odorant binding protein (pOBP), una lipocalina capace di riconoscere il benzene con specificità ed elevata affinità, identificata mediante analisi *in-silico*. La determinazione del benzene avviene mediante un saggio fluorimetrico competitivo *FRET*, dove il benzene compete con l'1-amminoantracene (sonda fluorescente) per il sito di legame della proteina. La competizione del benzene è valutata come riduzione dell'intensità di fluorescenza, mediante la quale ne è determinata la concentrazione; la sensibilità del saggio è pari a $3,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$, inferiore agli attuali limiti di legge.

Il *chip* sensore sarà sviluppato su un supporto ottico di silicio, per cui la pOBP è stata immobilizzata covalentemente su un *wafers* di silicio e ne è stata valutata la corretta immobilizzazione. L'obiettivo futuro è quello di realizzare una piattaforma biosensoristica, che possa monitorare in continuo i livelli atmosferici di benzene.

Considerate le vaste superfici da monitorare sarà necessario che i sensori siano integrati in un sistema (*sensor network*) a gestione automatica e comunicazione wireless. L'enorme mole di dati raccolti dal monitoraggio richiederà "*big data analysis*" mediante l'utilizzo di un *software* appositamente progettato al fine di stabilire una correlazione tra l'insorgenza di patologie tumorali ed i livelli di idrocarburi presenti nell'atmosfera.

Introduzione

Le biotecnologie, grazie ai grandi progressi della biologia molecolare moderna, hanno conosciuto una enorme crescita negli ultimi decenni. L'ingegneria genetica, le tecniche immunologiche e l'ingegneria proteica hanno dato nuovo impulso alle ricerche sui biosensori che appaiono come uno degli argomenti trainanti delle biotecnologie sia in campo della ricerca che nelle applicazioni pratiche.

La determinazione in continuo di un gran numero di sostanze è di enorme rilevanza scientifica e tecnologica, nel controllo del processo, nelle industrie chimiche ed alimentari ed in particolare nel monitoraggio ambientale (Campanella L., 1999).

La necessità di metodi analitici sempre più sensibili e selettivi; è continuamente soddisfatta dai progressi costanti nella strumentazione analitica (gas cromatografia, HPLC, spettrometria di massa, spettroscopia di assorbimento atomico, etc.). Tuttavia per il loro elevato costo, queste potenti tecniche strumentali sono impiegate solo in laboratori specializzati e, in generale, non sono adatte alle determinazioni in *real-time* o in campo (Mascini M. et al., 1988). Per questo motivo lo sviluppo dei biosensori altamente selettivi, sensibili, facili da usare, da introdurre in un qualsiasi ambiente anche notevolmente complesso (aria, acqua, fumi, sangue, urina, saliva, scarichi industriali o anche brodi di fermentazione) suscita un crescente interesse.

Negli ultimi anni è aumentata considerevolmente la richiesta di dati sull'ambiente, con particolare riguardo alle indagini sui livelli di concentrazione o di tossicità di un numero sempre crescente di inquinanti nelle varie matrici ambientali.

Di particolare interesse è il monitoraggio di inquinanti atmosferici, in quanto di impatto diretto sulla salute pubblica.

1.1 Inquinamento atmosferico

L'inquinamento che sia esso idrico, atmosferico o del suolo, è uno dei problemi sicuramente più sentito a livello mondiale. L'inquinamento atmosferico è descritto come la presenza nell'atmosfera di sostanze che causano un effetto misurabile sull'essere umano, sugli animali, sulla vegetazione o sui diversi materiali; queste sostanze di solito non sono presenti nella normale composizione dell'aria, oppure lo sono ad una concentrazione inferiore.

Gli inquinanti vengono solitamente distinti in due gruppi principali: quelli di origine antropica, cioè prodotti dall'uomo, e quelli naturali. I contaminanti atmosferici, possono anche essere classificati in primari, cioè liberati nell'ambiente come tali (come ad esempio il biossido di zolfo ed il monossido di azoto) e secondari (come l'ozono) che si formano successivamente nell'atmosfera attraverso reazioni chimico-fisiche.

Finora sono stati catalogati numerosi contaminanti dell'aria, prodotti per lo più dalle attività umane con i vari processi industriali, con l'utilizzo dei mezzi di trasporto o in altre circostanze. Le modalità di produzione e di liberazione dei vari inquinanti sono estremamente varie, così come sono moltissime le variabili che possono intervenire nella loro diffusione nell'atmosfera. Dopo la loro emissione in atmosfera, gli inquinanti primari sono soggetti a processi di diffusione, trasporto e deposizione. Possono subire inoltre, dei processi di trasformazione chimico-fisica che possono portare alla formazione degli inquinanti secondari, nuove specie chimiche che spesso risultano più tossiche e di più vasto raggio d'azione dei composti originari.

I principali inquinanti primari sono quelli emessi nel corso dei processi di combustione di qualunque natura, cioè il monossido di carbonio, il biossido di carbonio, gli ossidi di azoto (principalmente sotto forma di monossido di azoto), le polveri, gli idrocarburi aromatici tra cui si distingue per pericolosità il benzene. Nel caso in cui i combustibili contengano anche zolfo, si ha inoltre emissione di anidride solforosa. La fonte antropica di maggior peso è il traffico autoveicolare, poiché esso realizza una combustione a volume costante; importanti sono anche le caratteristiche del combustibile stesso, poiché mentre il metano brucia tendenzialmente in maniera completa, con l'aumento del peso molecolare degli idrocarburi si ha maggiore probabilità di rilascio di incombusti, nonché maggiore formazione di prodotti di ossidazione parziale.

Gli idrocarburi aromatici tra tutti gli inquinanti rappresentano quelli più dannosi per la salute dell'uomo. Il benzene e gli altri idrocarburi aromatici (toluene, etilbenzene, orto-meta e para xileni), definiti complessivamente BTEX, sono presenti principalmente nell'aria delle zone urbane e industrializzate (Rappenglück B. et al., 1998).

La crescente urbanizzazione ed industrializzazione hanno determinato un aumento dei livelli di idrocarburi aromatici immessi in atmosfera, più del 50% dovuto ai gas di scarico del traffico veicolare. Evidenze scientifiche correlano l'aumento dell'incidenza di patologie tumorali con gli elevati livelli atmosferici di idrocarburi aromatici, di particolare interesse risulta essere il benzene.

1.1.1 Il benzene

Il benzene è un liquido volatile, incolore e dall'odore caratteristico. È il capostipite dei composti aromatici, così chiamati originariamente proprio per l'odore intenso e particolare, sono composti che contengono uno o più anelli aromatici (Lide DR., 2008). L'anello aromatico del benzene, formato da sei atomi di carbonio disposti ad esagono, è caratterizzato da un'elevata stabilità chimica che è alla base della maggior parte delle proprietà di questo composto: altamente infiammabile, elevato potere antidetonante, bassa viscosità, elevata solubilità in solventi polari e bassa solubilità in acqua. Peculiari caratteristiche ne favoriscono il larghissimo impiego nelle più svariate attività. Le principali fonti espositive per la popolazione generale risultano, il fumo di sigaretta e l'aria (anche all'interno dell'abitacolo) contaminata da elevati livelli di benzene a causa del traffico veicolare o dei vapori provenienti dai distributori di benzina.

Le principali fonti espositive di origine occupazionale derivano dai seguenti impieghi del benzene: additivo nei carburanti; sintesi industriale di composti organici quali etilbenzene (precursore dello stirene, utilizzato per produrre polimeri, copolimeri, resine plastiche e lattice), cumene (convertito a fenolo per la produzione di adesivi e resine), cicloesano (utilizzato nella produzione di alcuni tipi di *Nylon*), nitrobenzene (per la produzione di anilina, vernici e altri prodotti), alchilbenzene (per la produzione di detergenti) e clorobenzene (per la produzione di polimeri, pesticidi, vernici).

Il benzene è stato classificato dall'*IARC* come agente cancerogeno del gruppo 1. Secondo l'*IARC* vi è sufficiente evidenza che il benzene sia cancerogeno per l'uomo e in particolare causa: leucemia mieloide acuta e leucemia non linfocitica acuta. L'esposizione al benzene è stata inoltre positivamente associata a leucemia linfocitica acuta, leucemia linfocitica cronica, mieloma multiplo, linfoma non-*Hodgkin* (*IARC MONOGRAPHS*. 100F).

A causa della notevole volatilità del benzene, la principale via di esposizione per l'uomo è rappresentata dall'inalazione, infatti l'inalazione di un tasso molto elevato di benzene può portare al decesso; cos' come un'esposizione da cinque a dieci minuti ad un tasso di benzene nell'aria al 2% (ovvero 20000 ppm). Dei tassi più bassi possono generare sonnolenza, vertigini, tachicardia, mal di testa, tremori, stato confusionale o perdita di coscienza. La dose letale per ingestione è di circa 50÷500 mg/kg milligrammo di sostanza ingerita rispetto al peso dell'individuo espresso in chilogrammi. Il principale effetto di un'esposizione cronica al benzene è il danneggiamento dei tessuti ossei e la diminuzione delle cellule del midollo osseo, che può causare una diminuzione del tasso di globuli rossi nel sangue e un'anemia aplastica o una leucemia. Può anche dare origine a coaguli, difficoltà di coagulazione del sangue ed indebolimenti del sistema immunitario (David L.B., 1998).

La sua cancerogenicità è legata al suo comportamento da agente intercalante: esso, infatti "scivola" tra i nucleotidi di un acido nucleico (come il DNA) provocando errori di lettura o scrittura del codice genetico; ciò danneggia la sintesi proteica e rende incontrollata la riproduzione cellulare (portando al cancro). Danneggia soprattutto le cellule germinali (Singh R.K. et al., 2011).

Attualmente i livelli di emissione in atmosfera e l'esposizione giornaliera al benzene sono regolati dalla normativa entrata in vigore il 30 settembre 2010 mediante il *Decreto Legislativo n°155 del 13 agosto 2010* che va anche ad abrogare le norme relative precedenti in ottemperanza della *Direttiva Europea 2008/50/CE*.

Il limite di sicurezza per i lavoratori esposti al benzene, come TLV-TWA (*Threshold Limit Value- Time-Weighted Average*), è di 0,5 ppm, pari a 1,6 mg/m³, mentre la concentrazione atmosferica limite per la protezione della salute umana è di 5 µg/m³.

Il monitoraggio dei livelli atmosferici di benzene è regolamentato dalla norma tecnica: UNI EN 14662:2005, parti 1, 2 e 3, "*Qualità dell'aria ambiente. Metodo normalizzato per la misurazione della concentrazione di benzene*", il principio di misura di riferimento è la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa. Il monitoraggio viene realizzato mediante campionamento attivo e/o passivo dell'aria su fiale di carbone (*Analyst* e/o *Radiello*) per un periodo di 24 ore con successivo desorbimento del campione raccolto mediante desorbimento termico e infine analisi gascromatografica da realizzarsi in laboratorio.

Di recente il monitoraggio del benzene viene realizzato mediante campionamento attivo automatico (centralina BTEX) che effettua il campionamento dell'aria con frequenza oraria e successiva analisi gascromatografica accoppiata a rivelatori FID (*flame ionization detector*) (Mukherjee A.K., 2016; Prati M.V., 2015). Entrambe le metodologie non permettono un monitoraggio in continuo e prevedono un pretrattamento del campione raccolto.

Le attività di monitoraggio ambientale, quindi, richiedono disponibilità di dispositivi analitici affidabili, di facile impiego, di costo relativamente contenuto, automatici ed utilizzabili in campo. La ricerca nel campo dei biosensori ha proposto diverse soluzioni per la determinazione di analiti importanti per la stima della qualità dell'ambiente (Praet E. et al., 1995; Rogers K.R. et al., 1995).

1.2 I Biosensori

Nella definizione più generale un sensore è un dispositivo in grado di generare un segnale, tipicamente elettrico, in risposta alla variazione di una grandezza fisico-chimica esterna. I sensori sono ormai parte integrante dell'odierna tecnologia, venendo incontro alla crescente esigenza di monitoraggio di grandezze fisiche e chimiche in particolari condizioni operative: in remoto, in tempo reale, in ambienti inaccessibili all'operatore umano sia per la potenziale pericolosità che per le dimensioni, da parte di personale non esperto (auto-monitoraggio, es. sensori di glicemia per diabetici).

Qualunque sia la natura della grandezza da misurare, tutti i tipi di sensori hanno in comune caratteristiche quali l'accuratezza, la precisione, il limite di *detection* (LOD), la sensibilità, la selettività, il tempo di risposta e l'intervallo di linearità.

In base alla natura della grandezza da misurare è possibile classificare i sensori in fisici o chimici. Tipicamente i primi generano un segnale elettrico al variare di grandezze quali la pressione o la temperatura, le dimensioni o la rotazione; mentre i secondi modulano il segnale generato in funzione della concentrazione di uno specifico analita, purché sia introdotto nel sensore un elemento attivo capace di riconoscerne la presenza.

Nei sensori chimici l'elemento attivo può essere sia un materiale che subisce un cambiamento in presenza dell'analita di interesse, sia un recettore, che percependo la presenza dell'analita subisce una variazione chimico-fisica convertibile in un segnale misurabile da un elemento detto trasduttore posto in intimo contatto con il recettore.

La selettività del sensore viene fortemente influenzata dalla capacità di riconoscimento del recettore.

Sensori chimici ad elevatissima selettività sono definiti biosensori, dove la selettività del riconoscimento da parte del recettore è enormemente incrementata impiegando come biocomponente immobilizzato un enzima, un recettore, un acido nucleico, un aptamero, un anticorpo, una cellula o un tessuto, sfruttando così i meccanismi di riconoscimento chiave-serratura molto comuni in natura (Rechnitz G.A. et al., 1979; Rechnitz G.A. et al., 1990)

Il termine biosensore è apparso per la prima volta in letteratura alla fine degli anni 70, ma in realtà il primo biosensore è stato inventato dal professor *Leland C. Clark Jnr.* nel 1956 e successivamente, nel 1962, perfezionato per la determinazione del glucosio nel sangue.

Una definizione più rigorosa di biosensore è stata elaborata dalla *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)* che lo definisce come una tipologia specifica di sensore chimico che include un elemento biologico o di derivazione biologica, sia integrato sia intimamente associato con un trasduttore fisico-chimico, il cui compito è di riconoscere in modo specifico il composto di interesse; definendo inoltre il trasduttore come un dispositivo capace di convertire la risposta biochimica in un segnale quantificabile ed elaborabile (Daniel R. et al., 2001).

Nello specifico, un biosensore consta di tre parti: il biomediatore, il trasduttore ed una componente microelettronica (fig. 1).

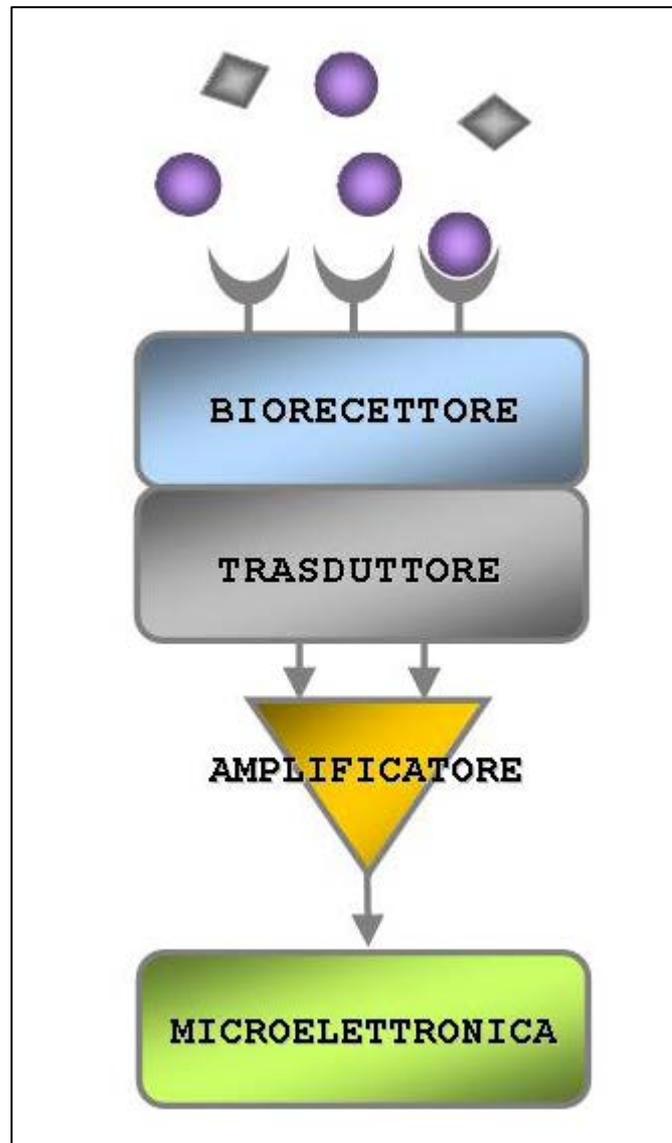


Figura 1. Rappresentazione schematica di un biosensore.

I biosensori possono essere classificati in base al tipo di biomediatore in biosensori del tipo catalitico e in biosensori di affinità. I biosensori catalitici fanno uso di bio-componenti in grado di riconoscere molecole e trasformarle in prodotti attraverso una reazione chimica, per lo più si basano sull'uso di enzimi, microrganismi, cellule o tessuti. I biosensori di affinità sfruttano le specifiche capacità di una molecola, di legarsi specificamente all'elemento di bio-riconoscimento; nel caso in cui quest'ultimo è un recettore si definiscono biosensori chemorecettoriali mentre quando è un anticorpo si definiscono immunosensori (Daniel R. et al., 2001).

In base al tipo di trasduttore e al tipo di segnale generato è possibile classificare i biosensori in elettrochimici conduttometrici, amperometrici, impedenziometrici, e potenziometrici; calorimetrici; acustici; piezoelettrici ed ottici ad assorbanza, emissione e polarizzazione.

Un biosensore elettrochimico in genere è basato su una reazione enzimatica, nella quale una specie chimica non elettroattiva viene trasformata in una elettroattiva generando un segnale elettrico relazionata alla concentrazione dell'analita in esame.

Un biosensore calorimetrico è in grado di individuare piccole variazioni termiche associate all'interazione proteina-ligando o enzima-substrato. La concentrazione di ligando o substrato è direttamente proporzionale alla variazione di energia termica misurata.

Nei biosensori amperometrici è misurata la corrente che passa tra un elettrodo di misura ed uno di riferimento, ai quali è stata applicata una differenza di potenziale costante; nel caso dei biosensori potenziometrici si rileva la variazione di energia potenziale correlata ad esempio a cambi di pH e anidride carbonica.

I sensori piezoelettrici sfruttano la variazione di risonanza di un'onda acustica che attraversa un cristallo di un materiale piezoelettrico come il quarzo. Lo spostamento della frequenza di oscillazione è dovuto all'assorbimento di un analita sulla superficie del cristallo ed è direttamente proporzionale alla massa dell'analita adsorbito.

1.2.1 Biosensori ottici a fluorescenza

I biosensori ottici misurano variazioni nell'assorbanza, nell'emissione di fluorescenza, nell'indice di rifrazione e nella diffusione della luce mediante l'utilizzo di trasduttori quali fibre ottiche, guide d'onda, fotodiodi o interferometri.

Molto diffusi sono i biosensori che sfruttano le proprietà ottiche delle proteine direttamente correlate alle variazioni conformazionali che esse subiscono in seguito all'interazione con l'analita.

Di particolare interesse e diffusione sono i biosensori a fluorescenza, classificabili come: *label-free*, i quali si basano sulla variazione dell'emissione di fluorescenza intrinseca della proteina associata ai residui amminoacidici aromatici, quali triptofano e tirosina; *label-bound* che si basano sulla variazione della fluorescenza estrinseca, dovuta a specifici fluorofori associati alla proteina.

Nella fluorescenza intrinseca si segue la variazione di emissione di fluorescenza dei residui triptofanilici che risentono maggiormente della variazione dell'intorno chimico, dovuto o al cambiamento conformazionale della struttura proteica che modifica le distanze fra specifici amminoacidi oppure a variazioni del raggio idrodinamico della proteina, o ancora da esposizione al solvente di particolari residui amminoacidici.

La variazione dell'emissione di fluorescenza associata al cambiamento conformazionale della proteina in seguito all'interazione con il ligando, può essere valutata come: variazione dell'intensità di emissione di fluorescenza; variazione del rapporto tra l'intensità di emissione di fluorescenza di due diversi fluorofori (metodo raziometrico); rotazione del piano di polarizzazione della radiazione emessa rispetto a quella incidente (anisotropia); variazione del tempo di decadimento dell'emissione di fluorescenza. La misura diretta dell'emissione di fluorescenza soffre di alcuni fenomeni quali smorzamento (*quenching*), fotossidazione, errore dello sperimentatore e diluizione del campione, per tali motivi vengono preferiti i metodi raziometrici.

Su questo principio si sono sviluppati biosensori che sfruttano il fenomeno di "Fluorescence Resonance Energy Transfer" (*FRET*). Il *FRET* è un fenomeno di trasferimento energetico che avviene per effetto di risonanza dovuta ad interazioni dipolo-dipolo intermolecolari che si instaurano tra una coppia di fluorofori, definiti rispettivamente donatore ed accettore (Clegg R., 1993). Affinché si verifichi il fenomeno *FRET* il donatore deve essere opportunamente eccitato, i due fluorofori devono avere spettri di emissione e di assorbimento sovrapposti e la loro distanza deve essere compresa tra i 10 e gli 80 Å (definita distanza di Förster).

In seguito al legame con l'analita, la proteina può subire un cambiamento conformazionale che comporta una variazione della distanza fra i due fluorofori e conseguentemente una variazione del rapporto tra l'intensità di emissione di fluorescenza di due diversi fluorofori.

