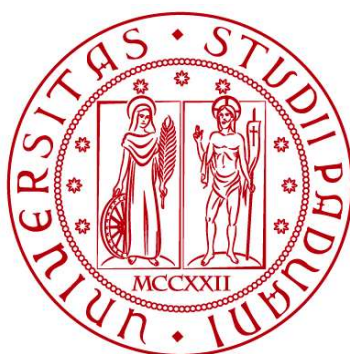


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**PRODUZIONE ETEROLOGA DELL'ENZIMA MITOCONDRIALE
UMANO HPDL E ANALISI BIOINFORMATICA DELLA
MUTAZIONE G50D IMPLICATA NELLA PATOLOGIA
NEDSWMA**

Tutor: Prof. Gabriele Giachin

Dipartimento di Scienze Chimiche

Laureanda: Lisa Dao

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

ABSTRACT

L'obiettivo di questa tesi è presentare una procedura sperimentale che ottimizzi le condizioni per la produzione in *Escherichia coli* dell'enzima mitocondriale umano HPDL (*4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like protein*, UniProt ID: Q96IR7). Questo studio prende parte a un progetto più ampio di caratterizzazione fisico-chimica della proteina HPDL, avviato dal laureando magistrale patavino Gianmarco Paloscia. HPDL è di grande interesse medico poiché, nonostante la struttura e la funzione siano ancora sconosciute, diverse varianti alleliche, inclusa la mutazione omozigote G50D, sono state isolate in pazienti affetti dalla rara patologia neurodegenerativa pediatrica NEDSWMA (*Neurodevelopmental Disorder with Progressive Spasticity and Brain White Matter Abnormalities*). Le tecniche di laboratorio utilizzate includono: la PCR per il clonaggio senza enzimi di restrizione (*Restriction Free Cloning*, RFC), l'elettroforesi su gel di agarosio per la valutazione qualitativa dei prodotti di PCR, l' SDS PAGE associata a colorazione di gel di poliacrilamide e western blot (WB) per stimare la quantità di proteine ricombinanti prodotte. L'acquisizione delle immagini dei gel e della membrana immobilizzata con anticorpi è stata eseguita mediante sistemi automatici. Infine, le strutture di HPDL *wild type* e con la mutazione G50D sono state predette utilizzando l'algoritmo *AlphaFold Server* e visualizzate con il software *ChimeraX*.

SOMMARIO

1. STATO DELL'ARTE	1
1.1 SINTESI E CATABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI AROMATICI (AAA).....	1
1.2 FUNZIONE ENZIMATICA DI HPDL E SUO COINVOLGIMENTO NELLA SINDROME NEDSWMA	2
1.3 SCOPO DELLA TESI.....	4
2. MATERIALI E METODI	4
2.1 I VETTORI DI ESPRESSIONE PROCARIOTICI pET	4
2.2 TEST DI ESPRESSIONE DI HPDL <i>TRONCATA</i> IN pET-21d(+).....	5
2.2.1 SDS PAGE	6
2.2.2 COLORAZIONE CON COOMASSIE BRILLIANT BLUE (CBB) G-250	6
2.2.3 WESTERN BLOT SEMI-DRY.....	6
2.3 SOLUBILITY ASSAY	7
2.4 CLONAGGIO SENZA ENZIMI DI RESTRIZIONE (RFC) di HPDL <i>TRONCATA</i> IN pET SUMO	8
2.4.1 PCR 1	9
2.4.2 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO	9
2.4.3 PCR 2 E DIGESTIONE CON <i>DpnI</i>	10
2.4.4 TRASFORMAZIONE BATTERICA.....	10
2.5 PREDIZIONI STRUTTURALI CON ALPHAFOLD SERVER E CHIMERAX	11
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	12
3.1 TEST DI ESPRESSIONE: COLORAZIONE CON CBB-G250 E WESTERN BLOT	12
3.2 SOLUBILITY ASSAY: COLORAZIONE CON CBB-250 E WESTERN BLOT	13
3.3 RESTRICTION FREE CLONING	13
3.4 PREDIZIONI STRUTTURALI	14
4. CONCLUSIONE	16
5. MATERIALI SUPPLEMENTARI	17
5.1 VARIANTI ALLELICHE DI HPDL ISOLATE IN PAZIENTI AFFETTI DA NEDSWMA....	17
5.2 CLONAGGIO SENZA ENZIMI DI RESTRIZIONE.....	17
5.2.1 PRINCIPIO DELLA RFC	17
5.2.2 PRIMER PCR 1	17
5.2.3 PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE ATTESO DA PCR 1	18
6. BIBLIOGRAFIA	19