Non sempre è necessario un cambio conformazionale della proteina, infatti nel caso in cui il fluoroforo accettore legato al sito di legame della proteina viene spiazzato per competizione dall'analita, si ha una variazione nella distanza tra i due fluorofori e si verifica una riduzione nell'emissione di fluorescenza, la valutazione di tale riduzione è indicativa della presenza dell'analita e può essere associata alla sua concentrazione, questa applicazione è definita *FRET* di tipo competitivo.

Nei metodi basati sull'anisotropia, invece, si può risalire allo stato conformazionale della proteina dalla misura della variazione dell'angolo della luce polarizzata.

Altra applicazione è l'analisi del decadimento nel tempo dell'emissione di fluorescenza in cui si valuta il tempo che il fluoroforo impiega per passare dallo stato eccitato allo stato fondamentale; questo tempo varia in seguito all'interazione con l'analita. Il decadimento della fluorescenza è misurabile nel dominio di frequenza o del tempo. Lo svantaggio di questo tipo di misure è che il tempo è dell'ordine dei nanosecondi e ciò comporta l'utilizzo di dispositivi molto sofisticati.

I vantaggi di utilizzare proteine come elementi di riconoscimento molecolare nello sviluppo di biosensori sono molti, tra cui: l'elevata sensibilità e specificità di legame nel riconoscere una varietà di analiti anche di piccole dimensioni come amminoacidi, zuccheri e prodotti metabolici secondari; la solubilità in acqua; i costi di produzione relativamente bassi; la possibilità, mediante manipolazione genetica di migliorare e/o variare alcune proprietà.

Uno svantaggio nell'utilizzo di enzimi e proteine come mediatori biologici è la loro moderata stabilità nel tempo e nelle condizioni alle quali opera il sensore, infatti queste molecole per svolgere la loro azione di riconoscimento necessitano di un'integrità chimica ma soprattutto conformazionale, che può essere influenzata dall'ambiente che le circonda. Sono necessarie quindi particolari condizioni di utilizzo quali pH, forza ionica e temperatura ottimali.

I problemi di stabilità possono essere ovviati mediante l'identificazione e l'isolamento di proteine e/o enzimi in grado di svolgere la stessa funzione di riconoscimento con una stabilità maggiore e più duratura, ad esempio gli enzimi estratti da microrganismi che vivono in condizioni estreme (estremofili) di temperatura, di pH e di forza ionica; tali condizioni estreme non variano, ad eccezione dell'attività enzimatica, l'affinità di legame per i substrati che sembra essere la stessa anche a temperatura ambiente (D'Auria S. et al., 1999). È possibile migliorare la stabilità delle proteine anche mediante l'ingegneria genetica, mettendo a punto protocolli di modificazione della struttura per mutagenesi o mediante il *modelling* molecolare, in questo caso è però necessario conoscere i meccanismi molecolari che regolano la stabilità proteica.

1.3 Introduzione: applicazioni delle lipocaline

Le lipocaline sono una famiglia di proteine caratterizzate dalla capacità di riconoscere e legare, con differente affinità, piccole molecole idrofobiche ed aromatiche. Sono caratterizzate da una struttura tridimensionale a beta barile che gli conferisce un'elevata stabilità a diverse condizioni di stress, sono solubili in acqua e relativamente facili da ottenere. Per le loro proprietà strutturali e la capacità di legare diverse molecole, risultano ottime candidate per la realizzazione di elementi biologici di riconoscimento molecolare da poter utilizzare nella progettazione di biosensori per la rilevazione e il monitoraggio di specifici analiti a basso peso molecolare quali ad esempio alcuni contaminanti atmosferici.

1.3.1 La famiglia delle lipocaline

Le lipocaline fanno parte di più un'ampia superfamiglia strutturale di proteine: le Calicine, che comprende le proteine leganti gli acidi grassi (coinvolte nel metabolismo lipidico), le avidine (che presentano elevata affinità per la biotina), gli inibitori delle metalloproteinasi e le triabine (inibitori delle proteasi) (Flower, D.R. et al., 2000).

La famiglia delle lipocaline è un gruppo di piccole proteine extracellulari caratterizzate da una serie di differenti proprietà di riconoscimento molecolare: sono capaci di legare piccole molecole principalmente idrofobiche (come il retinolo), di legare specifici recettori sulla superficie cellulare e formano complessi macromolecolari; una o più di queste proprietà mediano le loro differenti funzioni biologiche delle lipocaline.

In passato, le lipocaline sono state classificate come proteine di trasporto; attualmente mostrano una grande varietà funzionale hanno infatti, un ruolo nel trasporto del retinolo, nella colorazione delle cripte degli invertebrati, nell'olfatto, nel trasporto di ormoni e feromoni e nella sintesi delle prostaglandine. Inoltre, sono implicate nella regolazione dell'omeostasi cellulare, nella modulazione della risposta immunitaria e come proteine "carrier" nella rimozione di composti endogeni ed esogeni (Darren R. et al., 1996).

Nei mammiferi sono proteine secrete, solubili, monomeriche e con un peso molecolare compreso tra i 16 e 20 kDa. Sono presenti in grande quantità nei fluidi biologici, come il muco nasale, le lacrime, la saliva, le secrezioni vaginali, l'urina e il latte. Alcune come la RBP legano un limitato numero di molecole e generalmente sono purificate in complesso con il loro ligando naturale (Godovac-Zimmerman J., 1988), mentre altre come le OBP provenienti dalla mucosa nasale hanno una più ampia varietà di ligandi e generalmente sono purificate prive di quest'ultimo.

Nonostante una similarità inferiore al 30% a livello di sequenza, la struttura delle lipocaline è molto conservata, in quanto condividono caratteristici motivi di sequenza definiti regioni strutturalmente conservate (SCR): SCR1, SCR2, SCR3. Queste tre regioni permettono di dividere la famiglia in due grandi gruppi: le "kernel" caratterizzate dalla presenza di tutti i tre SCR e le "outlier" membri più divergenti caratterizzati dalla presenza di una delle tre regioni conservate. SCR1 è condiviso da tutte le lipocaline e può essere utilizzato come caratteristica di appartenenza familiare (figura 1). Le "outlier" mostrando una corrispondenza al massimo con due dei tre motivi caratteristici, si diversificano maggiormente, formando così gruppi distinti a livello di sequenza: le α -acido glicoproteine (AGPs), le "odorant-binding proteins" (OBP) e le "Von Ebner's-gland proteins" (Darren R. et al., 1996).

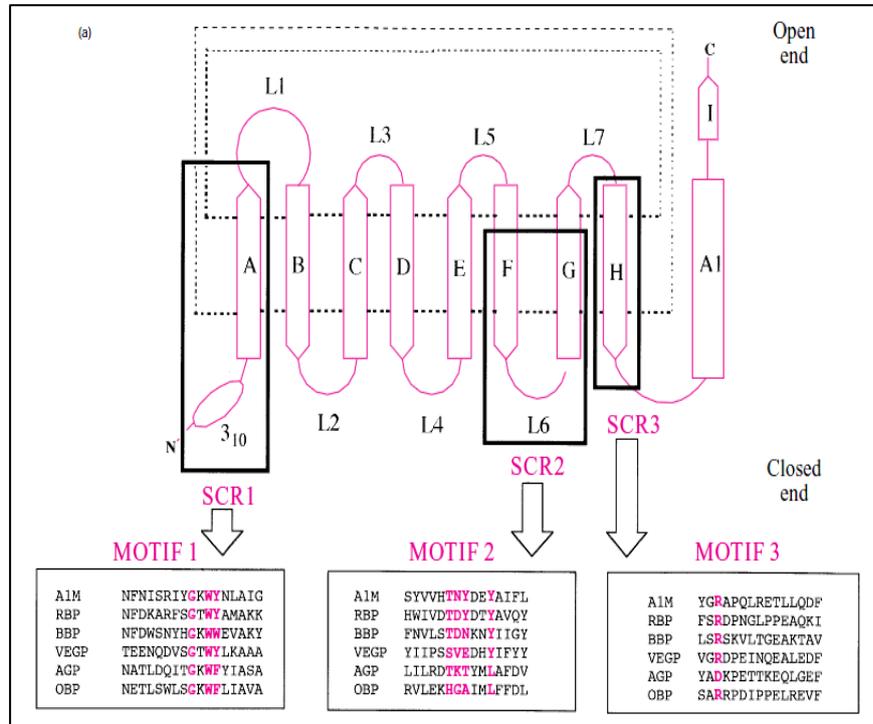


Figura 1. Struttura del *fold* delle lipocaline. (a) Vista schematizzata del *fold* delle lipocaline lungo l'asse ortogonale del beta barile. Le strutture a freccia etichettate da A-A1 indicano i 9 beta foglietti che compongono il beta barile, mentre i *loops* sono mostrati come linee etichettate da L1-L7. Le due estremità del beta barile sono topologicamente distinte. Una, chiamata l'estremità aperta della molecola ha quattro β -*hairpins* (L1, L3, L5 e L7) ed ospita l'apertura del sito per il legame del ligando; l'altra, chiamata l'estremità chiusa della molecola, ha tre β -*hairpins* (L2, L4 e L6) ed una α -elica N-terminale che funge da chiusura del beta barile. Le regioni strutturalmente conservate (SCR) sono evidenziate dai riquadri etichettati con SCR1, SCR2, SCR3. I tre motivi di sequenza conservati che corrispondono agli SCR sono indicati dalle scritte MOTIF1, MOTIF2, MOTIF3. Le prime tre sequenze sono delle lipocaline *kernel* mentre le seconde tre delle lipocaline *outlier*; è possibile notare come il MOTIF1 è conservato in tutte le sequenze, mentre gli altri due, soprattutto il MOTIF 2, sono conservati solo nelle *kernel* (Darren R. et al., 1996).

Sono note le strutture tridimensionali, risolte ai raggi X, della *retinol binding protein* (RBP) (Bartsch S. et al., 1995), della β -lattoglobulina (Blg) (Brownlow S. et al., 1997), della insetto-cianina (Yapici I. et al., 2015), della bilina binding protein (BBP), del complesso proteico urinario maggiore, dell' α -2 -globulina (Zagalsky P.F. et al., 1995), dell'*epididymal retinoic-acid binding protein* e della OBP di neutrofilo.

La struttura conservata delle lipocaline viene comunemente indicata come "*Lipo-clain folding*". Quest'ultimo è costituito invariabilmente da due domini distinti: un beta barile simmetrico formato da foglietti beta antiparalleli che ospita al suo interno il sito di legame per il ligando e da un dominio α -elica all'estremità C-terminale di cui ancora non è ben nota la funzione. I due domini sono connessi tramite una regione cerniera ed interagiscono tramite la formazione di un ponte disolfuro tra due residui di cisteina molto conservati, permettendo così la formazione della struttura a beta barile.

Le due estremità del beta barile sono costituite dai *loops* che connettono i diversi foglietti beta e svolgono ruoli differenti. Un'estremità è definita aperta e funge da ingresso al sito di legame mentre l'altra, definita estremità chiusa ospita un' α -elica 3_{10} N-terminale che si ipotizza funga da tappo. Il beta barile, se osservato in senso longitudinale, presenta una tipica cavità interna a forma di calice (fig. 2).

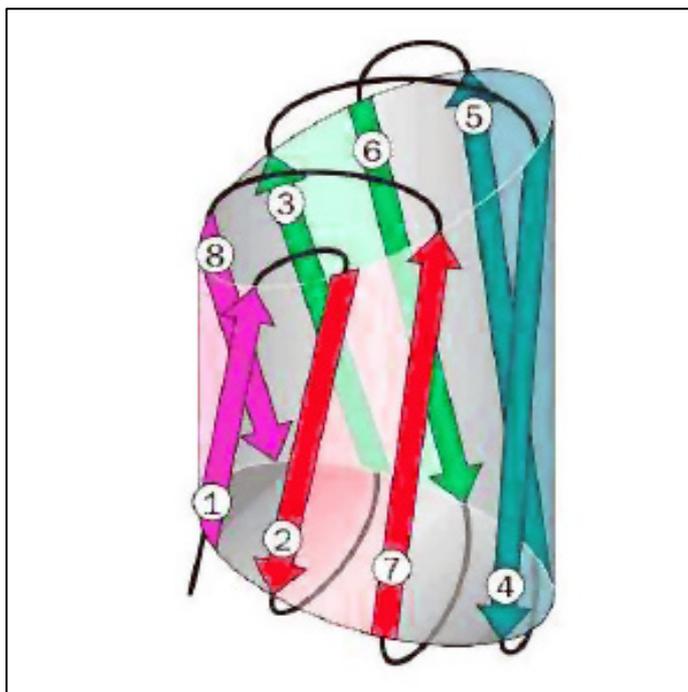


Figura 2. Diagramma schematico della topologia del beta barile delle lipocaline. Il beta barile è un grande beta foglietto arrotolato a spirale che forma una struttura chiusa nella quale il primo foglietto è connesso all'ultimo mediante un legame idrogeno. I beta foglietti sono tipicamente arrangiati antiparallelemente.

Le lipocaline legano una grande varietà di piccoli ligandi idrofobici variando la composizione amminoacidica dei *loops* e della cavità interna, il che determina un cambiamento in termini di dimensione, conformazione e specificità d'interazione, conferendo loro selettività nel riconoscere e legare diverse classi di molecole idrofobiche, ma anche ampia capacità d'interazione e formazione di complessi macromolecolari.

È stato ipotizzato che i tre motivi di sequenza conservati caratteristici della famiglia, posti uno accanto all'altro, formino una superficie di contatto posizionata all'estremità chiusa del beta barile costituendo un comune sito di legame per i recettori cellulari (fig. 3). Prove sperimentali dimostrano che alcuni tipi di lipocaline possono essere legate da specifici recettori di superficie cellulare oppure internalizzate mediante endocitosi recettore-mediata.

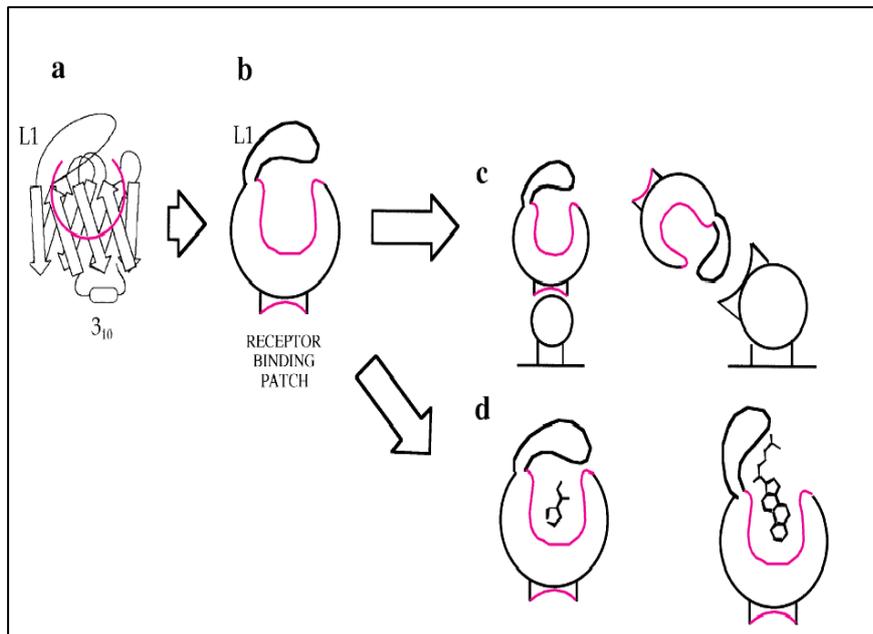


Figura 3. La figura rappresenta schematicamente il *fold* delle lipocaline e come queste siano implicate in interazioni multiple, a sottolineare le differenti proprietà di interazione e riconoscimento molecolare. **(a)** Sono mostrati i foglietti beta, i *loops* all'estremità aperta e all'estremità chiusa e l'elica N-terminale. Con un semicerchio è evidenziata la localizzazione del sito interno di legame. **(b)** Nell'immagine sono schematizzate le più importanti caratteristiche strutturali delle lipocaline enfatizzandone la polarità strutturale, il sito di legame e la superficie di legame al recettore cellulare. **(c)** Due possibili modalità d'interazione tra il recettore di membrana e la lipocalina; l'interazione è possibile mediante una superficie di contatto esterna al beta barile oppure mediante le strutture create dai *loops*. **(d)** Sono mostrate le diverse modalità di legame dei ligandi; le lipocaline legano ligandi idrofobici differenti per dimensione e forma, in figura sono riportati due esempi estremi: un piccolo ligando completamente internalizzato nel sito di legame e un grande steroide legato in parte dal sito di legame e in parte dalla struttura formata dai *loops* (Flower Dr., 1995).

Il ponte disolfuro, con eccezione per la variante omo-dimerica bovina delle OBP (bOBP), è conservato in tutte le lipocaline identificate finora; la bOBP, infatti è una lipocalina peculiare in quanto caratterizzata dalla presenza di un dominio strutturale che si costituisce mediante uno scambio reciproco di interazioni tra diverse porzioni dei domini beta barile e α -elica appartenenti a due monomeri, formando così un dimero. Questa particolare struttura, denominata dominio di scambio (*swapping domain*) è dovuta dalla linearità e rigidità della regione cerniera e dall'assenza di un legame disolfuro che nelle lipocaline monomeriche stabilizza la posizione reciproca dei due domini beta barile e α -elica C-terminale determinando così l'organizzazione tridimensionale della proteina (fig. 4).

Le lipocaline sono classificate come proteine extracellulari di trasporto, ma recentemente la scoperta delle OBP e del loro coinvolgimento nel sistema olfattivo ha permesso di attribuire loro la partecipazione ad altri meccanismi molecolari alla base dei sensi dell'olfatto e del gusto. Risultano implicate nel sistema olfattivo dei vertebrati.

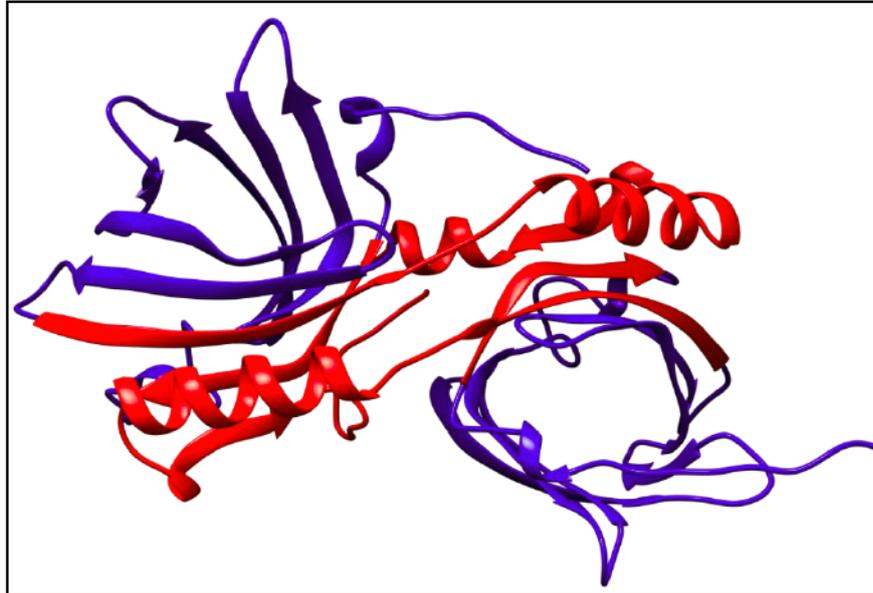


Figura 4. In figura è mostrata la struttura della bOBP, in particolare in rosso è evidenziata la zona di interazione tra i due monomeri: il dominio di *swapping*.

1.3.2 Le odorant binding protein

Il termine “*odorant binding protein*” individua, due classi di proteine piccole e solubili, molto espresse nel sistema olfattivo dei vertebrati e nella linfa sinsillare degli insetti; nonostante esse siano strutturalmente differenti probabilmente svolgono la medesima funzione fisiologica.

Le OBP dei vertebrati mostrano il tipico beta barile con il sito di legame interno (Flower D.R., 1995), mentre le OBP di insetto sono caratterizzate da una struttura completamente diversa, per lo più ad α -elica (Tegoni M. et al., 2004).

Il primo membro di questa famiglia di proteine è stato individuato nella mucosa e nell'epitelio nasale della mucca. Sono stati riscontrati, simultaneamente, diversi sottotipi di OBP nella stessa specie animale: due nel maiale, due nel topo, tre nel ratto, tre nel coniglio, una nel porcospino e due nell'uomo. Le OBP sono sintetizzate da ghiandole localizzate nella sub-mucosa dell'epitelio nasale e nell'organo vomeronasale e poi secrete nei muchi che ricoprono questi tessuti, sono presenti anche nei neuroni olfattivi. Queste evidenze scientifiche fanno supporre un ruolo fondamentale nel rilevamento degli odori occupandosi del trasporto, della disattivazione e/o nella selezione delle molecole odorigene e nella trasduzione del segnale ai recettori olfattivi. Alcuni studi sulla similarità di sequenza hanno dimostrato che, all'interno della stessa specie, i diversi isotipi hanno un'omologia di sequenza inferiore al 30%, tale varianza potrebbe essere alla base della capacità delle OBP di riconoscere e legare molecole odorigene molto diverse fra loro.

Le OBP di vertebrati condividono la stessa struttura molto conservata, ossia un beta barile composto da foglietti beta antiparalleli e da un α -elica all'estremità C-terminale. Il beta barile crea una cavità apolare il cui ruolo è quello di legare e trasportare molecole odorigene idrofobiche.

Queste proteine sono coinvolte nel trasporto di ligandi idrofobici e degli odori in modo reversibile, con costanti di dissociazione nell'ordine del micromolare. L'ipotesi del loro coinvolgimento nei processi percezione e traduzione del segnale olfattivo, è corroborata dalla loro localizzazione nel sistema olfattivo e dalla capacità di legare la 2-isobutil-3metossipirazina (IBMP), nota come odore con la più bassa soglia di percezione da parte dell'olfatto umano (Florence V. et al., 2004).

1.3.2.1 Ruolo fisiologico delle odorant binding protein

È evidente la capacità delle OBP di legare molecole odorigene, ma non è ancora ben chiaro il ruolo fisiologico nella percezione olfattiva. I recettori olfattivi sono separati dall'aria da uno strato protettivo di secrezioni idrofiliche, chiamato muco nasale e linfa sinsillare rispettivamente nei mammiferi e negli insetti. Le molecole odorigene, che sono composti volatili ed idrofobici, per poter raggiungere i recettori devono attraversare questa barriera idrofila. Probabilmente la funzione delle OBPs è quella di trasportare molecole odorigene affinché esse possano attraversare le secrezioni ricoprenti l'epitelio olfattivo, funzione sviluppatasi durante l'adattamento degli organismi alla vita terrestre

L'ipotesi quindi, è che sia nei vertebrati che negli insetti, le OBP svolgano questo ruolo di mediatori della percezione olfattiva legando reversibilmente odori e feromoni e trasportandoli ai recettori espressi dai neuroni olfattivi. L'attivazione dei recettori infine, mediante l'attivazione di una specifica proteina G, determina la formazione di un potenziale d'azione che si propaga al cervello per via del bulbo olfattivo (fig. 5).

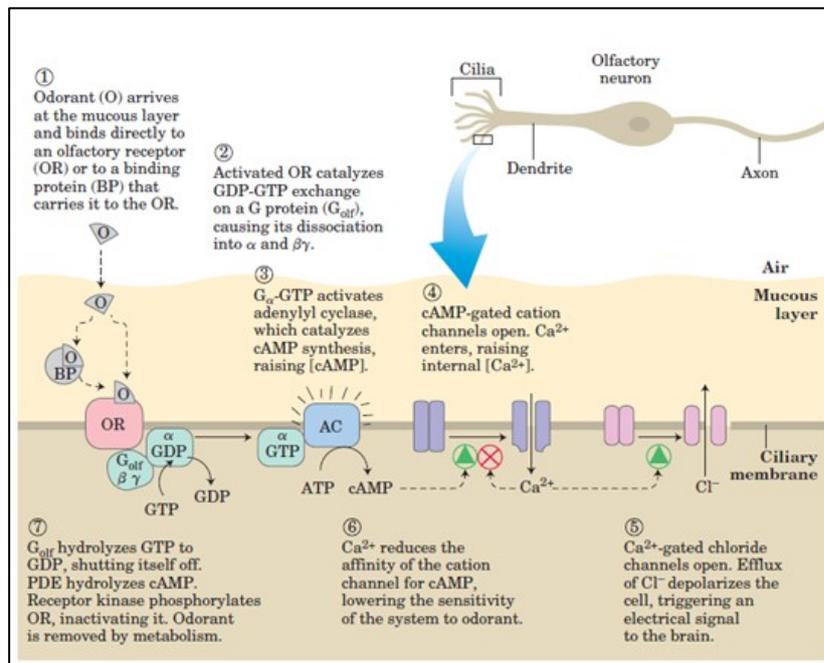


Figura 5. In figura è rappresentata la via di trasduzione del segnale olfattivo.

Altri ruoli proposti per le OBP sono: di pulizia dei recettori olfattivi dopo la trasduzione del segnale, di controllo della concentrazione degli odori per evitare la saturazione dei recettori olfattivi, di sequestro di molecole ossidative, citotossiche o genotossiche come le aldeidi alchiliche, di mediatori nella trasduzione del segnale e nella formazione di complessi macromolecolari similmente ai meccanismi di chemiotassi batterica (Florence V. et al., 2004).

1.3.3 Porcine odorant binding protein

La *porcine odorant binding protein* (pOBP) è un monomero composto da 157 aa, con un punto isoelettrico di 4.2. ed un peso molecolare di 18 kDa. La pOBP appartenendo alla famiglia delle lipocaline è caratterizzato da una struttura beta barile elicoidale composta da 9 filamenti beta antiparalleli con l'aggiunta di un dominio α -elica tra i residui 124 e 141 (fig. 6). La cavità del beta barile non comunica direttamente con il solvente esterno; le catene laterali di alcuni residui amminoacidici ne bloccano l'accesso, riservandolo solo a molecole odorigene. Due residui di cisteina (Cys 63 e Cys 155) formano un ponte disolfuro tra la porzione C-terminale e il foglietto $\beta 4$.



Figura 6. Struttura della *porcine odorant binding protein*; in giallo è evidenziata la struttura del beta barile ed in rosso l' α -elica C-terminale.

La struttura della pOBP è caratterizzata dalla presenza di un numero elevato di residui idrofobici (Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp), che formano un grande *cluster* idrofobico nel core della proteina creando la cavità interna del beta barile, sono anche responsabili delle interazioni con i ligandi. Studi hanno dimostrato che la pOBP, nonostante sia stata estratta da un organismo non termofilo, possiede un'elevata resistenza agli stress termici grazie alle interazioni idrofobiche ed i *network* ionici che si instaurano nella struttura tridimensionale della proteina (fig. 7) (Stepanenko O.V. et al., 2008). Misure di fluorescenza e di FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) hanno dimostrato la notevole resistenza della pOBP alle alte temperature (fino ad 80° C) e che la presenza del ligando nel sito di legame è in grado di stabilizzarne ulteriormente la struttura quando posta a *stress* termico.

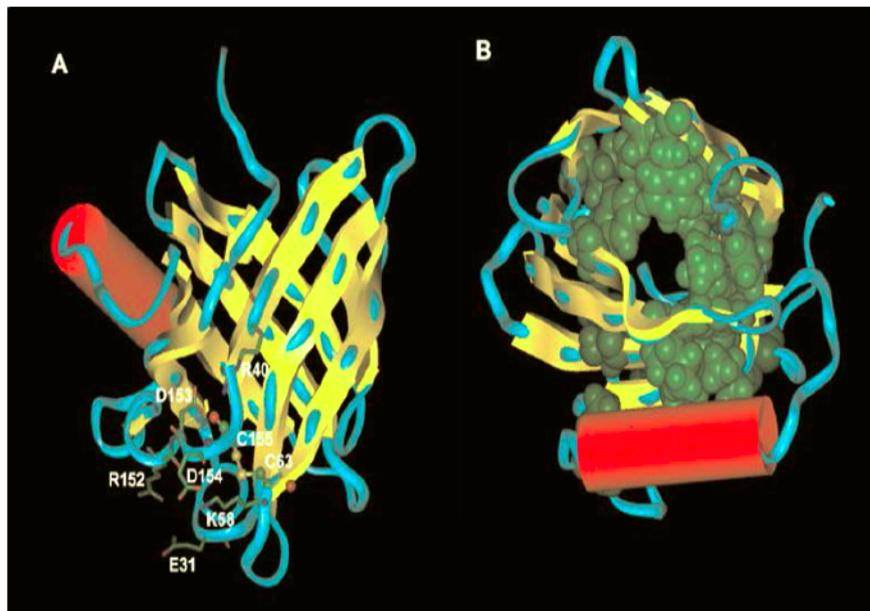


Figura 7. Struttura della pOBP. Le eliche sono rappresentate da cilindri rossi e i beta foglietti in giallo. (A). I residui coinvolti nelle interazioni ioniche sono rappresentati in "stick"; mentre i residui coinvolti nella formazione del ponte disolfuro sono rappresentati in "ball&stick". (B). In verde sono colorati i residui idrofobici non accessibili al solvente (Staiano M. et al., 2007).

La risoluzione ai raggi X della pOBP non rivela la presenza del dominio di *swapping* presente nella variante bovina, confermando una struttura monomerica. Altre strutture di pOBP complessate con diverse molecole odorogene, risolte ai raggi X, hanno confermato la posizione del sito di legame nella cavità interna del beta barile. La pOBP è caratterizzata dalla presenza di un grande numero di aminoacidi carichi (30 residui acidi e 14 basici) localizzati maggiormente nei *loops* di connessione tra i foglietti beta e nella struttura ad α -elica di cui 8 su 13 residui che la compongono sono carichi. Caratteristica è la disposizione dei residui aminoacidici carichi nei foglietti beta, infatti si dispongono in gruppi di 5 nella prima o nell'ultima parte del foglietto a cui appartengono. Nella struttura della pOBP sono presenti 5 residui di Tyr (Tyr 20, 52, 78, 82, 92) ed un singolo residuo di Trp (Trp 16) (fig. 8) (Staiano M. et al., 2007).

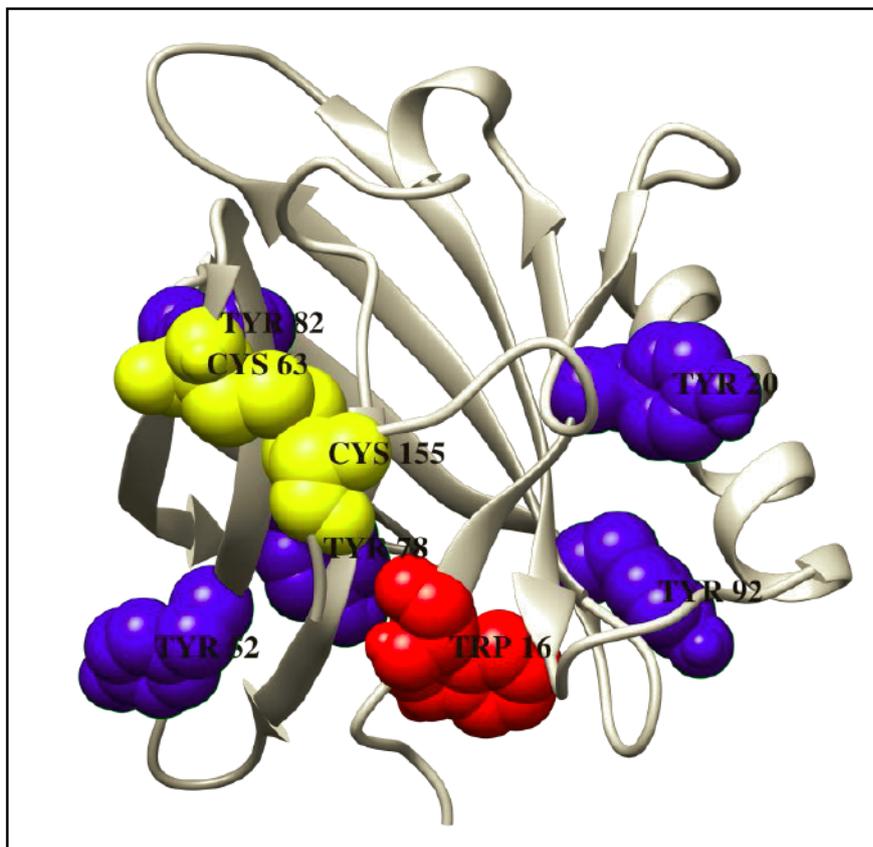


Figura 8. In figura è mostrata la struttura della pOBP con in evidenza in rosso il residuo di Trp 16, in blu i residui di Tyr (20, 52,78, 82,92), in giallo i residui di Cys 63 e 155.

Scopo della tesi

Negli ultimi anni è sempre più evidente l'aumento di patologie tumorali dovute alla presenza nell'atmosfera di numerosi contaminanti ed inquinanti. Evidenze scientifiche correlano la presenza e l'aumento delle concentrazioni di idrocarburi aromatici nell'atmosfera, quali il benzene, all'induzione di una varietà di tumori ematologici e all'apparato respiratorio.

Le attuali tecniche di monitoraggio e determinazione dei livelli atmosferici di benzene prevedono l'utilizzo di metodologie analitiche di gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, senza un monitoraggio in continuo ma con una fase di raccolta dei campioni ed una successiva analisi in laboratori specializzati, determinando un aumento nei tempi e nei costi di analisi.

Lo scopo di questo lavoro è la progettazione di un biosensore ottico competitivo a fluorescenza per la determinazione e il monitoraggio in continuo del benzene atmosferico, che sia specifico e sensibile, portatile ed economico ed integrabile in una rete di sensori per il monitoraggio di vaste superfici geografiche.

La progettazione del biosensore ha previsto il raggiungimento di obiettivi sperimentali preliminari:

1. Identificazione dell'elemento di riconoscimento molecolare (MRE) capace di riconoscere il benzene.

L'MRE è stato identificato in una specifica famiglia di proteine: le Lipocaline. L'approccio scelto è un'analisi *in-silico* mediante simulazioni di *docking* molecolare; una fase preliminare di *screening* mediante *docking* inverso è stata valutata l'affinità al benzene, per l'intera famiglia di Lipocaline, successivamente mediante *docking* diretto è stata eseguita una fase di rifinitura dei risultati con cui è stata selezionata la pOBP.

2. Clonaggio, espressione, purificazione e caratterizzazione della pOBP.

La proteina è stata clonata in pGex2TK, espressa in *E. Coli*, e purificata all'omogeneità mediante cromatografia d'affinità. Al fine di valutarne la corretta conformazione strutturale e le capacità di legame sono state condotte misure di spettroscopia di fluorescenza e di dicroismo circolare. Inoltre, mediante le stesse metodologie, è stato valutato il comportamento della struttura proteica al variare di parametri chimico/fisici. Lo scopo è stato quello di individuare le condizioni ottimali di operatività della pOBP.

3. Allestimento di un saggio competitivo *FRET* per la determinazione del benzene.

La pOBP presenta caratteristiche strutturali, ottiche e di legame uniche. La peculiare struttura a beta barile, la presenza nel sito di legame di un solo residuo di triptofano e la capacità di legare l'1-AMA (sonda fluorescente estrinseca), ne fanno il candidato giusto per l'allestimento di un saggio competitivo basato sul fenomeno di *FRET* che si instaura tra il triptofano eccitato e l'1-AMA legato alla proteina. Il saggio sfrutta la competizione, per il sito di legame della pOBP, che si instaura tra il benzene e l'1-AMA, il quale essendo spiazzato determina la riduzione di emissione di fluorescenza, da tale riduzione è possibile valutarne la presenza e la concentrazione del benzene.

4. Valutazione della specificità di legame al benzene della pOBP.

Valutata ed associata l'affinità di legame al benzene, la specificità di legame è stata valutata *in-silico* ed *in-vitro*, considerando come putativi interferenti gli inquinanti atmosferici. L'analisi *in-silico*, svolta mediante *virtual screenig docking*, è stata utilizzata per ridurre il numero di inquinanti da testare sperimentalmente, individuando le molecole a più alta affinità di legame predetta e con caratteristiche chimico/fisiche in comune. Le molecole selezionate sono state testate mediante il saggio competitivo allestito.

5. Immobilizzazione covalente della pOBP su supporto di silicio.

La pOBP è stata immobilizzata covalentemente sulla superficie di un supporto ottico di silicio, lo scopo è quello di aumentare la stabilità della proteina, la quale potrebbe risultare in soluzione meno stabile, ed accoppiare intimamente il biomediatore al trasduttore ottico. L'immobilizzazione della pOBP è stata valutata mediante immunochemiluniscenza.

I risultati ottenuti saranno impiegati nella realizzazione del *chip* sensore da integrare in una piattaforma biosensoristica ottica; l'obiettivo è quello di poter raccogliere dati per il monitoraggio e la determinazione in continuo dei livelli atmosferici di benzene, raccolta dati integrata in una rete di sensori per il monitoraggio e la di vaste aree geografiche.

Risultati e Discussione

3.1 Identificazione dell'elemento molecolare di riconoscimento: analisi *in-silico*

L'elevato numero di lipocaline conosciute ha determinato la scelta di un approccio *in-silico* per l'identificazione dell'elemento molecolare di riconoscimento con maggiore affinità per il benzene. L'analisi *in-silico*, basata sul metodo del *docking* molecolare, si è svolta in due fasi complementari: un'iniziale di *screening* che ha permesso di restringere il campo di indagine ed una seconda fase di rifinitura in cui è stata identificata la lipocalina potenzialmente più affine al benzene. Per la fase di *screening* è stato utilizzato un approccio di *docking* inverso, mediante l'ausilio di *IdTarget web-server*, successivamente i risultati sono stati sottoposti ad esperimenti di *docking* diretto con l'ausilio di *Autodock 4.2*.

La prima fase di analisi è stata svolta mediante *IdTarget web-server*. Il campione di lipocaline analizzato è stato costruito consultando il *database RCSB PDB*; le strutture individuate sono 280 e i relativi codici identificativi sono riportati in tabella 1. Tutti i codici identificativi sono stati inclusi in un unico file di testo, mentre la struttura tridimensionale del benzene, in formato *.mol2*, è stata scaricata dal *database ZINC*.

1a18	1a2d	1a3y	1a57	1ab0	1acd	1adl	1ael	1alb	1aqb
1avg	1b0o	1b4m	1b56	1b8e	1bbp	1beb	1bj7	1blr	1bm5
1brp	1brq	1bso	1bsq	1bsy	1bwy	1cbi	1cbq	1cbr	1cbs
1cj5	1crb	1d2u	1d3s	1dc9	1df3	1dfv	1dv9	1djz	1dzk
1dzm	1dzp	1e00	1e02	1e06	1e5p	1eal	1eii	1eio	1epa
1epb	1eqd	1erb	1erx	1euo	1ew3	1exs	1fdq	1fe3	1fel
1fem	1fen	1ftp	1g5w	1g74	1g7n	1g85	1ggl	1gka	1gm6
1gt1	1gt3	1gt4	1gt5	1gx8	1gx9	1gxa	1h91	1hbp	1hbz
1hmr	1hms	1hmt	1hn2	1hqp	1i04	1i05	1i06	1i4u	1icm
1icn	1ifb	1ifc	1iiu	1ike	1ikj	1iw2	1jbh	1jjj	1jix
1jv4	1jyd	1jyj	1jzu	1kgl	1koi	1kqw	1kqx	1kt3	1kt4
1kt5	1kt6	1kt7	1kxo	1kzw	1kzx	1l6m	1lf7	1lfo	1lib
1lic	1lid	1lie	1lif	1lke	1lnm	1lpj	1mdc	1ml7	1mup
1mvg	1mx7	1mx8	1n0s	1ngl	1np1	1np4	1o1u	1o1v	1o8v
1obp	1obq	1obu	1oee	1oej	1oek	1opa	1opb	1p6p	1pbo
1pee	1pm1	1pmp	1qab	1qft	1qfv	1qg5	1qqs	1qwd	1qy0
1qy1	1qy2	1r0u	1rbp	1rlb	1s2p	1s44	1s7d	1sa8	1sxu
1sxw	1sxx	1sxy	1sy0	1sy1	1sy2	1sy3	1t0v	1t68	1t8v
1tou	1tow	1tvq	1tw4	1tdl	1u0x	1u17	1u18	1ure	1uz2
1vpr	1vyf	1vyg	1x71	1x89	1x8n	1x8o	1x8p	1x8q	1x8u
1xca	1xki	1yiv	1yp6	1yp7	1yup	1ywa	1ywb	1ywc	1ywd
1z24	1znd	1zne	1zng	1znh	1znk	1znl	1zry	2a0a	2a13
2a2g	2a2u	2a3f	2acp	2ah7	2akq	2al0	2all	2amm	2ans
2asn	2at0	2at5	2at6	2at8	2blg	2cbr	2cbs	2dm5	2eu7
2f73	2fr2	2fr3	2fs6	2fs7	2ft9	2ftb	2gc9	2gj5	2gtf
2hmb	2hnx	2hys	2ifb	2jn3	2joz	2ju3	2ju7	2ju8	2nnq
2np1	2o62	2ofm	2ozq	2q2m	2q2p	2q39	2q4n	2q9s	2qm9
2r56	3blg	3c76	3c77	3c78	3cbs	3emm	3ifb	3np1	4np1

Tabella 1. In tabella sono riportati i codici PDB identificativi delle strutture di lipocaline depositate nel *database RCSB PDB*.

I due file, quello relativo alle lipocaline e quello relativo al benzene sono stati sottomessi, mediante interfaccia grafica, al *web-server IdTarget*; i risultati sono riportati in figura 1, organizzati in ordine di affinità decrescente, sulla base di tre parametri: l'energia di legame predetta (ΔG^{pred} Kcal/mol), la costante di inibizione predetta (K_i^{pred}) e lo z-score. Le strutture risultanti avere maggiore affinità al benzene, appartengono tutte ad una unica sottofamiglia, quella delle *odorant binding protein*. Le strutture individuate sono 14, tutte relative solo a due varianti, quella porcina e quella bovina. I valori di energia di legame ottenuti, sono significativi ed esprimono una buona interazione tra le proteine e il ligando. I valori di ΔG sono compresi tra i -6,91 Kcal/mol della struttura 1GT5 bovina e i -6,55 Kcal/mol della struttura 1DMZ porcina. *IdTarget* fornisce anche un'informazione grafica in merito alla posizione del benzene nel sito di legame delle OBP, che come è possibile osservare dalla figura 1 risulta essere collocato correttamente all'interno della struttura a beta barile.