1. STATO DELL'ARTE

1.1 SINTESI E CATABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI AROMATICI (AAA)

Tirosina, fenilalanina e triptofano sono tre amminoacidi aromatici (AAA) fondamentali per la sintesi proteica degli organismi viventi. Come suggerisce la classe amminoacidica di appartenenza, tutti e tre sono accomunati dalla presenza di un anello benzenico: la fenilalanina contiene un gruppo fenilico, la tirosina un gruppo 4-idrossifenilico e il triptofano un anello indolo eterociclico. Negli animali, fenilalanina e triptofano sono amminoacidi essenziali, quindi devono essere assimilati con la dieta. La tirosina, invece, viene in parte assimilata con la dieta ma può essere sintetizzata per via endogena dall'enzima fenilalanina idrossilasi (PAH) che catalizza l'idrossilazione della fenilalanina, trasformandola in tirosina. Nei mammiferi, il 90% del catabolismo del triptofano segue la "via della chinurenina" (Figura 1). Il catabolismo della fenilalanina segue quello della tirosina (Figura 2). Inizialmente, la tirosina viene convertita in 4-idrossifenilpiruvato ad opera della tirosina aminotransferasi (TAT). Questo composto viene ossidato in acido omogentisico (HGA) dalla 4-idrossifenilpiruvato diossigenasi (HPD). L'omogentisato viene ossidato dalla omogentisato diossigenasi (HGD) a 4-malilacetato e isomerizzato dalla malilacetato isomerasi (MAI) a fumarilacetato. La fase finale del catabolismo della tirosina prevede la scomposizione del fumarilacetato in fumarato e acetoacetato ad opera del fumarilacetato idrolasi (FAH). Negli animali, i metaboliti secondari derivati dalla tirosina e dal triptofano hanno importanti funzioni fisiologiche. Il triptofano è

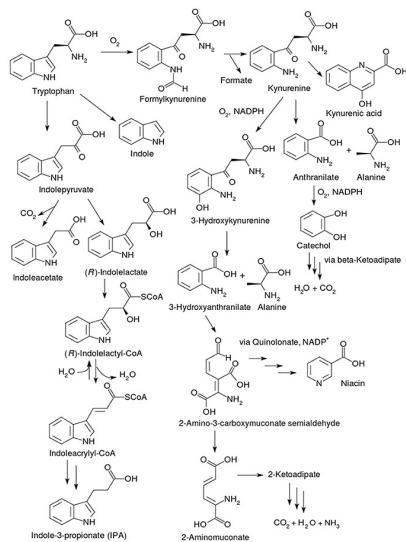


Figura 1

Catabolismo del triptofano e via di sintesi della niacina (vitamina B3). La "via della chinurenina" è un processo che avviene principalmente nel fegato tramite l'intermedio 3-idrossiantranilato e in parte nel cervello, attraverso l'acido chinurenico.

Modificato da: Anuthaman Parthasarathy *et al.* (2018).

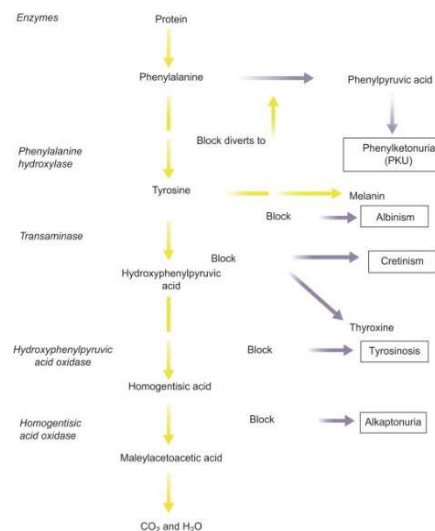


Figura 2

Catabolismo della fenilalanina e della tirosina con punti di blocco enzimatici che causano specifiche patologie: fenilchetonuria, albinismo, cretinismo, tirosinemia e alcaptonuria.