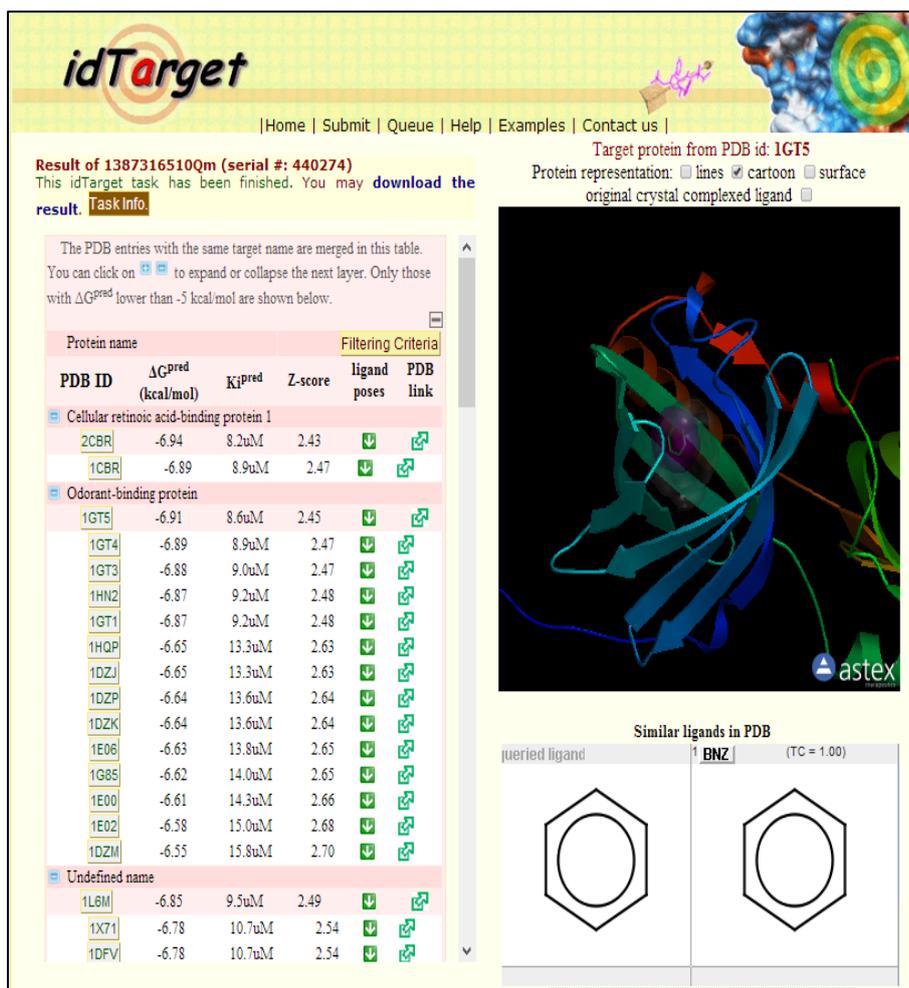


Figura 1. L'immagine mostra l'output fornito da IdTarget.

Per la seconda fase di rifinitura con *docking* diretto, sono state selezionate, in base alla migliore risoluzione cristallografica, due delle 14 strutture precedentemente individuate da *IdTarget*: la 1GT1 (1.71 Å) come rappresentante della variante bovina e la 1DZK (1.48 Å) come rappresentante della variante porcina. L'analisi di *docking* diretto è stata preceduta da una fase di *re-docking* della struttura 1DZK, che ha permesso di "settare" i parametri utilizzati per le simulazioni con *Autodock 4.2*. Per entrambe le strutture, 1GT1 e 1DZK, sono state generate 100 conformazioni del complesso ligando-proteina ed analizzate secondo tre parametri: l'energia libera di legame predetta, la popolosità in *cluster* e la posizione del ligando nel sito di legame. Tra le conformazioni ottenute, è stata scelta quella con energia di legame predetta più bassa appartenente al *cluster* più popoloso; inoltre è stato valutato il corretto posizionamento del ligando nel sito di legame, i residui amminoacidici coinvolti nell'interazione e la tipologia di interazioni predette. In tabella 2 sono riportati i dettagli delle simulazioni di *docking* condotte. In particolare le interazioni che instaurano entrambi le strutture con il ligando sono di tipo idrofobico e di *Van der Waals*. In figura 2 e in figura 3 sono mostrati in dettaglio, per entrambe le strutture analizzate, i residui coinvolti nelle interazioni con il benzene, l'istogramma di clusterizzazione e il dettaglio delle energie di interazione.

	1DZK	1GT1
Conformazione rappresentativa del cluster	91	97
Costante di inibizione (K_i) mM	1,58	2,03
Energia di legame predetta ΔG Kcal/mol	-3,82	-3,67
Popolosità in cluster	68	56
Residui amminoacidici coinvolti in interazioni con il ligando	ILE 21; PHE 35; ASN 102; MET 114; THR 115; GLY 116	PHE 89; ALA 101; ASN 103; LEU 115; THR 116; PHE 119

Tabella 2. Sintesi dei risultati delle simulazioni di *docking* diretto condotte con *Autodock 4.2*.

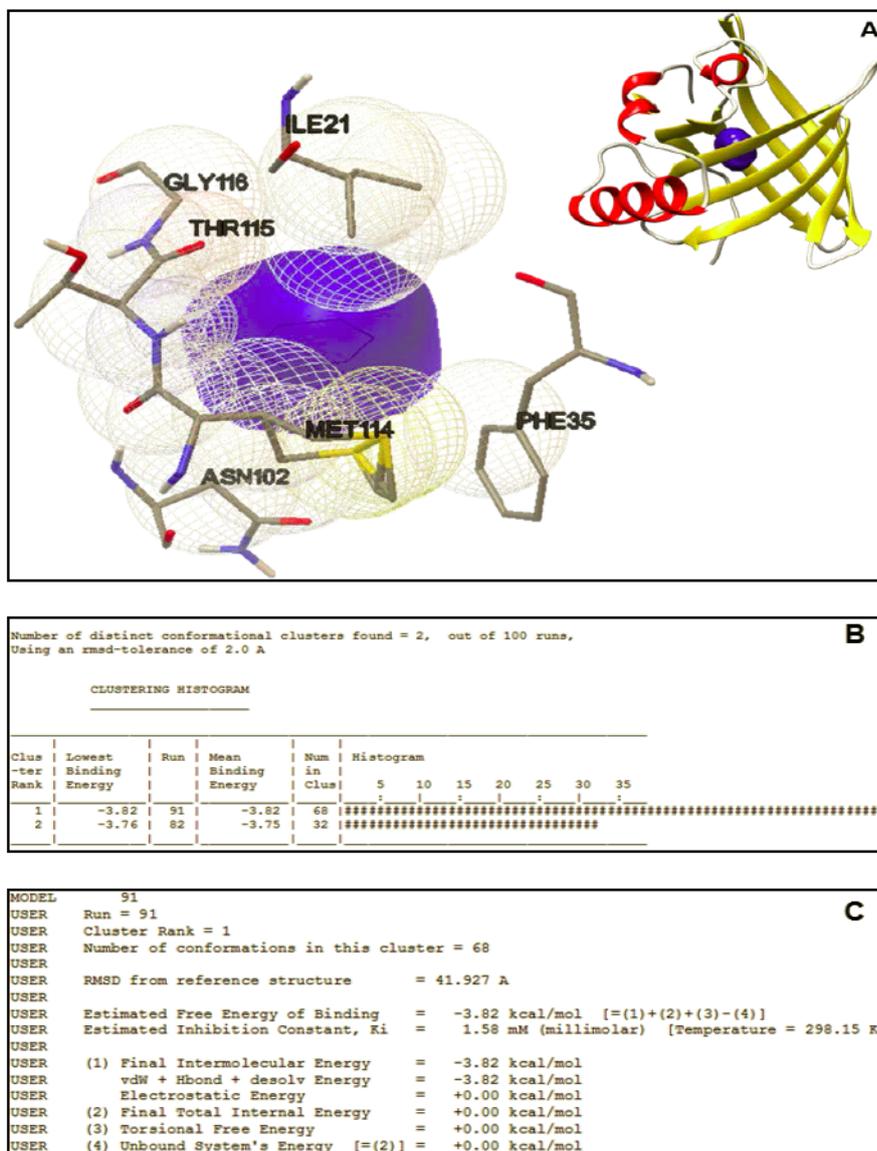


Figura 2. A). Nell'immagine è mostrata la conformazione n° 91, in alto a destra la posizione del benzene nel sito di legame della struttura 1DZK; in basso a sinistra un particolare del sito di legame con in evidenza i residui coinvolti nell'interazione con il benzene. B). Istogramma di clusterizzazione. C). Dettaglio delle componenti dell'energia di legame predetta calcolata dalla funzione di scoring di Autodock 4.2.

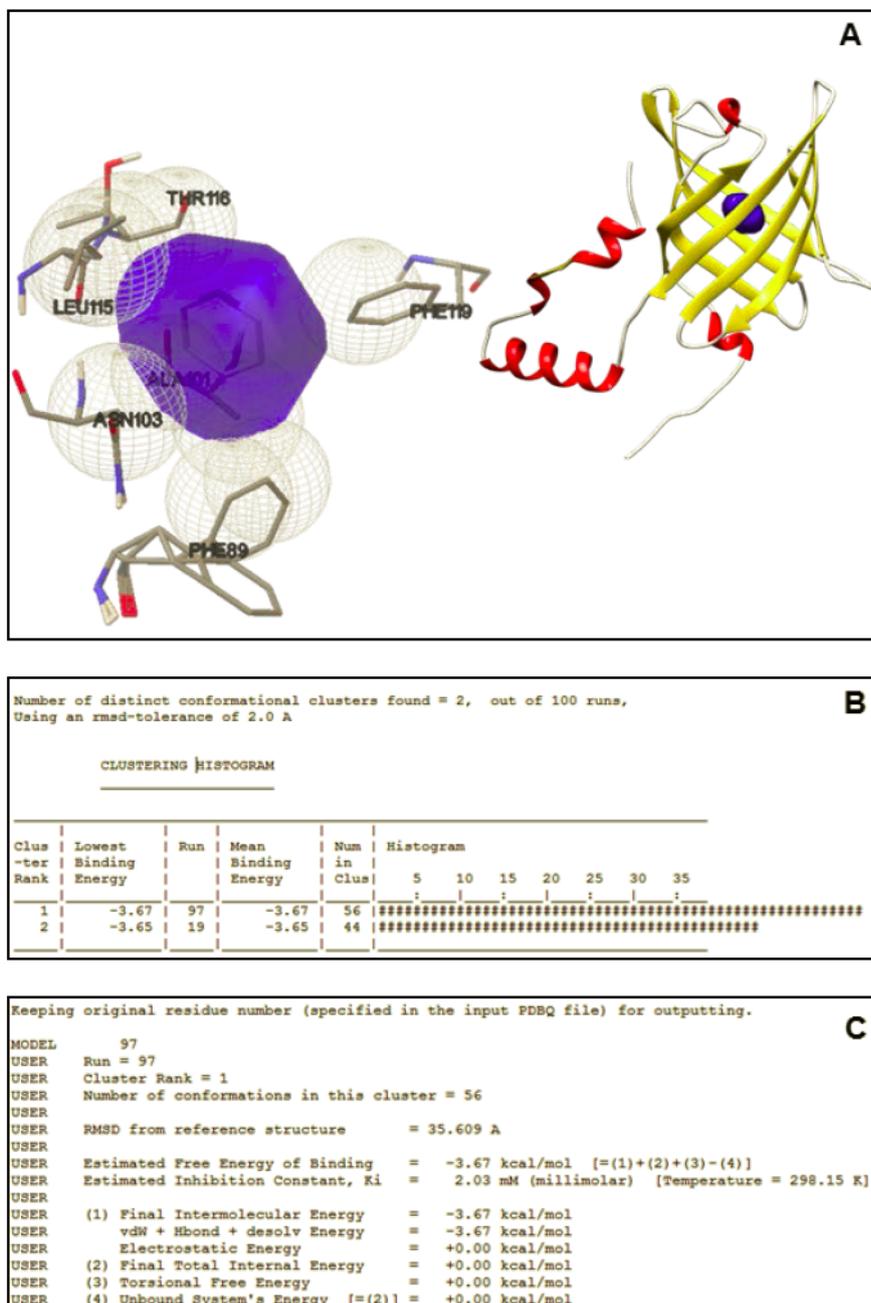


Figura 3. A). Nell'immagine è mostrata la conformazione n° 97, in alto a destra la posizione del benzene nel sito di legame della struttura 1GT1; in basso a sinistra un particolare del sito di legame con in evidenza i residui coinvolti nell'interazione con il benzene. **B).** Istogramma di clusterizzazione. **C).** Dettaglio delle componenti dell'energia di legame predetta calcolata dalla funzione di scoring di Autodock 4.2.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle simulazioni di docking, la struttura 1DZK risulta essere la più affine al benzene. Tuttavia, essendo minime le differenze in termini di energia di legame non è possibile scegliere, solo sulla base dei dati computazionali, una struttura piuttosto che l'altra; per cui, la scelta della variante porcina (codice Uniprot P81245) come elemento di riconoscimento molecolare si è basata anche sulle sue caratteristiche strutturali, determinanti per l'allestimento del saggio fluorimetrico, ossia la presenza di un singolo residuo di triptofano in posizione 16 nel sito di legame e l'essere una proteina monomeric.

3.2 Purificazione della *porcine odorant binding protein*

Il gene della pOBP, identificato dal numero NM_213769.1, ci è stato fornito dal Prof. Carlo Fini, il quale ha provveduto al clonaggio nel vettore di espressione pGex2TK (*GE Healthcare Life Science*). Il plasmide così ottenuto è stato trasformato mediante *shock* termico in BL21DE3 un ceppo di *Escherichia Coli*. Dalla piastra di trasformazione è stata piccata una colonia e cresciuta in 10 mL di *Luria Broth medium*-ampicillina ad una concentrazione finale di 50 µg/mL, per 15 ore ad agitazione costante. La sospensione batterica è stata poi inoculata in 500 mL di *Luria Broth medium* a 37° C in agitazione per 15 ore. La coltura batterica così ottenuta è stata inoculata in 10 L di *Luria Broth medium* e cresciuta in un bioreattore *Biostat Sartorius* a 37°C, pH 7.2 e 21% di ossigeno (fig. 1).



Figura 1. Bioreattore *Biostat Sartorius D*.

Quando la coltura batterica ha raggiunto un valore di densità ottica pari ad 1.0 O.D., è stata indotta l'espressione della pOBP mediante l'aggiunta di isopropile β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG). Dopo 3 ore alla temperatura di 37° C, la coltura batterica è stata centrifugata raccogliendo 6 gr. di *pellet* per litro di coltura. Il pellet (6 gr.) è stato risospeso in un tampone di lisi e trattato come descritto in materiali e metodi. La purificazione si è svolta mediante cromatografia di affinità utilizzando una resina *Gluthathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Life Sciences at Biocompare.com)* come descritto in materiali e metodi.

La purezza della proteina raccolta è stata valutata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). In figura 2 e figura 3 sono mostrati i risultati della cromatografia. La presenza di una singola banda proteica del peso molecolare atteso di 21 KDa indica che la proteina è stata purificata con successo. Sono state raccolte cinque frazioni contenenti la pOBP ed analizzate mediante spettrofotometria di assorbimento, per determinare la concentrazione proteica e valutare la presenza di acidi nucleici contaminati. L'analisi spettroscopica ha rivelato, in accordo con l'intervallo di purezza (1.4-1.7), un rapporto Abs_{280}/Abs_{260} pari a 1.62. La resa della purificazione è stata di 6 mg/L. La concentrazione finale della pOBP, 1,15 mg/mL, è stata calcolata mediante la legge di *Lambert and Beer's* utilizzando un coefficiente di estinzione molare pari a $13000 M^{-1}cm^{-1}$.

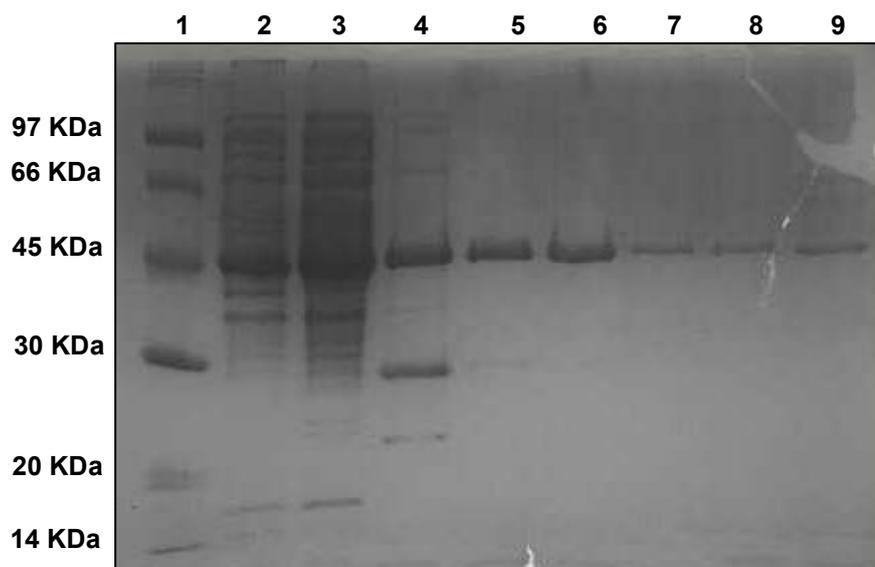


Figura 2. SDS-PAGE; in figura sono mostrate le frazioni di lavaggio raccolte dalla cromatografia di affinità. Nel pozzetto 1 è visibile lo *standard* di peso molecolare, mentre nei pozzetti da 2-9 le frazioni cromatografiche di lavaggio.

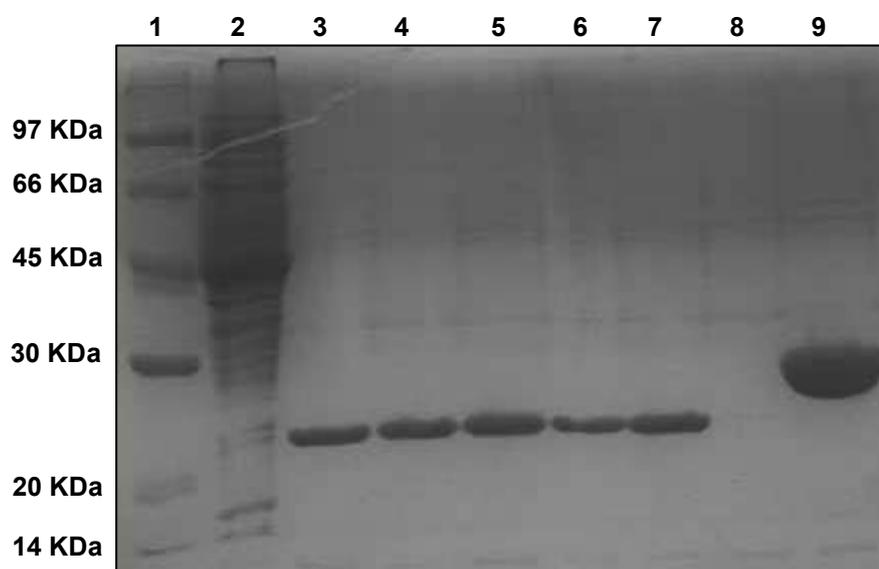


Figura 3. SDS-PAGE; in figura sono mostrate le frazioni raccolte dopo il taglio con la trombina. Nel pozzetto 1 è visibile lo *standard* di peso molecolare, nei pozzetti da 3-7 la pOBP e nel pozzetto 9 la GST eluita durante la rigenerazione della resina.

3.3 Caratterizzazione della pOBP

Al fine di valutare la corretta conformazione strutturale della proteina e la sua capacità di legare molecole idrofobiche ed aromatiche sono state condotte misure di spettroscopia di fluorescenza; inoltre, con lo scopo di valutare la stabilità strutturale della proteina in presenza/assenza del benzene e al variare della temperatura, sono state condotte misure di dicroismo circolare (CD) nel lontano e nel vicino UV.

Le misure di spettrofluorimetria, sono state effettuate su un campione di proteina con un'assorbanza di 0.1 OD a 295 nm ed una concentrazione di 7 μM . Allo scopo di valutare solo il contributo dei residui di triptofano, escludendo quindi il contributo delle tirosine, le misure sono state condotte ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 295 nm. Il singolo residuo di triptofano della pOBP mostra un massimo di emissione di fluorescenza centrato a 340 nm (fig. 1).

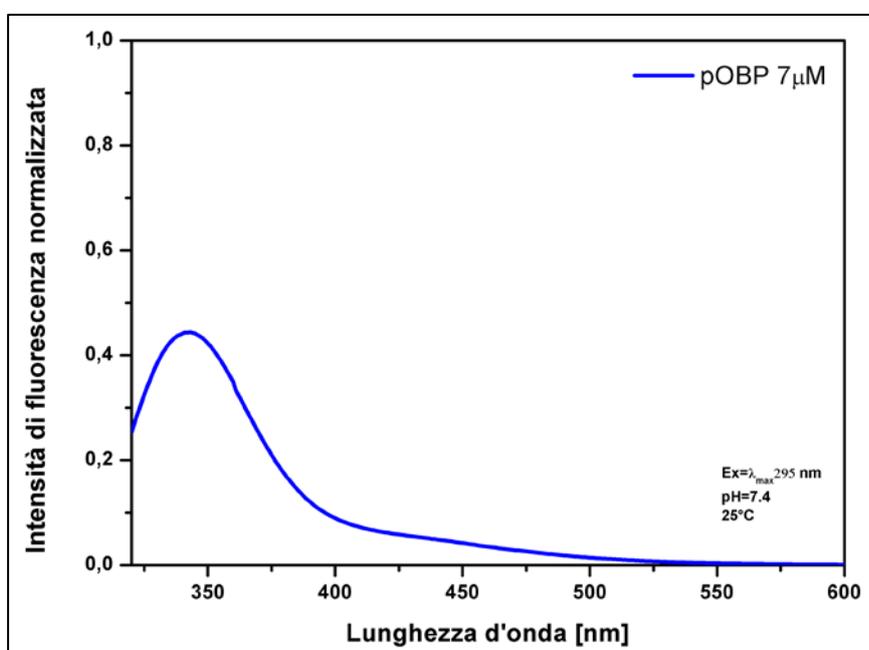


Figura 1. Spettro di emissione di fluorescenza del residuo di triptofano della pOBP eccitata a 295 nm.

Le sonde fluorescenti sono ampiamente usate per lo studio di alcune proprietà delle proteine. Diverse sonde fluorescenti estrinseche sono state utilizzate per valutare l'interazione delle lipocaline e i loro ligandi. Una delle più utilizzate è l'1-amminoantracene (1-AMA) (Paolini S. et al., 1999; Kmiecik D. et al., 2010). Mediante l'utilizzo di tale sonda estrinseca fluorescente è stato valutato se la proteina purificata conservasse la capacità di legare ligandi idrofobici ed aromatici. L'1-AMA mostra un debole picco di emissione di fluorescenza con un massimo a 537 nm, se eccitato a 295 nm; tuttavia questo massimo si sposta a 481 nm ed aumenta in intensità in presenza della pOBP.

Questo fenomeno è dovuto al *Forster Resonance Energy Transfer (FRET)* che si instaura tra il triptofano, in posizione 16 della pOBP che funge da donatore, e l'1-AMA intercalato nel sito di legame della proteina che funge da accettore. L'aggiunta, quindi, di concentrazioni crescenti di 1-AMA al campione di pOBP induce una riduzione dell'intensità di fluorescenza emessa dal triptofano a 340 nm seguita da un aumento dell'intensità di fluorescenza emessa dall'1-AMA con un massimo 481 nm (fig. 2). Questo risultato dimostra che il fluoroforo ha legato la proteina, e, come previsto, si è verificato il *FRET* tra l'1-AMA e il residuo di triptofano. Inoltre, dall'analisi della curva di legame dell'1-AMA alla pOBP (fig. 3), è possibile individuare il punto di *plateau*, indice della saturazione di tutti i siti di legame del campione proteico; la concentrazione di 1-AMA saturante è pari alla concentrazione della proteina.

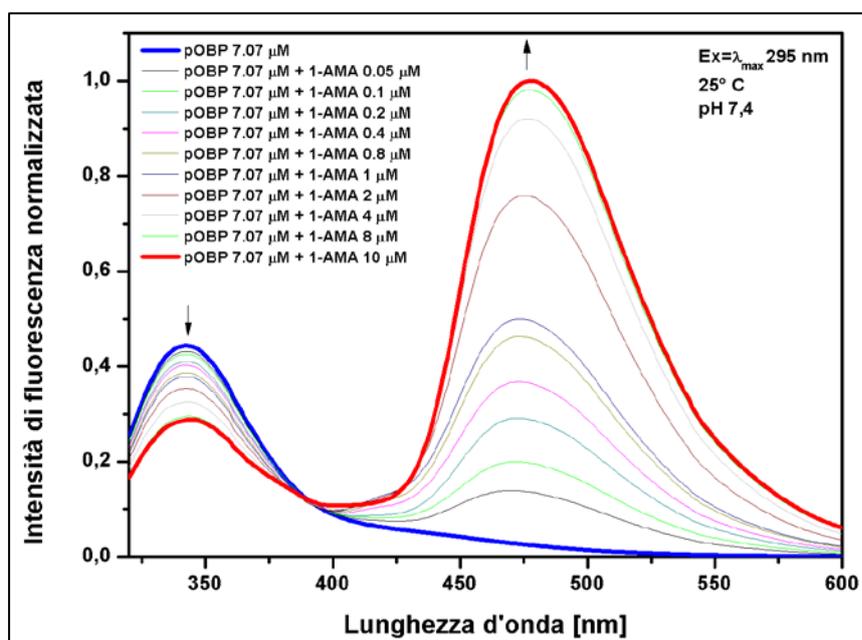


Figura 2. Spettro di emissione della pOBP eccitata a 295 nm in assenza e in presenza di 1-AMA. Quando 1-AMA viene aggiunto al campione proteico, il picco a 340 nm decresce mentre appare un picco a 481 nm: questo fenomeno è dovuto al *FRET* che si instaura tra l'1-AMA e il residuo di triptofano eccitato della pOBP.

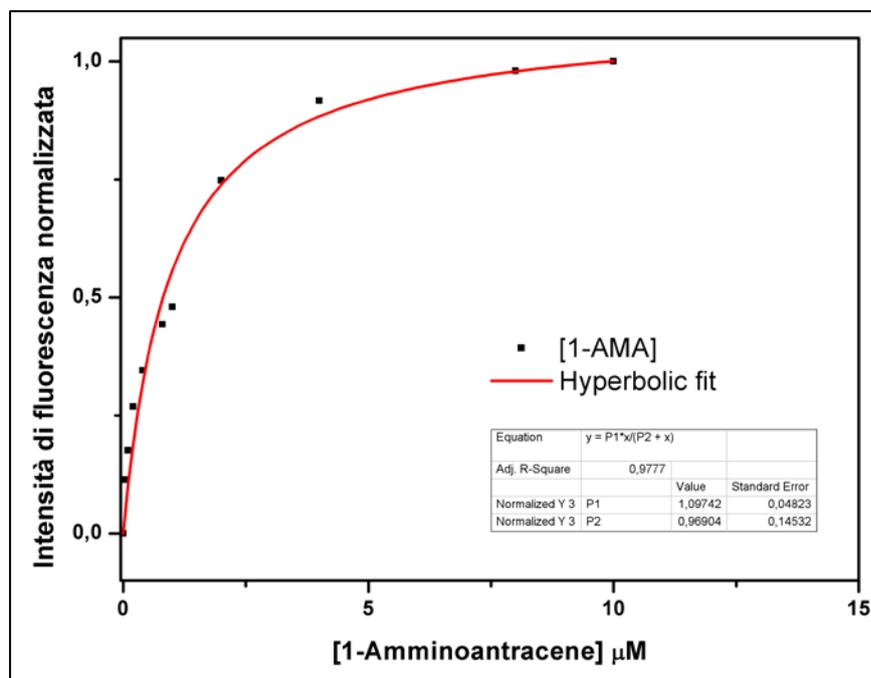


Figura 3. Rappresentazione grafica dell'aumento dell'intensità di fluorescenza dell'1-AMA in funzione della concentrazione del fluoroforo. L'aumento raggiunge un *plateau* quando tutti i siti di legame del campione proteico sono saturati.

Le misure di dicroismo circolare nel lontano e nel vicino UV sono state condotte come descritto in materiali e metodi. Gli esperimenti di CD nel lontano UV sono stati eseguiti a diverse temperature, da 25°C ad 85°C. Lo spettro CD della pOBP, acquisito nel lontano UV a 25°C, è caratterizzato dalla presenza di due bande di assorbimento, una positiva a 200 nm ed una negativa a 216 nm, tipiche della struttura secondaria a beta foglietto di cui è prevalentemente costituita la proteina, in accordo con i dati strutturali di cristallografia a raggi X (Spinelli S. et al., 1998).

Misure di CD nel lontano UV, condotti a temperature crescenti, mostrano il cambiamento che la struttura secondaria della pOBP subisce a causa della temperatura, passando da una struttura prevalentemente a beta foglietto ad una *random coil* (fig. 4). Nello specifico si assiste: ad una progressiva riduzione nell'assorbimento della banda positiva a 200 nm e della banda negativa a 216 nm; seguita da una diminuzione nell'assorbimento della banda a 222 nm, indice del passaggio tra una struttura secondaria ordinata ad una *random*. La presenza nella banda a 211 nm di un punto di intersezione tra i diversi spettri definito isodicroico è indice della elevata stabilità strutturale della proteina, confermata da cambiamenti apprezzabili negli spettri raccolti a temperature superiori ai 65°C. I risultati ottenuti ci permettono di affermare che la pOBP possiede quindi una notevole stabilità termica, in accordo con (Stepanenko Olesya V., 2007).

Ulteriori esperimenti di CD nel lontano UV sono stati condotti in presenza di concentrazioni crescenti di benzene a 25°C, i risultati mostrano che non vi è nessuna significativa variazione nella struttura secondaria della pOBP, a conferma ulteriore di una elevata stabilità strutturale (fig. 5).

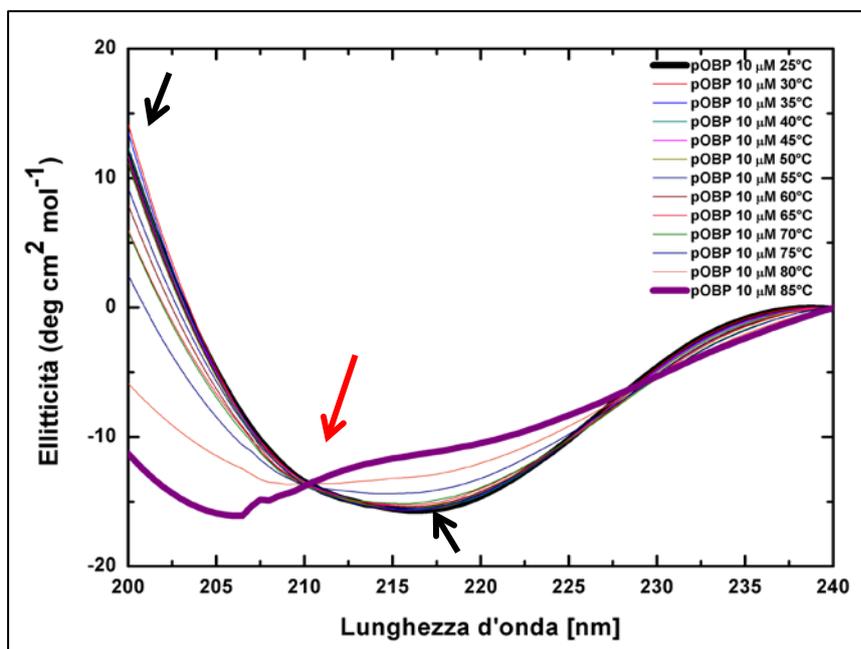


Figura 4. In figura sono mostrati gli spettri CD nel lontano UV della pOBP acquisiti a temperature crescenti da 25°C a 85°C; le frecce nere indicano la variazione nei due caratteristici punti di assorbimento di una struttura beta foglietto (200 nm e 216 nm); la freccia in rosso indica il punto isodicroico a 211 nm.

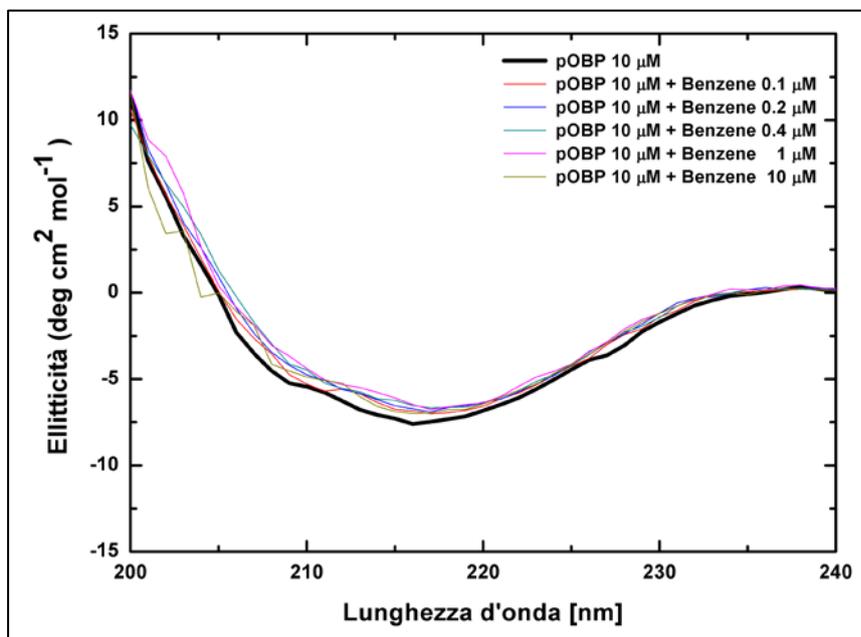


Figura 5. In figura sono mostrati gli spettri CD nel lontano UV della pOBP acquisiti in presenza di differenti concentrazioni di benzene (0-10μM) a 25°C.

Mediante esperimenti di CD nella regione del vicino UV, è stato valutato il comportamento delle catene laterali dei residui aromatici della pOBP in presenza di concentrazioni crescenti di benzene (fig. 6). I risultati si evince che, all'aumentare della concentrazione di benzene, si verifica un aumento nell'assorbimento della banda a 280 nm, indice di un coinvolgimento delle catene laterali del singolo residuo di triptofano e dei residui di tirosina presenti nel sito di legame, presumibilmente impiegate nell'interazione di legame con il benzene.

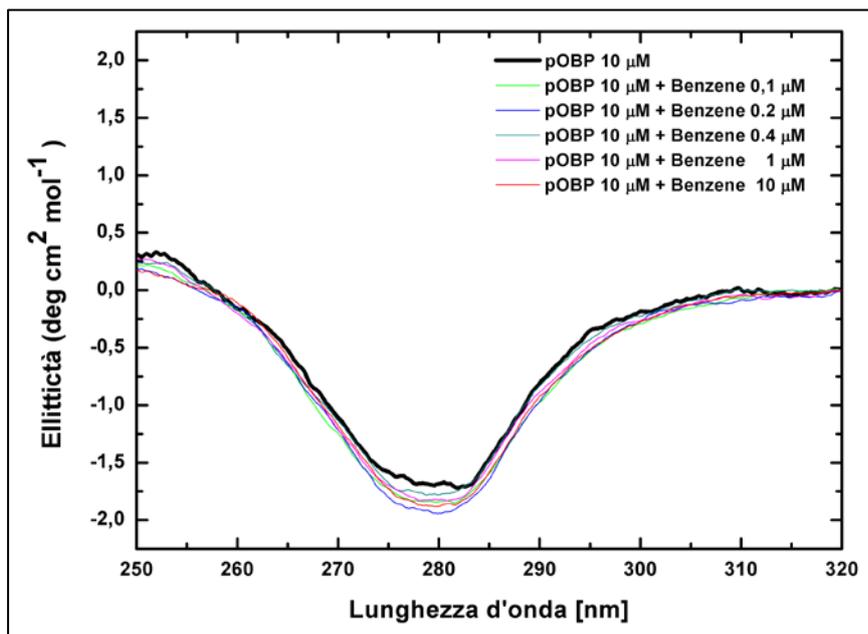


Figura 6. In figura sono mostrati gli spettri CD nel vicino UV della pOBP acquisiti a concentrazioni crescenti di benzene (0-10 μM).

3.4 Saggio *FRET* competitivo per la determinazione del benzene

Sulla base dei risultati ottenuti dalle simulazioni di *docking* e dalle misure di spettrofluorimetria è stato allestito un saggio fluorimetrico competitivo *FRET* per la determinazione del benzene. I risultati degli esperimenti di *docking* suggeriscono che la pOBP riconosce e lega il benzene ed inoltre definiscono la probabile posizione della molecola nel sito di legame ed i residui amminoacidici coinvolti nel legame. Da queste considerazioni e sapendo, dai precedenti esperimenti di *FRET*, che anche l'1-AMA lega il sito di legame della pOBP è stato allestito un saggio competitivo, in cui il benzene competendo con l'1-AMA per il sito di legame determina lo spiazzamento di quest'ultimo, e di conseguenza la riduzione del segnale di *FRET* valutabile come decremento dell'intensità di fluorescenza emessa con un massimo alla lunghezza d'onda di 481 nm.

Mediante simulazioni di *docking* molecolare condotte con *Autodock 4.2*, è stata valutata sia la posizione che l'1-AMA occupa all'interno del sito di legame della pOBP sia i residui amminoacidi coinvolti nell'interazione con l'1-AMA (fig. 1).

Le posizioni che l'1-AMA e il benzene occupano nel sito di legame, quando impegnati nell'interazione con la pOBP, sono state confrontate per sovrapposizione ed i risultati (fig. 2) mostrano che il benzene e l'1-AMA interagiscono in parte, con la medesima regione del sito di legame; di conseguenza, anche la maggior parte dei residui amminoacidici coinvolti nell'interazione con il benzene e con l'1-AMA risultano essere in comune.

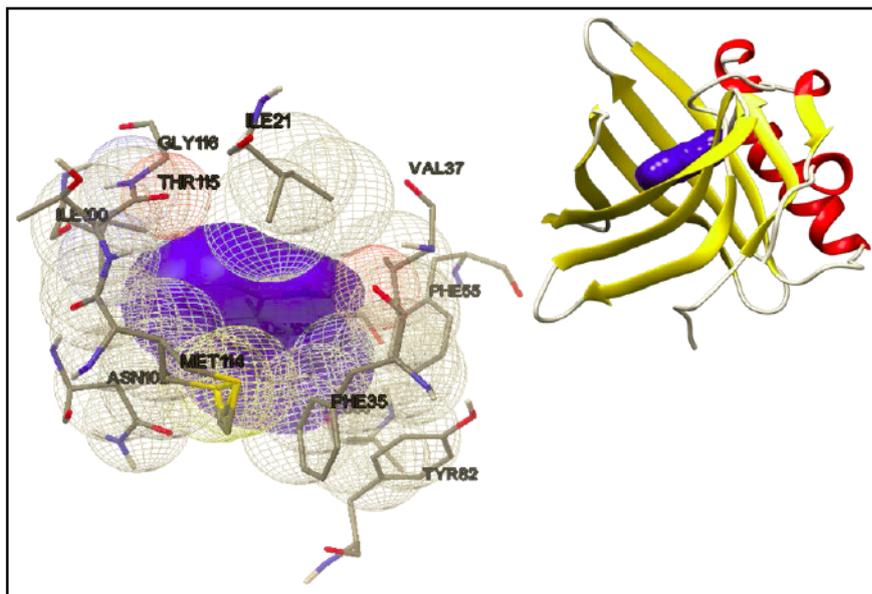


Figura 1. Sulla sinistra è mostrato un particolare del sito di legame della pOBP con in evidenza i residui coinvolti nell'interazione con l'1-AMA, in alto a destra è mostrata la posizione dell'1-AMA nel sito di legame della pOBP.

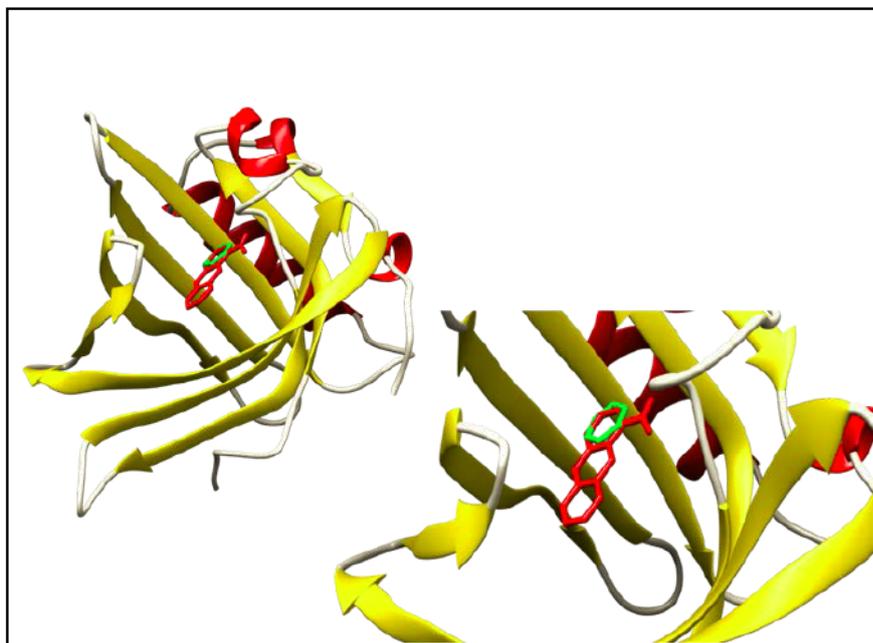


Figura 2. In alto a sinistra sono mostrate le posizioni del benzene e dell'1-AMA all'interno del sito di legame della pOBP, in basso un particolare dove è possibile apprezzare come i due ligandi condividano una regione del sito di legame

Sulla base di questi risultati è stato ipotizzato che il benzene possa competere con l'1-AMA per il legame alla pOBP, per cui è stato allestito un saggio competitivo che verificasse tale ipotesi e che permettesse di determinare la concentrazione di benzene.

Il saggio sviluppato è basato, come visto in precedenza, sull'utilizzo della coppia donatore-accettore, rispettivamente Trp 16 della pOBP/1-AMA, e sul fenomeno di *FRET* che si instaura tra di loro quando il sistema pOBP/1-AMA è eccitato ad una lunghezza d'onda di 295 nm. Precedenti esperimenti hanno evidenziato che la concentrazione di 1-AMA saturante il sito di legame della pOBP è equivalente alla concentrazione della pOBP. È stato possibile valutare il legame del benzene al sito di legame della pOBP monitorando lo spiazzamento dell'1-AMA all'aggiunta di concentrazioni crescenti di benzene, osservabile come riduzione del segnale di *FRET* caratterizzato dal decremento dell'intensità di fluorescenza emessa a 481 nm (fig. 3).

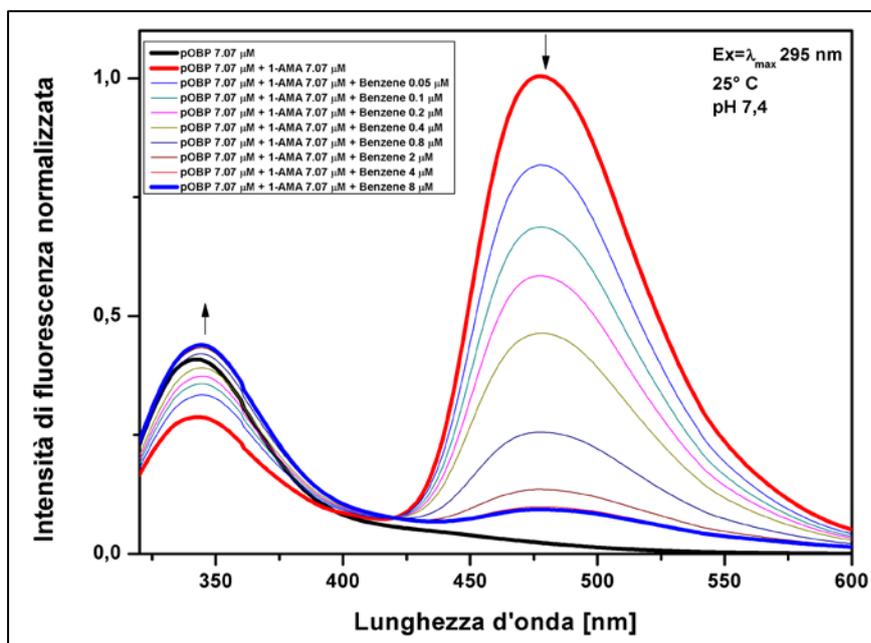


Figura 3. In figura sono mostrati gli spettri di emissione della pOBP in presenza di concentrazioni saturanti di 1-ama. All'aggiunta di concentrazioni crescenti di benzene, si osservano una diminuzione del picco a 481 nm e il ripristino del picco a 340 nm.