Modificato da: Gerald Litwack Ph.D. (2018).

precursore dei neurotrasmettitori serotonina e melatonina, fondamentale nella regolazione del ritmo circadiano. Inoltre, nella “via della chinurenina”, il triptofano viene convertito in 3-idrossiantranilato, un precursore della niacina (vitamina B3). La tirosina è implicata nella formazione dei neurotrasmettitori catecolamine (dopamina, noradrenalina e adrenalina), dei pigmenti melaninici e degli ormoni tiroidei. Alterazioni nel metabolismo degli amminoacidi aromatici hanno spesso effetti neurotossici. Per esempio, difetti nel catabolismo del triptofano sono implicati in malattie neurologiche quali la malattia di Huntington e la malattia di Alzheimer. La fenilchetonuria, causata da un deficit di PAH e dunque accumulo di fenilalanina, può portare a ritardo mentale nei neonati. Infine, la tirosinemia è un disturbo metabolico autosomico recessivo causato da un difetto genico in uno degli enzimi del catabolismo della tirosina e correlato a deficit neurologici. A seconda dell’enzima interessato, la tirosinemia è classificata in: tirosinemia di tipo I (HT1; OMIM #276700), causata da una carenza della fumarilacetoacetato idrolasi; tirosinemia di tipo II (HT2; OMIM #276600), causata da un deficit della tirosina aminotransferasi e tirosinemia di tipo III (HT3; OMIM #276710), il tipo più raro di tirosinemia, provocato da una carenza della 4-idrossifenilpiruvato diossigenasi (Figura 2).

1.2 FUNZIONE ENZIMATICA DI HPDL E SUO COINVOLGIMENTO NELLA SINDROME NEDSWMA

La NEDSWMA, *Neurodevelopmental disorder with progressive spasticity and brain white matter abnormalities* (OMIM #619026), è una malattia rara autosomica recessiva ad esordio infantile caratterizzata da manifestazioni fenotipiche con gravità variabile ed evoluzione progressiva. Si tratta di una malattia associata sia ad alterazioni psicomotorie che ad anomalie strutturali del cervello, quali microcefalia e scarsa mielinizzazione della sostanza bianca cerebrale. In diversi pazienti affetti da NEDSWMA sono state isolate varianti alleliche a livello del gene HPDL (Figura 3 e Tabella 1 in Paragrafo 5.1). La sequenza genica di HPDL condivide il 44% di identità con il gene HPD di cui rappresenta l’unico paralogo nei mammiferi. Il gene

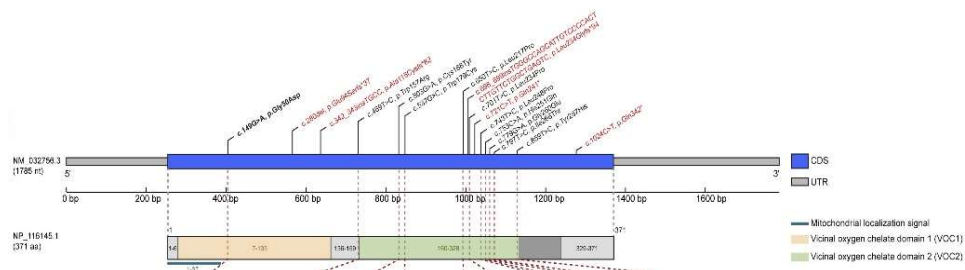


Figura 3
Struttura genica di HPDL e predizione della struttura della proteina codificata con putativi domini VOC e putativo segnale di localizzazione mitocondriale. La variante ricorrente Gly50Asp è mostrata in grassetto. Sono messi in evidenza: la CDS, sequenza codificante e l’UTR, regione non tradotta. Modificato da: Husain Ralf A. *et al.* (2020).

HPD è composto da 14 esoni e codifica l'enzima 4-idrossifenilpiruvato diossigenasi, principalmente nell'isoforma lunga 393 amminoacidi (44.9 kDa). HPD è una ossidoreduttasi non eme ferro-dipendente che catalizza il secondo dei quattro stadi del catabolismo della tirosina. È un membro della superfamiglia dei *vicinal oxygen chelate* (VOC) metallo-enzimi; infatti, presenta come motivo strutturale la piega VOC, schematicamente descrivibile come una sequenza di un β foglietto e di una α -elica seguita da tre filamenti β o motivo $\beta\alpha\beta\beta$. Queste strutture secondarie si organizzano a formare un β -barrel non completamente chiuso attorno a uno ione ferro, Fe(II)^1 , che partecipa alle reazioni redox catalizzate da HPD, tra cui l'ossidazione del 4-idrossifenilpiruvato ad acido omogentisico (Paragrafo 1.1). Il gene HPDL codifica, invece, per la proteina simil-4 idrossifenilpiruvato diossigenasi (o *4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like protein*, UniProt ID: Q96IR7) che si è scoperto essere elevatamente espressa nel sistema nervoso centrale (Husain R.A. *et al.*, 2020), rendendo le varianti alleliche isolate potenzialmente patogene. A dispetto del nome, HPDL possiede una funzione non ben caratterizzata e struttura tridimensionale ignota. Studi di genetica molecolare hanno isolato come variante a maggiore frequenza la transizione omozigote c.149G-A, tradotta nella mutazione G50D e localizzata nel putativo dominio VOC 1 (Figura 3). Questo suggerisce che la mutazione G50D potrebbe avere un ruolo cruciale nella patogenesi della NEDSWMA. Le analogie di sequenza tra i geni HPD e HPDL e l'interessante struttura a singolo esone di HPDL hanno spinto la comunità scientifica ad approfondire le eventuali relazioni morfo-funzionali tra i prodotti di espressione HPD e HPDL. Sono però state identificate differenze significative; la principale riguarda la localizzazione cellulare, mitocondriale per HPDL e citosolica per HPD. Inoltre, a livello della sequenza amminoacidica predetta di HPDL è stato isolato un putativo peptide di localizzazione mitocondriale (*mitochondrial localization signal* o *mitochondrial targeting peptide*, Figura 3) nella regione N-terminale dell'enzima, comprensivo dei residui 1-37. Questa previsione suggerisce che HPDL potrebbe svolgere funzioni specifiche all'interno dei mitocondri, differenziandosi così da HPD. In particolare, HPDL potrebbe agire come una proteina *moonlighting*, cioè una proteina con più di una funzione biochimica. Per esempio, esperimenti biochimici rivelano come HPDL sia coinvolto in una via "non canonica" del catabolismo della tirosina (Figura 4). Infatti, è stato verificato come HPDL produca l'intermedio 4-idrossimandelato (4-HMA) derivato dalla tirosina, che a differenza dell'HGA, prodotto da HPD, è coinvolto nella biosintesi del Coenzima Q10 (CoQ10) (Banh, 2021). Coerentemente con questo, studi su cellule HPDL-*knockout* evidenziano una riduzione, anche se piccola, del consumo di ossigeno, suggerendo quindi una alterazione del metabolismo

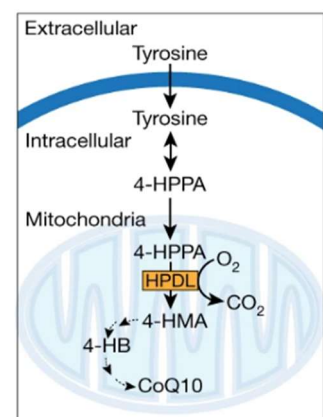


Figura 4
Putativa funzione catalitica di HPDL. Modificato da: Banh, R.S., *et al.* (2021).

¹ (II) indica lo stato di ossidazione +2 del ferro

mitocondriale (Gosh, 2021). Non da ultimo, livelli elevati di HPDL sono stati relegati alla sopravvivenza e crescita di tumori PDAC, suggerendo una potenziale azione mitogena in contesti oncogenici (Banh, 2021).