Il decremento dell'intensità di fluorescenza emessa a 481 nm in funzione di concentrazioni crescenti di benzene ha permesso di costruire una curva di dissociazione (fig. 4), mediante la quale è stata calcolata la costante di dissociazione del benzene e la minima concentrazione di benzene determinabile. Per il saggio è stata utilizzata una soluzione di pOBP saturata con 1-AMA, e testate concentrazioni crescenti di benzene. La costante di dissociazione pari a $0,30 \pm 0,07 \mu\text{M}$, è stata calcolata mediante *fitting* non lineare utilizzando la funzione *Hill1*, il software impiegato è *OriginPro8*, della *OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*. La minima concentrazione di benzene determinabile è pari a $0,05 \mu\text{M}$, equivalente a $3,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Siccome il valore limite di emissione in atmosfera per il benzene, stabilito dal *D.Lgs. n°155 del 2010*, è di $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ il saggio allestito risulta essere fruibile.

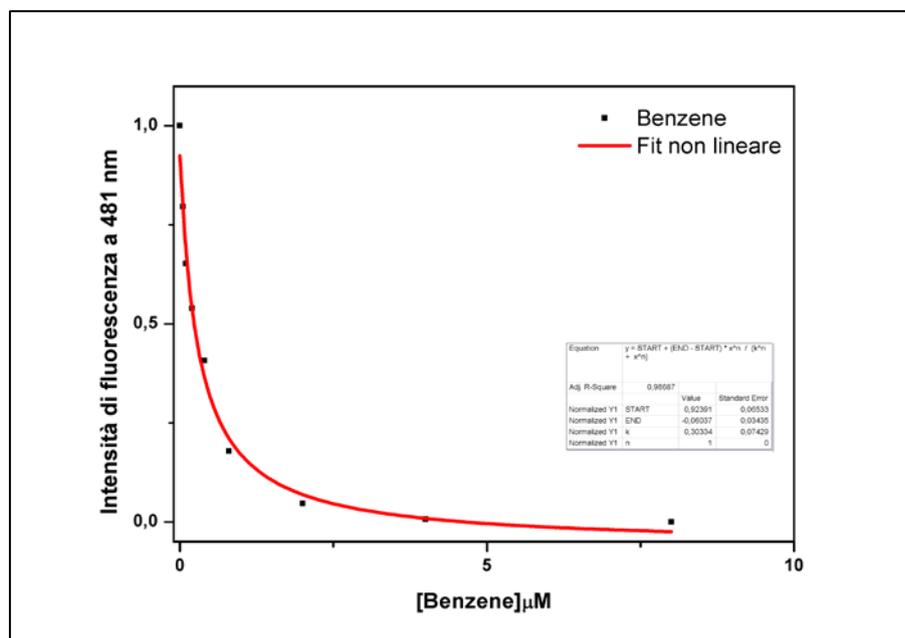


Figura 4. Grafico della diminuzione dell'intensità di fluorescenza dell'1-ama in funzione dell'aumento della concentrazione del benzene. In rosso è mostrata la curva di *fitting* ottenuta applicando l'equazione di Hill da cui è possibile ricavare la costante di dissociazione.

3.5 Valutazione della specificità di legame della pOBP al benzene

Al fine di valutare la specificità di legame della pOBP al benzene è stato necessario individuare e testare molecole che ne fossero putativi interferenti ma che nello stesso tempo fossero anche inquinanti atmosferici. La procedura è stata svolta in due fasi: nella prima fase è stata predetta, per gli interferenti individuati, l'affinità di legame nei confronti della pOBP; nella seconda fase sono stati testati sperimentalmente tre interferenti, selezionati sulla base dei risultati dell'analisi *in-silico*.

Consultando il *database* della "US Environmental Protection Agency" (EPA) alla sezione "TRI Explorer air pollutants", sono stati individuati 136 inquinanti atmosferici, e mediante un approccio di *virtual screening docking*, con l'utilizzo di PyR, ne è stata predetta l'affinità di legame nei confronti della pOBP. In tabella 1 sono riportati i risultati di PyRx ordinati, in base alla minor energia di legame predetta relativa ad ognuna delle molecole analizzate. I risultati del *virtual screening* sono stati analizzati e riorganizzati per ridurre il numero delle molecole da testare sperimentalmente, I criteri di discriminazione sono stati: accessibilità al sito di legame della proteina; affinità di legame valutata in termini di energia di legame predetta; solubilità in acqua e caratteristiche chimiche.

L'accessibilità o meno al sito di legame della proteina è stata valutata, per ogni molecola testata, mediante il visualizzatore grafico di PyRx; delle 136 molecole testate, 83 molecole risultano avere accesso al sito di legame e le restanti 53 non averlo; queste ultime sono state eliminate e non più considerate per le successive fasi di analisi.

LIGANDO	ΔG	LIGANDO	ΔG	LIGANDO	ΔG
HEPTACHLOR	-8,07	BENZOYL CHLORIDE	-4,39	CHLOROFORM	-3,13
TOXAPHENE	-7,73	P-CRESOL	-4,38	VINYL ACETATE	-3,11
CAPTAN	-7,64	O-TOLUIDINE	-4,34	1,2-DIBROMOETHANE	-3,09
4,4'-METHYLENEBIS(2-CHLOROANILINE)	-7,05	N,N-DIMETHYLANILINE	-4,31	DIMETHYL CARBAMYL CHLORIDE	-3,08
2-ACETYLAMINOFLORENE	-6,79	M-CRESOL	-4,28	METHYL METHACRYLATE	-3,07
CHLOROBENZENE	-6,53	3,3'-DICHLOROBENZIDINE	-4,24	METHYL TERT-BUTYL ETHER	-3,05
BIPHENYL	-6,50	CATECHOL	-4,21	EPICHLOROHYDRIN	-3,04
DIBUTYL PHTHALATE	-6,48	STYRENE	-4,19	METHYL HYDRAZINE	-3,01
LINDANE	-6,43	TETRACHLOROETHYLENE	-4,19	VINYLDIENE CHLORIDE	-3,01
DIBENZOFURAN	-6,33	O-CRESOL	-4,18	1,2-DICHLOROPROPANE	-2,98
PENTACHLOROBENZENE	-6,15	TOLUENE	-4,07	1,1-DIMETHYL HYDRAZINE	-2,97
3,3'-DIMETHYLBENZIDINE	-6,12	O-ANISIDINE	-4,01	ETHYL ACRYLATE	-2,93
4,4'-METHYLENEDIANILINE	-6,06	HYDROQUINONE	-3,92	ACROLEIN	-2,91
1,2-DIPHENYLHYDRAZINE	-6,06	ETHYLENEIMINE	-3,91	PROPIONALDEHYDE	-2,89
CARBARYL	-6,00	ANILINE	-3,90	1,4-DIOXANE	-2,85
HEXACHLOROBENZENE	-5,97	1,2-DIBROMO-3-CHLOROPROPANE	-3,88	ETHYLDIENE DICHLORIDE	-2,82
4-AMINOBIPHENYL	-5,84	PROPANE SULTONE	-3,88	CALCIUM CYANAMIDE	-2,82
METHOXYCHLOR	-5,83	P-PHENYLENEDIAMINE	-3,81	ACRYLIC ACID	-2,78
HEXACHLOROCYCLOPENTADIENE	-5,79	1,2,3-TRICHLOROPROPANE	-3,80	PROPYLENE OXIDE	-2,73
PENTACHLOROPHENOL	-5,77	2-NITROPROPANE	-3,77	1,2-DICHLOROETHANE	-2,71
BENZOIC TRICHLORIDE	-5,55	DIETHANOLAMINE	-3,77	CHLOROACETIC ACID	-2,71
BENZIDINE	-5,53	PHENOL	-3,75	1,2-BUTYLENE OXIDE	-2,65
4-DIMETHYLAMINOAZOBENZENE	-5,44	DIETHYL SULFATE	-3,72	BIS(2-CHLOROETHYL) ETHER	-2,64
1,2,4-TRICHLOROBENZENE	-5,43	QUINONE	-3,71	ETHYLENE GLYCOL	-2,59
NAPHTHALENE	-5,40	BROMOFORM	-3,71	1,3-BUTADIENE	-2,58
3,3'-DIMETHOXYBENZIDINE	-5,39	METHYL ISOBUTYL KETONE	-3,68	ALLYL CHLORIDE	-2,55
PHTHALIC ANHYDRIDE	-5,29	MALEIC ANHYDRIDE	-3,65	CHLOROMETHYL METHYL ETHER	-2,55
PARATHION	-5,13	2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID	-3,63	METHYL ISOCYANATE	-2,52
PROPOXUR	-5,07	1,1,1,2-TETRACHLOROETHANE	-3,61	PHOSPHINE	-2,52
DIMETHYL PHTHALATE	-5,06	TRICHLOROETHYLENE	-3,60	BIS(CHLOROMETHYL) ETHER	-2,49
QUINOLINE	-5,01	CARBON TETRACHLORIDE	-3,59	ACETALDEHYDE	-2,45
CUMENE	-4,99	ACRYLAMIDE	-3,59	VINYL CHLORIDE	-2,39
CHLOROBENZILATE	-4,93	4-NITROPHENOL	-3,48	METHYL IODIDE	-2,34
TOLUENE-2,4-DIISOCYANATE	-4,77	NITROBENZENE	-3,46	CHLOROETHANE	-2,34
1,4-DICHLOROBENZENE	-4,76	PHOSGENE	-3,36	DICHLOROMETHANE	-2,22
ACETOPHENONE	-4,64	DIMETHYL SULFATE	-3,3	METHANOL	-2,18
N-NITROSO-N-METHYLUREA	-4,62	ACETAMIDE	-3,29	ETHYLENE OXIDE	-2,11
HEXACHLOROETHANE	-4,60	1,3-DICHLOROPROPYLENE	-3,29	N,N-DIMETHYLFORMAMIDE	-2,00
2,4-DINITROTOLUENE	-4,60	HYDRAZINE	-3,28	CHLORINE	-1,98
M-XYLENE	-4,54	N-HEXANE	-3,27	BROMOMETHANE	-1,93
N-NITROSO-N-ETHYLUREA	-4,52	CHLOROPRENE	-3,27	FORMALDEHYDE	-1,70
2,4-DINITROPHENOL	-4,49	URETHANE	-3,21	HYDROCHLORIC ACID	-1,69
O-XYLENE	-4,47	ACRYLONITRILE	-3,18	CHLOROMETHANE	-1,60
STYRENE OXIDE	-4,45	ETHYLENE THIOUREA	-3,17	HYDROGEN FLUORIDE	-1,10
ETHYLBENZENE	-4,40	TRIFLURALIN	-3,16		
4,6-DINITRO-O-CRESOL	-4,40	1,1,2-TRICHLOROETHANE	-3,16		

Tabella 1. Il ΔG è espresso in (Kcal/mol).

Per le 83 molecole è stata identificata la posa con minore energia di legame appartenente al cluster più popoloso. Sulla base di tale energia di legame ed utilizzando come valore soglia il valore dell'energia di legame predetta per il complesso pOBP-benzene (-3,82 Kcal/mol), esse sono state classificate in due gruppi: maggiore e minore energia di legame alla pOBP. Sono state individuate 50 molecole con energia di legame minore (tabella 2) e 33 molecole con energia di legame superiore a -3,82 Kcal/mol (tabella 3); queste ultime sono state eliminate per le successive fasi di analisi.

LIGANDO	ΔG
HEPTACHLOR	-8,07
TOXAPHENE	-7,73
CAPTAN	-7,64
4,4'-METHYLENEBIS(2-CHLOROANILINE)	-7,05
2-ACETYLAMINOFUORENE	-6,79
CHLOROENZENE	-6,53
BIPHENYL	-6,50
DIBUTYL PHTHALATE	-6,48
LINDANE	-6,43
DIBENZOFURAN	-6,33
PENTACHLOROENZENE	-6,15
3,3'-DIMETHYLBENZIDINE	-6,12
4,4'-METHYLENEDIANILINE	-6,06
1,2-DIPHENYLHYDRAZINE	-6,06
HEXACHLOROENZENE	-5,97
4-AMINOBIPIENYL	-5,84
METHOXYCHLOR	-5,83
HEXACHLOROCYCLOPENTADIENE	-5,79
PENTACHLOROPHENOL	-5,77
BENZOIC TRICHLORIDE	-5,55
BENZIDINE	-5,53
1,2,4-TRICHLOROENZENE	-5,43
NAPHTHALENE	-5,40
PHTHALIC ANHYDRIDE	-5,29
PARATHION	-5,13
PROPOXUR	-5,07
DIMETHYL PHTHALATE	-5,06
QUINOLINE	-5,01
CUMENE	-4,99
TOLUENE-2,4-DIISOCYANATE	-4,77
1,4-DICHLOROENZENE	-4,76
ACETOPHENONE	-4,64
HEXACHLOROETHANE	-4,6
M-XYLENE	-4,54
O-XYLENE	-4,47
STYRENE OXIDE	-4,45
ETHYLBENZENE	-4,40
BENZOYL CHLORIDE	-4,39
P-CRESOL	-4,38
O-TOLUIDINE	-4,34
N,N-DIMETHYLANILINE	-4,31
M-CRESOL	-4,28
3,3'-DICHLOROENZIDINE	-4,24
STYRENE	-4,19
TETRACHLOROETHYLENE	-4,19
O-CRESOL	-4,18
TOLUENE	-4,07
O-ANISIDINE	-4,01
HYDROQUINONE	-3,92
1,2-DIBROMO-3-CHLOROPROPANE	-3,88

Tabella 2. Il ΔG è espresso in (Kcal/mol).

LIGANDO	ΔG
P-PHENYLENEDIAMINE	3,81
1,2,3-TRICHLOROPROPANE	3,80
PHENOL	3,75
DIETHYL SULFATE	3,72
QUINONE	3,71
BROMOFORM	3,71
METHYL ISOBUTYL KETONE	3,68
MALEIC ANHYDRIDE	3,65
2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID	3,63
1,1,1,2-TETRACHLOROETHANE	3,61
TRICHLOROETHYLENE	3,60
CARBON TETRACHLORIDE	3,59
4-NITROPHENOL	3,48
NITROBENZENE	3,46
1,3-DICHLOROPROPYLENE	3,29
N-HEXANE	3,27
CHLOROPRENE	3,27
1,1,2-TRICHLOROETHANE	3,16
CHLOROFORM	3,13
1,2-DIBROMOETHANE	3,09
DIMETHYL CARBAMYL CHLORIDE	3,08
METHYL METHACRYLATE	3,07
METHYL TERT-BUTYL ETHER	3,05
VINYLDENE CHLORIDE	3,01
1,2-DICHLOROPROPANE	2,98
ETHYL ACRYLATE	2,93
ETHYLIDENE DICHLORIDE	2,82
1,2-DICHLOROETHANE	2,71
BIS(2-CHLOROETHYL) ETHER	2,64
1,3-BUTADIENE	2,58
ALLYL CHLORIDE	2,55
DICHLOROMETHANE	2,22
N,N-DIMETHYLFORMAMIDE	2,00

Tabella 3. Il ΔG è espresso in (Kcal/mol).

Il saggio fluorimetrico competitivo si svolge in tampone acquoso, per questo 9 molecole insolubili in acqua sono state escluse dalle altre 50 precedentemente individuate. Le 41 molecole residue sono riportate in tabella 4 ed ordinate in base all'energia di legame.

LIGANDO	ΔG
HEPTACHLOR	-8,07
CAPTAN	-7,64
2-ACETYLAMINOFUORENE	-6,79
CHLOROBENZENE	-6,53
BIPHENYL	-6,50
DIBUTYL PHTHALATE	-6,48
LINDANE	-6,43
DIBENZOFURAN	-6,33
PENTACHLOROBENZENE	-6,15
3,3'-DIMETHYLBENZIDINE	-6,12
4-AMINOBIPIHENYL	-5,84
METHOXYCHLOR	-5,83
HEXACHLOROCYCLOPENTADIENE	-5,79
PENTACHLOROPHENOL	-5,77
BENZIDINE	-5,53
1,2,4-TRICHLOROBENZENE	-5,43
NAPHTHALENE	-5,40
PHTHALIC ANHYDRIDE	-5,29
PARATHION	-5,13
PROPOXUR	-5,07
DIMETHYL PHTHALATE	-5,06
QUINOLINE	-5,01
CUMENE	-4,99
1,4-DICHLOROBENZENE	-4,76
ACETOPHENONE	-4,64
HEXACHLOROETHANE	-4,6
STYRENE OXIDE	-4,45
ETHYLBENZENE	-4,40
BENZOYL CHLORIDE	-4,39
P-CRESOL	-4,38
O-TOLUIDINE	-4,34
N,N-DIMETHYLANILINE	-4,31
M-CRESOL	-4,28
3,3'-DIMETHYLBENZIDINE	-4,24
TETRACHLOROETHYLENE	-4,19
STYRENE	-4,19
O-CRESOL	-4,18
TOLUENE	-4,07
O-ANISIDINE	-4,01
HYDROQUINONE	-3,92
1,2-DIBROMO-3-CHLOROPROPANE	-3,88

Tabella 4. Il ΔG è espresso in (Kcal/mol).

Le stesse molecole sono state classificate, sulla base delle proprie caratteristiche chimiche, in: aromatiche; alifatiche; alogenate e non alogenate. Sono state identificate 35 molecole aromatiche e 6 alifatiche (tabella 5); 26 molecole non alogenate e 15 alogenate (tabella 6).

LIGANDO	ΔG
HEPTACHLOR	-8,07
CAPTAN	-7,64
HEXACHLOROCYCLOPENTADIENE	-5,79
HEXACHLOROETHANE	-4,60
TETRACHLOROETHYLENE	-4,19
1,2-DIBROMO-3-CHLOROPROPANE	-3,88
2-ACETYLAMINOFUORENE	-6,79
CHLOROBENZENE	-6,53
BIPHENYL	-6,50
DIBUTYL PHTHALATE	-6,48
LINDANE	-6,43
DIBENZOFURAN	-6,33
PENTACHLOROBENZENE	-6,15
3,3'-DICHLOROBENZIDINE	-6,12
4-AMINOBIPHENYL	-5,84
METHOXYCHLOR	-5,83
PENTACHLOROPHENOL	-5,77
BENZIDINE	-5,53
1,2,4-TRICHLOROBENZENE	-5,43
NAPHTHALENE	-5,40
PHTHALIC ANHYDRIDE	-5,29
PARATHION	-5,13
PROPOXUR	-5,07
DIMETHYL PHTHALATE	-5,06
QUINOLINE	-5,01
CUMENE	-4,99
1,4-DICHLOROBENZENE	-4,76
ACETOPHENONE	-4,64
STYRENE OXIDE	-4,45
ETHYLBENZENE	-4,40
BENZOYL CHLORIDE	-4,39
P-CRESOL	-4,38
O-TOLUIDINE	-4,34
N,N-DIMETHYLANILINE	-4,31
M-CRESOL	-4,28
3,3'-DIMETHYLBENZIDINE	-4,24
STYRENE	-4,19
O-CRESOL	-4,18
TOLUENE	-4,07
O-ANISIDINE	-4,01
HYDROQUINONE	-3,92

Tabella 5. Il ΔG è espresso in (Kcal/mol), in blu sono evidenziate le molecole alifatiche.

LIGANDO	ΔG
HEPTACHLOR	-8,07
CAPTAN	-7,64
CHLOROBENZENE	-6,53
LINDANE	-6,43
PENTACHLOROBENZENE	-6,15
3,3'-DICHLOROBENZIDINE	-6,12
METHOXYCHLOR	-5,83
HEXACHLOROCYCLOPENTADIENE	-5,79
PENTACHLOROPHENOL	-5,77
1,2,4-TRICHLOROBENZENE	-5,43
1,4-DICHLOROBENZENE	-4,76
HEXACHLOROETHANE	-4,60
BENZOYL CHLORIDE	-4,39
TETRACHLOROETHYLENE	-4,19
1,2-DIBROMO-3-CHLOROPROPANE	-3,88
2-ACETYLAMINOFLUORENE	-6,79
BIPHENYL	-6,50
DIBUTYL PHTHALATE	-6,48
DIBENZOFURAN	-6,33
4-AMINOBIPIHENYL	-5,84
BENZIDINE	-5,53
NAPHTHALENE	-5,40
PHTHALIC ANHYDRIDE	-5,29
PARATHION	-5,13
PROPOXUR	-5,07
DIMETHYL PHTHALATE	-5,06
QUINOLINE	-5,01
CUMENE	-4,99
ACETOPHENONE	-4,64
STYRENE OXIDE	-4,45
ETHYLBENZENE	-4,40
P-CRESOL	-4,38
O-TOLUIDINE	-4,34
N,N-DIMETHYLANILINE	-4,31
M-CRESOL	-4,28
3,3'-DIMETHYLBENZIDINE	-4,24
STYRENE	-4,19
O-CRESOL	-4,18
TOLUENE	-4,07
O-ANISIDINE	-4,01
HYDROQUINONE	-3,92

Tabella 6. Il ΔG è espresso in (Kcal/mol), in verde son evidenziate le molecole alogenate.

Le quattro classi di molecole precedentemente identificate sono state combinate tra loro, per identificare quali fossero le caratteristiche comuni a più molecole, determinando la formazione di tre sottoclassi: aromatiche/alogenate; aromatiche non alogenate; alifatiche/alogenate. Le tre sottoclassi così ottenute sono state ordinate, mediante un grafico 3D (grafico 1), in funzione dell'energia di legame predetta; permettendo l'individuazione delle due sottoclassi di molecole più popolose: le aromatiche/alogenate con 9 molecole (tabella 7) e le aromatiche/non alogenate con 26 molecole (tabella 8). Successivamente per ognuna delle due sottoclassi, sulla base della minor energia di legame, sono state selezionate due molecole. Per la sottoclasse aromatiche/alogenate sono stati selezionati il clorobenzene e il pentaclorobenzene; il lindano è stato escluso in quanto ritenuto troppo pericoloso per la salute e quindi di difficile manipolazione. Per la sottoclasse aromatiche/non alogenate sono stati selezionati il 2-acetilamminofluorene e il bifenile.

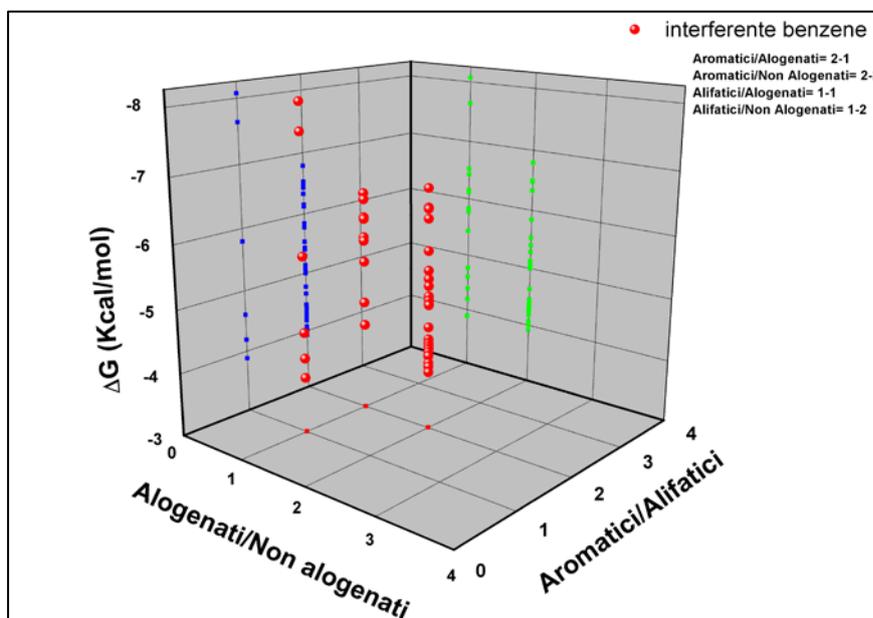


Grafico 1. Il grafico mostra i due sottogruppi di molecole più popolosi ordinati in base all'energia di legame. Sull'asse aromatici/alifatici il valore 2 indica l'aromaticità e il valore 1 l'alifaticità. Sull'asse Alogenati/Non Alogenati il valore 1 indica lo stato di alogenazione e il valore 2 di non alogenazione.

LIGANDO	ΔG
CHLOROBENZENE	-6,53
LINDANE	-6,43
PENTACHLOROBENZENE	-6,15
METHOXYCHLOR	-5,83
PENTACHLOROPHENOL	-5,77
1,2,4-TRICHLOROBENZENE	-5,43
1,4-DICHLOROBENZENE	-4,76
BENZOYL CHLORIDE	-4,39
3,3'-DICHLOROBENZIDINE	-4,24

Tabella 7. Sottogruppo delle molecole Alifatiche/Alogenate; il ΔG è espresso in (Kcal/mol).

LIGANDO	ΔG
2-ACETYLAMINOFUORENE	-6,79
BIPHENYL	-6,50
DIBUTYL PHTHALATE	-6,48
DIBENZOFURAN	-6,33
3,3'-DIMETHYLBENZIDINE	-6,12
4-AMINOBIPIHENYL	-5,84
BENZIDINE	-5,53
NAPHTHALENE	-5,40
PHTHALIC ANHYDRIDE	-5,29
PARATHION	-5,13
PROPOXUR	-5,07
DIMETHYL PHTHALATE	-5,06
QUINOLINE	-5,01
CUMENE	-4,99
ACETOPHENONE	-4,64
STYRENE OXIDE	-4,45
ETHYLBENZENE	-4,40
P-CRESOL	-4,38
O-TOLUIDINE	-4,34
N,N-DIMETHYLANILINE	-4,31
M-CRESOL	-4,28
STYRENE	-4,19
O-CRESOL	-4,18
TOLUENE	-4,07
O-ANISIDINE	-4,01
HYDROQUINONE	-3,92

Tabella 8. Sottogruppo delle molecole Aromatiche/Alogenate; il ΔG è espresso in (Kcal/mol).

La specificità di legame della pOBP nei confronti delle quattro molecole selezionate, è stata valutata sperimentalmente mediante il saggio competitivo fluorimetrico. Purtroppo non è stato possibile saggiare il 2-acetilamminofluorene in quanto è risultato essere insolubile in tampone acquoso, nonostante sia riportata una solubilità in acqua pari a 6,278 mg/L (U.S. EPA, 2012).

Per i saggi è stata utilizzata una soluzione di pOBP saturata con 1-AMA e testate concentrazioni crescenti di clorobenzene (fig. 1), bifenile (fig. 2) e pentaclorobenzene (fig. 3). Concentrazioni crescenti di inquinante non determinano la riduzione dell'intensità di fluorescenza emessa a 481 nm, per nessuna delle tre molecole esaminate, suggerendo che l'1-AMA non viene spiazzato dal sito di legame della pOBP in quanto non vi è competizione per tale sito diversamente da quanto visto per il benzene, lasciando ipotizzare una specificità di legame della pOBP al benzene. Tuttavia il numero di inquinanti atmosferici putativi interferenti del benzene testato è esiguo, per cui non è possibile affermare con certezza la specificità di legame della proteina al benzene.

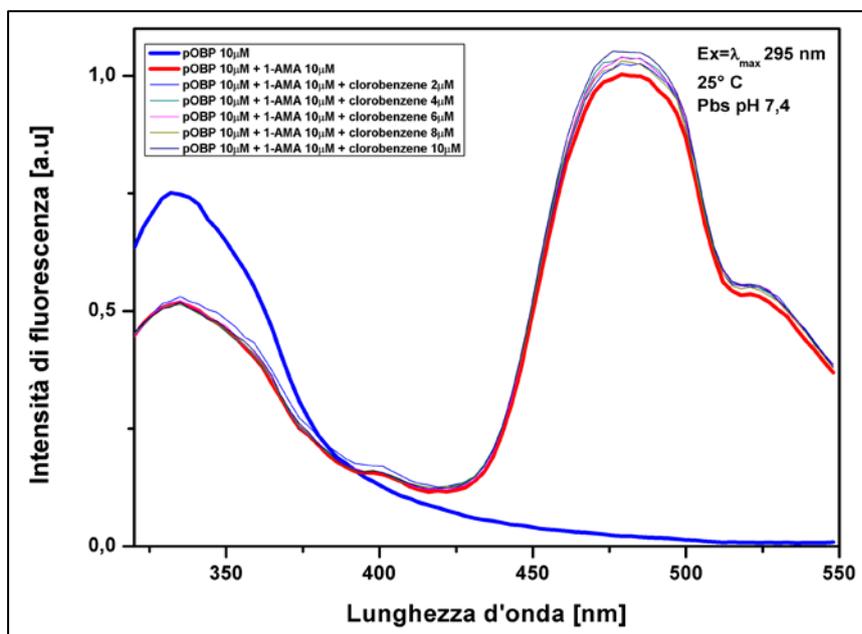


Figura 1. Saggio competitivo fluorimetrico; il competitore utilizzato è il clorobenzene.

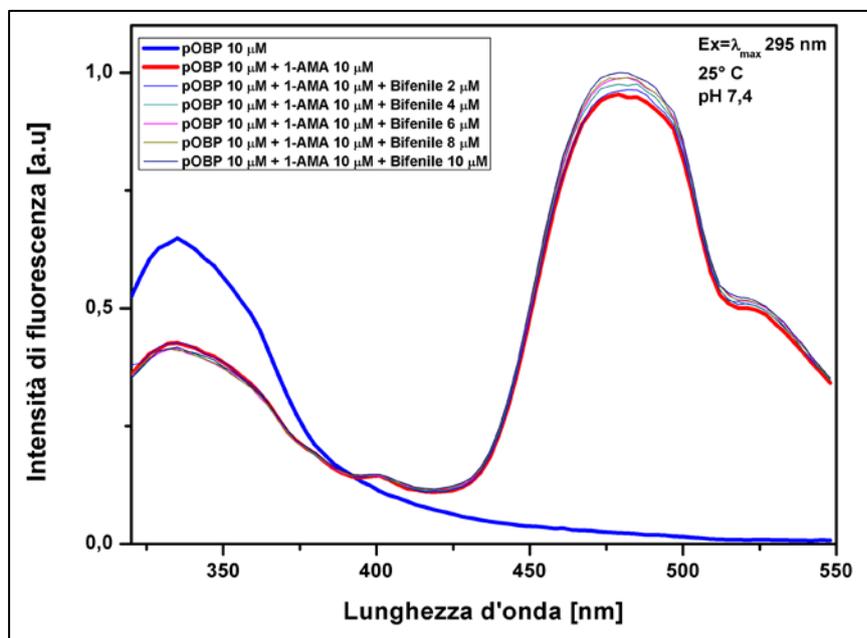


Figura 2. Saggio competitivo fluorimetrico; il competitore utilizzato è il bifenile.

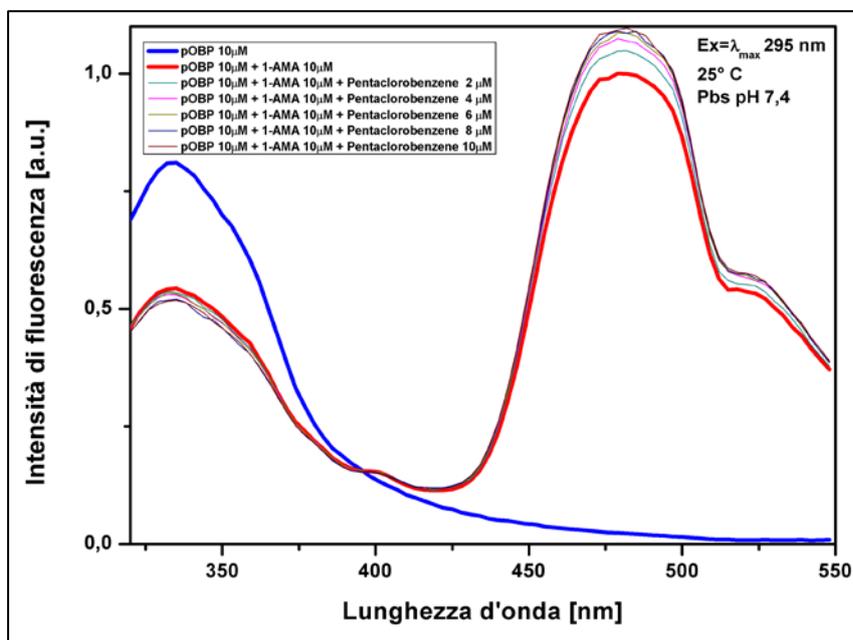


Figura 3. Saggio competitivo fluorimetrico; il competitore utilizzato è il pentaclorobenzene.

3.6 Immobilizzazione della pOBP su supporto di silicio

L'immobilizzazione della biomolecola sensibile è uno *step* cruciale nella realizzazione, in un prossimo futuro, dell'effettivo *chip* sensore e quindi del dispositivo biosensoristico. A tal proposito è stato allestito un protocollo di immobilizzazione covalente della pOBP su un supporto di silicio funzionalizzato con APTES (3-aminopropiltri-etossisilano). Il supporto utilizzato delle dimensioni di 18x18x0.13 mm è mostrato in figura 1.



Figura 1. In figura è mostrato il supporto di silicio utilizzato per l'immobilizzazione della pOBP.

L'immobilizzazione eseguita si basa sulla formazione di un legame ammidico tra i gruppi carbossilici liberi della proteina e i gruppi amminici liberi sulla superficie del supporto funzionalizzato. Mediante EDC/NHS (carbodimide/N-idrossisuccinimide) i gruppi carbossilici liberi della proteina sono stati trasformati in un estere ammino-reattivo semi-stabile, il quale reagendo con i gruppi amminici liberi sulla superficie del supporto funzionalizzato ha determinato la formazione di un legame ammidico, immobilizzando in modo covalente la pOBP alla superficie del supporto.

La corretta deposizione ed immobilizzazione della pOBP è stata valutata, per chemiluminescenza, mediante l'utilizzo di anticorpi anti-pOBP (fig. 2).

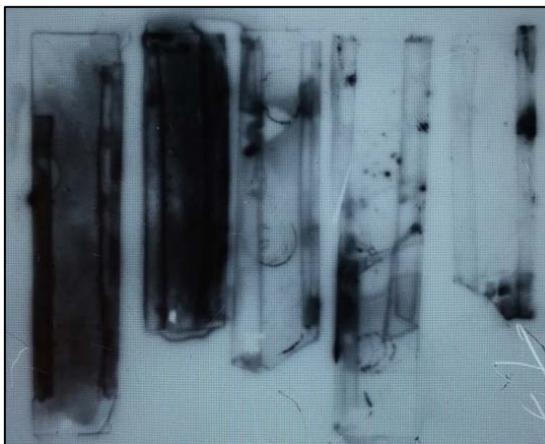


Figura 2. In figura è mostrato il risultato dell'analisi di chemiluminescenza. Da sinistra verso destra si possono osservare i supporti di silicio funzionalizzati su cui è sono state immobilizzate due differenti quantità di pOBP 0.1 mg/mL e 0.2 mg/mL, Ovalbumina 0.2 mg/mL, Bsa 0.2 mg/mL, bianco.

Conclusioni e prospettive future

In questo lavoro, mediante analisi *in-silico* tramite un approccio di *docking* molecolare inverso e *docking* molecolare diretto, è stata identificata la *porcine odorant binding protein* come biomolecola capace di riconoscere e legare il benzene con specificità ed elevata affinità.

La pOBP ricombinante, clonata in vettore di espressione pGex2TK, è stata espressa e purificata all'omogeneità.

Mediante l'ausilio di metodologie biochimiche e spettroscopiche di dicroismo circolare e spettroscopia di fluorescenza è stato caratterizzato il comportamento strutturale della proteina al variare di parametri chimico-fisici quali la temperatura e la presenza/assenza del benzene. La caratterizzazione effettuata ha permesso di individuare le condizioni ottimali di attività della proteina.

Le proprietà di riconoscimento molecolare e le peculiarità strutturali della pOBP sono state impiegate per lo sviluppo di un saggio competitivo fluorimetrico *FRET* per la determinazione del benzene; su tale saggio si basa il biosensore progettato.

L'elevata affinità della proteina al benzene ha permesso di sviluppare un sensore capace di determinare concentrazioni di benzene pari a $3,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ al di sotto del limite previsto dalla normativa n°155 del 2010.

La specificità di legame della pOBP al benzene è stata valutata mediante un duplice approccio: *in-silico* e *in-vitro*. Tramite *virtual screening docking* per 136 inquinanti atmosferici, individuati consultando il database dell' "US EPA Environmental Protection Agency", è stata valutata l'affinità di legame alla pOBP. Dall'analisi dei risultati sono stati individuati e testati sperimentalmente: il clorobenzene, il bifenile e il pentaclorobenzene. I dati sperimentali raccolti confermano la specificità di legame del benzene alla pOBP, tuttavia il numero di molecole interferenti testate, rispetto a quelle individuate come putative interferenti, è esiguo; per cui tuttora per altri interferenti sono in corso ulteriori test *in-vitro*. Inoltre sulla base dei risultati dell'analisi *in-silico* e al fine di comprendere quali tra i residui amminoacidi coinvolti nell'interazione con il benzene abbiano un ruolo determinante in termini di affinità e specificità di legame, è prevista la generazione di mutanti della pOBP e la loro successiva caratterizzazione.

Per lo sviluppo, in futuro, dell' effettivo *chip* sensore, la pOBP è stata immobilizzata covalentemente su un supporto di silicio, e ne è stata verificata la corretta immobilizzazione.

I risultati di questo lavoro rappresentano le basi per la realizzazione di una piattaforma biosensoristica sensibile, specifica, economica, portatile, che possa monitorare in continuo i livelli atmosferici di benzene e che sia integrabile in una rete di sensori comunicanti mediante tecnologia *wireless*, con la quale monitorare ampie superfici geografiche. Al fine di migliorare la qualità della salute pubblica, i dati raccolti saranno impiegati per un' analisi che possa permettere di stabilire una correlazione tra l'inquinamento atmosferico da idrocarburi aromatici e l'insorgenza di patologie tumorali.

L'impiego di una proteina come elemento di riconoscimento molecolare rappresenta un punto di forza, in quanto mediante l'ingegneria genetica è possibile, per mutagenesi, migliorare l'affinità della proteina nei confronti del benzene e quindi rendere sempre all'avanguardia la piattaforma sensoristica realizzata.

Materiali e Metodi

5.1 Materiali

Il ceppo di *Escherichia coli* BL21(DE3) con il genotipo fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHI Δ EcoRI-B int:(lacI:PlacUV5:T7 gene1) i21 Δ nin5 è stato acquistato alla New England Biolabs (UK) Ltd.

Tutte le soluzioni sono state preparate usando acqua deionizzata, ulteriormente purificata mediante il sistema Milli-Q della Millipore.

Gli standard chimici, i solventi e i tamponi sono stati acquistati alla Sigma-Aldrich. I componenti utilizzati per l'elettroforesi delle proteine sono della Bio-Rad. Tutti gli altri reagenti utilizzati sono preparazioni commerciali della migliore qualità disponibile.

5.2 Docking Inverso: idTarget

La metodologia di *docking* inverso permette, mediante simulazioni di *docking* molecolare, di predire l'affinità di legame di una singola molecola (ligando) nei confronti di numerose strutture di proteine (*target*). Tale metodologia è stata utilizzata, come screening, per predire l'affinità di legame del benzene nei confronti di una specifica famiglia di proteine: le lipocaline. Il software utilizzato per le simulazioni di *docking* è *idTarget* (Jui-Chih Wang et al., 2012), un *webserver* accessibile gratuitamente da questo *link*: <http://idtarget.rcas.sinica.edu.tw/index.php>. Il motore di ricerca utilizzato da *idTarget* è *MEDock*, il quale mediante un algoritmo di ricerca globale genera le pose del ligando (Chang D.T.H. et al., 2005) *idTarget* esplora l'intera superficie del *target* proteico costruendo una griglia che lo avvolge e precalcolando una mappa di energie di interazione per ogni punto della superficie del *target*; successivamente utilizza un approccio di *divide-and-conquer* con cui suddivide la griglia in porzioni più piccole in modo da aumentare l'efficienza e la velocità di calcolo e mediante una funzione di *scoring* simile a quella utilizzata da *Autodock* (Goodsell D.S. et al., 1996) calcola l'energia libera di legame (ΔG^{pred} Kcal/mol) e la costante di inibizione (K_i^{pred}) (Jui-Chih Wang et al., 2012). *idTarget* necessita di due file di *input*, uno relativo al ligando in formato .pdb, .pdbqt o .mol2 e l'altro con i codici PDB relativi alle strutture di *target* da analizzare. Il file della struttura tridimensionale del benzene (ligando) in formato .sdf è stato scaricato da *PubChem* convertito in .mol2 e sottomesso ad *idTarget*. Le lipocaline (*target*) identificate nel *database RCSB PDB*, utilizzando come chiave di ricerca la parola *lipocalins*, sono 280 (dato aggiornato al 31/12/2013), i relativi codici PDB sono stati sottomessi ad *idTarget*. I parametri utilizzati per la ricerca sono quelli di *default*.

5.3 Docking diretto: Autodock 4.2

La metodologia di *docking* diretto permette, mediante simulazioni di *docking* molecolare, di predire l'affinità di legame di una singola molecola (ligando) nei confronti di una singola struttura proteica (*target*). Tale metodologia è stata usata per rifinire i risultati dello screening condotto mediante *docking* inverso.

La procedura di *docking* si compone di varie fasi: preparazione dei file del recettore e del ligando, calcolo delle mappe di affinità mediante la costruzione di una griglia 3D che avvolge il complesso ligando-recettore, definizione dei parametri di *docking* e simulazione vera e propria. I software utilizzati per le fasi di preparazione e di simulazione sono compresi in un unico pacchetto: *MGLTools*, che utilizza per le fasi di preparazione *AutodockTools*, per il calcolo delle mappe di affinità *Autogrid* e per la generazione delle pose che può assumere il ligando e il calcolo dell'energia libera di legame *Autodock 4.2* (Morris G.M. et al., 2009). Le simulazioni condotte sono di *docking* rigido. Il file della struttura tridimensionale del ligando è stato scaricato da *Pubchem* in formato *.sdf* e convertito in formato *.pdb*. I file di struttura delle lipocaline analizzate sono stati scaricati in formato *.pdb* da *RCSB PDB*, i codici identificativi sono 1DZK e 1GT1. Per entrambi i file ne è stata controllata l'integrità, eliminati gli eteroatomi relativi al ligando di co-cristallizzazione e alle molecole d'acqua. I file del ligando e del recettore sono stati caricati in ADT e mediante una serie di passaggi intermedi, sono stati aggiunti gli atomi d'idrogeno mancanti, calcolati i *torsdof* per il ligando, protonato le strutture e assegnato una carica parziale agli atomi creando così due file con estensione *.pdbqt*.

Inoltre sono state definite le dimensioni e la risoluzione della griglia (126x126x126, 0.5 Å) che avvolge il complesso recettore-ligando e tali informazioni sono state salvate in un file con estensione *.gpf*; poi mediante *Autogrid* sono state calcolate le mappe di affinità. Successivamente sono stati selezionati i parametri di *docking* che corrispondono a quelli di *default* per l'algoritmo di ricerca genetico, con un'unica variazione che consiste nel numero di pose generate impostato a 100. Conclusa la fase di preparazione, mediante *Autodock4.2* sono state condotte le simulazioni di *docking*, i risultati sono rilasciati in un file con estensione *.dlg* contenente le coordinate tridimensionali delle pose generate, la relativa energia libera di legame ed un istogramma di clusterizzazione delle pose ottenute ordinato in termini di differenza nello spazio valutata in Å. Sempre mediante ADT sono state ricavate informazioni quali i residui amminoacidici coinvolti nell'interazione con il ligando e la presenza di legami H o di interazioni π - π . I residui coinvolti nell'interazione con il ligando sono stati valutati applicando come VWD (raggio di *Van Der Waals*) un valore di 1.15 Å.

5.4 Trasformazione della pOBP in cellule *Escherichia Coli* BL21(DE3)

Il vettore ricombinante pGEX-2KT-pOBP prodotto dalla reazione di ligasi, è stato utilizzato per trasformare le cellule competenti di *Escherichia Coli* BL21 (DE3). Ad una aliquota di 200 μ l di cellule competenti, rese precedentemente tali attraverso il trattamento con Calcio Cloruro, prelevata dal freezer -80°C e scongelata in ghiaccio, sono stati aggiunti 10 μ L di miscela di ligasi. Dopo una incubazione in ghiaccio di 30 minuti, le cellule sono state sottoposte ad uno shock termico in bagnetto termostato a 42°C per 30 secondi. Dopo lo shock termico le cellule sono state poste nuovamente in ghiaccio per altri 2 minuti. Successivamente sono state inoculate in un terreno liquido Lauria-Bertani (LB), e incubate per 1 ora alla temperatura di 37°C in agitazione a 160 rpm. La coltura cellulare è stata poi centrifugata a 7000 rpm per 10 minuti alla temperatura di 25 °C, 600 μ l di surnatante sono stati rimossi, ed il *pellet* risospeso nel terreno restante. Due aliquote di 30 e 100 μ l rispettivamente sono state distribuite su piastra, contenente 20 ml di *LB-agar* (1,5% *Bacto-Agar AppliChem, Darmstadt, Germania*), 20 μ l ampicillina (100 mg/ml), sterilizzata per filtrazione. Le piastre sono state incubate alla temperatura di 37°C overnight.

Le colonie trasformate, contenenti quindi il plasmide con l'inserito sono state selezionate tramite resistenza all'ampicillina.

5.5 Espressione della pOBP

Per l'espressione della porcine odorant-binding protein (pOBP), una colonia di *E. Coli* (BL21-DE3) trasformata con il vettore di espressione pGEX2TK contenente il gene codificante la proteina di fusione, è stata inoculata in 2,5 mL di LB in presenza di ampicillina alla concentrazione finale di 50 µg/mL. Il pre-inocolo è stato incubato tutta la notte a 37 °C sotto agitazione alla velocità di 160 rpm. Dopodiché, il pre-inocolo è stato inoculato in 0.5L di LB contenente ampicillina alla concentrazione finale di 50 µg/mL, ed incubato a 37 °C sotto agitazione.

Il valore di assorbanza a 600 nm è stato controllato allo spettrofotometro e quando ha raggiunto il valore di 0.1 OD, l'espressione del gene codificante per la proteina ricombinante è stato indotto con *Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside* (IPTG) alla concentrazione finale di 0.5 mM. Dopo 3 ore di post-induzione la sospensione batterica è stata centrifugata a 3500 rpm per 30 minuti a 4 °C ed il *pellet* cellulare è stato risospeso in tampone di lisi (PBS 1x pH7.3) nel rapporto di 1g *pellet*/3mL tampone.

A questo punto alla sospensione sono stati aggiunti prima Lisozima allo 0.4%, e dopo DNAsi I (0.05mg/mL) e MgCl₂ (5mM), effettuando due diverse incubazioni da 30 minuti a 37 °C.

Le cellule sono state poi lisate utilizzando la *French Press* e i detriti cellulari sono stati separati dalla frazione solubile centrifugando a 30000 rpm per 30 minuti a 4 °C. Prima della fase di purificazione la frazione solubile è stata concentrata utilizzando una membrana di cellulosa della *Millipore (Ultracel YM)* con un *cut-off* di 30000 NMWL, permettendo una parziale purificazione dai contaminanti proteici a più alto peso molecolare (>30000 Da).

5.6 Purificazione della pOBP

La purificazione della pOBP è stata effettuata utilizzando una cromatografia di affinità per la GST, con la resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Life Sciences at Biocompare.com.)* seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Il metodo di purificazione si basa sull'elevata affinità della GST per il glutatione. Quando la proteina di fusione pOBP-GST è caricata sulla colonna cromatografica, la GST lega con elevata affinità il glutatione presente sulla resina e tutte le impurezze presenti nel campione sono eliminate attraverso un lavaggio estensivo della colonna. Al termine del processo la GST legata alla resina è rimossa utilizzando un eccesso di glutatione. Il campione proteico disciolto in tampone di lisi (PBS 1X pH 7.3), è caricato sulla colonna *Sepharose 4 Fast Flow* ed incubato a temperatura ambiente, per 30 minuti sotto agitazione. Al termine della fase d'incubazione del campione la colonna è lavata estensivamente con tampone di lisi (PBS 1X pH 7.3) allontanando i contaminanti.

Dopo la fase di lavaggio, la colonna è incubata con trombina (1 unità di trombina per ogni 100 µg di proteina di fusione) per 16 ore a 25°C in tampone di lisi (PBS 1X pH 7.3). Dopo le ore d'incubazione si recuperano le frazioni contenenti la pOBP e si effettua un lavaggio estensivo con tampone (PBS 1X pH 7.3).

Infine la resina è rigenerata lavando la colonna con il tampone di eluizione (50mM Tris-HCl, 10 mM *reduced glutathione* pH 8,0) che permette di eluire la GST presente sulla resina.

5.7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti

Le proteine contenute in ciascun campione ottenuto dalla corsa cromatografica e il loro grado di purezza è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).

Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il metodo di (Laemmli U.K. et al., 1970): i campioni sono stati diluiti nel tampone di corsa (50 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanolo, 0.001% blu di bromofenolo e 10% glicerolo) e sono stati denaturati a 100°C per 10 minuti. La corsa elettroforetica è stata realizzata utilizzando un tampone di corsa costituito da 0.125 M Tris-HCl, 0.96 M glicina 0.5% SDS pH 8.3, caricando i campioni su di un gel di poliacrilammide (0.75 mm di spessore) costituito da uno *stacking* gel e da uno *resolving* gel rispettivamente al 4% e al 12% di acrilammide. La corsa elettroforetica è stata condotta inizialmente a 120 V, per favorire l'entrata dei campioni nel gel, e poi a 150 V costanti. Come *standard* di peso molecolare è stato usato il *kit* dell'*Amersham (GE Healthcare)*.

5.8 Determinazione della concentrazione proteica

Il grado di purezza e la concentrazione della proteina è stata valutata analizzando lo spettro di assorbimento. Le frazioni raccolte sono state analizzate allo spettrofotometro acquisendo lo spettro di assorbimento nell'intervallo di lunghezza d'onda 220-320 nm ed è stata valutata l'eventuale presenza di DNA.

Gli spettri sono stati acquisiti con lo spettrofotometro Cary 50 Bio UV/Vis (*Varian*) a disposizione in laboratorio ed i valori di assorbimento del campione a 260 nm e 280 nm sono stati utilizzati per calcolare il rapporto di assorbanza Abs280/Abs260. Questo valore, indice del grado di contaminazione da acidi nucleici, deve essere compreso tra 1.4 e 1.7 OD.

La concentrazione della proteina è stata determinata dal valore di assorbimento a 280 nm utilizzando la legge di *Lambert e Beer*. Il coefficiente di estinzione molare della pOBP è 13000 M⁻¹ cm⁻¹.

5.9 Spettroscopia di fluorescenza

La spettroscopia di fluorescenza è stata utilizzata allo scopo di valutare il corretto ripiegamento della proteina e la sua capacità di legare i ligandi selezionati, usando una sonda fluorescente estrinseca. Le misure sono state effettuate utilizzando lo spettrofluorimetro FP 8600 della Jasco, utilizzando una cuvetta di quarzo a quattro facce ottiche e settando il valore delle fenditura di eccitazione ed emissione a 2,5 e 5 nm rispettivamente. Il campione di pOBP (7 μ M) è stato eccitato alla lunghezza d'onda di 295 nm e l'emissione di fluorescenza è stata raccolta nell'intervallo di lunghezza d'onda 320-600 nm. L'intervallo di lunghezza d'onda e la velocità di scansione utilizzata nelle misure sono 1 nm e 100 nm/min rispettivamente. Al campione di pOBP sono state aggiunte concentrazioni crescenti [0.05-10 μ M] di 1-AMA disciolto in etanolo allo 0.01%.

5.10 Misure di Dicroismo circolare

Le misure sono state condotte su un campione omogeneo di pOBP 10 mM in Pbs pH 7.4, a temperatura crescente da 25°C ad 85°C ed in presenza di concentrazioni crescenti di benzene (0.1-10 μ M). Le misure sono state effettuate utilizzando lo spettropolarimetro *J-810 Jasco* equipaggiato con un bagnetto termostato (*Julabo F-25 MA Seelbach, Germany*). Lo strumento è stato calibrato con una soluzione standard di (+)-10-acido canfosolfonico. Sono state utilizzate cuvette con un cammino ottico di 0.1 cm (*Helma, Jamaica, NJ*). La finestra di emissione utilizzata è di 2nm, la velocità di scansione è di 100nm/min, la sensibilità del fotomoltiplicatore alta. Il voltaggio del fotomoltiplicatore nella regione dello spettro misurato non ha mai superato i 600 V. Ogni spettro è la media di cinque accumuli ed è stato livellato mediante il *software Spectropolarimeter*, versione 1.00. Le misure sono state condotte sotto flusso di azoto. I risultati sono espressi in termini di ellitticità molare.

5.11 Saggio competitivo fluorimetrico

Le medesime condizioni utilizzate per le misure di spettroscopia di fluorescenza sono state applicate per il saggio competitivo. Le molecole saggiate sono state disciolte in tampone Pbs pH 7.4, il benzene è stato testato in concentrazioni crescenti da 0.05 ad 8 μ M; il clorobenzene, il bifenile e il pentaclorobenzene (*Sigma-Aldrich*) in concentrazioni crescenti da 2 a 10 μ M. I dati raccolti sono stati analizzati mediante il *software OriginLab 8.0*.

5.12 Virtual screening docking: PyRx

La metodologia del *virtual screening* permette, mediante simulazioni di docking molecolare, di predire l'affinità di legame di numerosi ligandi nei confronti di una singola struttura proteica (*target*).

Tale metodologia è stata utilizzata per valutare l'affinità di legame di 136 inquinanti atmosferici nei confronti della struttura 1DZK, il software utilizzato è *PyRx* (Dallakyan S. et al., 2015) che utilizza gli algoritmi *Autogrid* ed *Autodock4.2* per la valutazione dell'energia libera di legame.

La struttura *target* 1DZK è stata caricata in *PyRx* in formato .pdb e mediante una funzione *built-in* del *software* è stata preparata per l'analisi. Le strutture tridimensionali relative agli inquinanti atmosferici sono state scaricate da *PubChem* in formato .sdf e caricate in *PyRx*, effettuata una minimizzazione energetica ed infine preparate, come ligandi, per l'analisi mediante una funzione *built-in*. I parametri utilizzati per la griglia sono: dimensione 98x70x88, risoluzione 0.375 Å. Per il *docking* è stato utilizzato l'algoritmo genetico *lamarckiano* con la generazione di 100 pose per ligando. I risultati sono organizzati in base alla minore energia libera di legame ed è possibile esportarli in un file formato *Excel*; inoltre, mediante interfaccia grafica, per ogni ligando è possibile valutare la posizione di *docking*.

5.13 Immobilizzazione covalente della pOBP su supporto di silicio

Il supporto di silicio utilizzato delle dimensioni di 18x18x0.13 mm (*Prestige*) è stato immerso in una soluzione di acido nitrico all'1% per 30 minuti ad 80°C, lavato estensivamente con acqua deionizzata ed asciugato sotto leggero flusso di azoto per 30 minuti. Successivamente è stato immerso in una soluzione di APTES al 10% a pH4 e riposto in stufa ad 80°C per 4 ore. La soluzione di APTES è stata rimossa e il supporto è stato lavato con acqua deionizzata, infine è stato riposto in stufa a 110°C per 15 ore. È stata preparata una soluzione di EDC 0.4 M/ NHS 0.1 M ad una concentrazione finale di 0,2 mg/mL di pOBP ed incubata per 30 minuti a temperatura ambiente; la soluzione è stata poi depositata sulla superficie del supporto di silicio per due ore a temperatura ambiente. I supporti sono poi stati immersi in tampone TBS (50mM tris-HCl, 150mM NaCl pH 7.5).

Il supporto è stato immerso in un tampone TBS all'1% di latte in polvere per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente, dopo una fase di lavaggio con tampone TBS il supporto è stato immerso in una soluzione di anticorpi primari anti pOBP alla concentrazione finale di 0,1 mg/mL ed incubato per 1 ora a 37°C.

Dopo tre lavaggi con tampone TBS il supporto è stato immerso in una soluzione di anticorpi secondari coniugati con perossidasi alcalina alla concentrazione finale di 0,1 mg/mL, ed incubati per 1 ora a 37°C. Infine, dopo un lavaggio con tampone TBS, sono stati aggiunti sulla superficie del vetrino 2 mL di luminolo (FEMTO S.I.C.) e valutata la chemiluminescenza prodotta mediante esposizione del supporto di silicio ad una lastra autoradiografica.

Bibliografia

Bibliografia

Bartsch S., Tschesche H. **1995**. Cloning and expression of human neutrophil lipocalin cDNA derived from bone marrow and ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* Jan 9; **357**(3):255-9.

Brownlow S., Morais Cabral J.H., Cooper R., Flower D.R., Yewdall S.J., Polikarpov I., North A.C., Sawyer L. **1997**. Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin; *Structure* Apr 15; **5**(4):481-95.

Campanella L. **1999**. Biosensori per il monitoraggio on line ed il controllo di processo, *ARS n. 65* Gennaio/Febbraio.

Chang D.T.H., Oyang, Y.J. and Lin, J.H. **2005**. MEdock: a web server for efficient prediction of ligand binding sites based on a novel optimization algorithm. *Nucleic Acids Res.*; **33**, W233–W238.

Clegg R., Murchie A., Zechel A., Lilley D. **1993**. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; **90**:2994–2998.

Dallakyan S., Olson A.J. **2015**. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol Biol.*; **1263**:243–250.

Darren R., Flower D.R. **1996**. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal.*; **318**:1-14.

D'Auria S., Nucci R., Rossi M., Gryczynski I., Gryczynski Z., Lakowicz J.R. **1999**. The beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 degrees C. *Biophys. Chem.* Sep 13; **81**(1):23-31.

David L. B., W. Chao, Annie Jarabek, Babasaheb S., Lawrence Valcovic, **1998**. *Carcinogenic Effects of Benzene: An Update EPA/600/P-97/001F* April

US EPA **2012**. Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. **4.1**. Jan, 2011. Available from, as of Mar 1,;).

Flower D.R. **1995**. Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J. Mol. Recognit.* May-Jun; **8**(3):185-95.

Flower D.R., Sansom C.E., Beck M.E., Attwood T.K. **1995**. The first prokaryotic lipocalins. *Trends Biochem. Sci.* Dec; **20**(12):498-9.

Bibliografia

Godovac-Zimmermann J. **1988**. The structural motif of beta-lactoglobulin and retinol-binding protein: a basic framework for binding and transport of small hydrophobic molecules. *Trends Biochem Sci. Feb*; **13**(2):64-6.

Goodsell D.S., Morris G.M. Olson A.J. **1996**. Automated docking of flexible ligands: applications of Autodock. *Mol. Recognit. J. Jan-Feb*; **9**(1):1-5.

Hansch C., Leo A., Hoekman D. **1995**. Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society; **39**(5), 1189-1190.

Jui-Chih Wang, Pei-Ying Chu, Chung-Ming Chen and Jung-Hsin Lin. **2012**. idTarget: a web server for identifying protein targets of small chemical molecules with robust scoring functions and a divide-and-conquer docking approach *Nucleic Acids Research*, **1** 1–7

Kmiecik D., Albani JR. **2010**. Effect of 1-aminoanthracene (1-AMA) binding on the structure of three lipocalin proteins, the dimeric β lactoglobulin, the dimeric odorant binding protein and the monomeric α 1-acid glycoprotein. *Fluorescence spectra and lifetimes studies. J. Fluoresc. Sep*; **20**(5):973-83.

Lide D.R. **2008**. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 3–32.

Mascini M., Moscone D., Palleschi G., Pilloton R. **1988**. In line determination of metabolites and milk components with electrochemical. *Biosensors, Analytica Chimica Acta*; (88) 101-11, vol **213** No 1-2.

Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S. and Olson A. J. **2009**. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*; **16**: 2785-91.

Mukherjee A.K., Chattopadhyay B.P., Roy S.K., Das S., Mazumdar D., Roy M., Chakraborty R., Yadav A. **2016**. Work-exposure to PM10 and aromatic volatile organic compounds, excretion of urinary biomarkers and effect on the pulmonary function and heme-metabolism: A study of petrol pump workers and traffic police personnel in Kolkata City, India. *J. Environ. Sci. Health A Tox Hazard Subst Environ. Eng. Jan 28*; **51**(2):135-149.

Paolini S., Tanfani F., Fini C., Bertoli E., Paolo Pelosi. **1999**. Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by fourier-transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta. Apr 12*; **1431**(1):179-88.

Pevsner J., Hou V., Snowman A.M., Snyder S.H. **1990**. Odorant-Binding Protein Characterization of Ligand Binding. *Journal of Biological Chemistry*; **265**:6118-6125.

Bibliografia

Polverini E., Lardi P., Mazzini A., T.Sorbi R., Virna C., Ramoni R., Favilla R., **2011**. Characterization of a Deswapped Triple Mutant Bovine Odorant Binding Protein, *International Journal of Molecular Sciences*; **12**:2294-2314.

Praet E., Reuter V., Gaillard T., Vassel J. **1995**. Bioreactors and biomembranes for biochemical oxygen demand estimation. *Trends in analytical chemistry*; vol. **14**, N. 7, 371-378.

Prati M.V., Costagliola M.A., Quaranta F., Murena F. **2015**. Assessment of ambient air quality in the port of Naples. *J. Air Waste Manag Assoc.* Aug; **65**(8):970-9.

Rappenglück B., Fabian P. **1998**. A study of BTEX-ratios in the urban area of Munich/Germany using rapid gas chromatography. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*; **5**(2):65-70.

Rechnitz G.A., Arnold M.A., Meyerhoff M.E. **1979**. Bio-selective membrane electrode using tissue slices. *Nature*, Mar 29; **278** (5703):466-7.

Rechnitz G.A., Ho M.Y. **1990**. Biosensors based on cell and tissue material. *J Biotechnol.* Aug; **15**(3):201-17.

Rogers K.R., Williams R.L. **1995**. Biosensors for environmental monitoring: a regulatory perspective; *Trends in analytical chemistry*; vol. **14**, N. 7, 289-294.

Singh R.K., Bansode F.W. **2011**. Benzene-induced histopathological changes and germ cell population dynamics in testes of Sprague Dawley rats. *J. Environ. Biol.* Nov; **32**(6):687-94.

Spinelli S., Ramoni R., Grolli S., Bonicel J., Cambillau C., Tegoni M. **1998**. The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry*, Jun 2; **37**(22):7913-8.

Staiano M., D'Auria S., Varriale A., Rossi M., Marabotti A., Fini C., Stepanenko O.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. **2007**. Stability and dynamics of the porcine odorant-binding protein. *Biochemistry*, Oct 2; **46**(39):11120-7.

Stepanenko O.V., Marabotti A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Fini C., Varriale A., Staiano M., Rossi M., D'Auria S. **2008**. Hydrophobic interactions and ionic networks play an important role in thermal stability and denaturation mechanism of the porcine odorant-binding protein. *Proteins*, Apr; **71**(1):35-44.

Tegoni M., Campanacci V., Cambillau C. **2004**. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem. Sci.* May; **29**(5):257-64.

Laemmli U.K. **1970**. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 - 685.

US EPA **2012**. Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. **4.1**. Jan, 2011. Available from, as of Mar 1.

Bibliografia

Vincent F., Ramoni R., Spinelli S., Grolli S., Tegoni M., Cambillau C. **2004**. Crystal structures of bovine odorant-binding protein in complex with odorant molecules. *Eur. J. Biochem.*, Oct; **271**(19):3832-42.

Vincent F., Yates D., Garman E., Davies G.J., Brannigan J.A. **2003**. The three-dimensional structure of the N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, NagA, from *Bacillus Subtilis*: a member of the urease superfamily. *J. Biol. Chem.*, 2004 Jan 23; **279**(4):2809-16.

Yapici I., Lee K.S., Berbasova T., Nosrati M., Jia X., Vasileiou C., Wang W., Santos E.M., Geiger J.H., Borhan B. **2015**. "Turn-on" protein fluorescence: in situ formation of cyanine dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, Jan 28; **137**(3):1073-80.

Zagalsky P.F., Wright C.E., Parsons M. **1995**. Crystallisation of alpha-crustacyanin, the lobster carapace astaxanthin-protein: results from EURECA. *Adv. Space Res.*; **16**(8):91-4.