1.3 SCOPO DELLA TESI

L'esperienza qui descritta si inserisce nel progetto di clonaggio di HPDL *full length* (residui 1-371) avviato dal laureando magistrale in biotecnologie industriali Gianmarco Paloscia presso il DiSC dell'Università di Padova. L'obiettivo di questa tesi è delineare una procedura sperimentale per produrre la proteina HPDL *troncata* (residui 38-371) al fine di verificare se il putativo *mitochondrial localization signal* influenzi l'espressione della proteina HPDL in *E. coli*. Sono stati condotti due esperimenti principali. Il primo ha esaminato l'espressione eterologa e la solubilità di HPDL priva dei 37 residui o *troncata*. Il secondo ha avviato una strategia di clonaggio che porta alla produzione della proteina HPDL *troncata* fusa con la sequenza SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier), proteina che facilita il corretto *folding*, aumenta la solubilità e favorisce l'espressione di proteine eterologhe in *E. coli*.

2. MATERIALI E METODI

2.1 I VETTORI DI ESPRESSIONE PROCARIOTICI pET

Nell'esperienza di laboratorio sono stati utilizzati due plasmidi della serie pET: pET-21d(+) (Novagen, Figura 5) e Champion™ pET SUMO (Thermo Fisher Scientific™, Figura 6). Si tratta di vettori di espressione ampiamente utilizzati per la produzione di proteine ricombinanti in *E. coli*. In entrambi i vettori è presente il sistema di espressione *lac*, formato dal repressore *lacI* che blocca la trascrizione in assenza di IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside). Il *6xHis tag*, contenuto in entrambi i vettori, localizza all'N-terminale nelle proteine espresse da pET SUMO, mentre al C-terminale nei prodotti di espressione di pET-21d(+). Questo *tag* è composto da 6 residui di istidina consecutivi (HHHHHH) ed è riconosciuto come epitopo da anticorpi anti-His tag. Permette, quindi, l'identificazione della proteina ricombinante con WB e la sua purificazione mediante cromatografia di affinità con metalli immobilizzati (Ni²⁺-NTA).

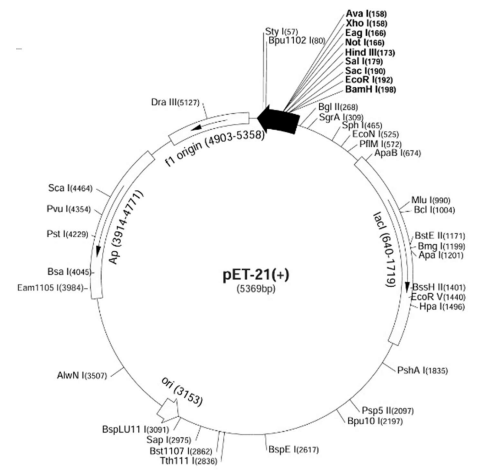


Figura 5
pET-21(+), vettore da cui deriva la variante pET-21d(+). Modificato da: Novagen (1998) *pET-21(+)* Vector (TB063 12/98).

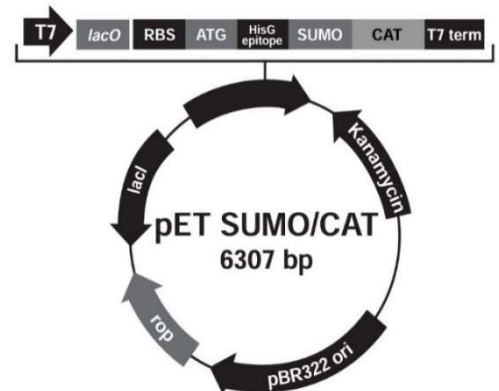


Figura 6
pET SUMO/CAT, vettore da cui deriva la variante Champion™ pET SUMO. Modificato da: Thermo Fisher Scientific™. (2010).

2.2 TEST DI ESPRESSIONE DI HPDL TRONCATA IN pET-21d(+)

I test di espressione sono stati realizzati per comprendere come e se l'espressione della proteina HPDL *troncata* in *E. coli* sia influenzata dalla concentrazione di IPTG e dalla temperatura a cui i batteri sono fatti crescere. Con sequenziamento Sanger (*Eurofins Genomics*) è stata verificata la presenza del costrutto *pET-21d (+):HPDL troncata* nelle cellule BL21 (DE3) (*Thermo Scientific*TM, “BL21(DE3) Competent cells”, #EC0114) cresciute su terreno selettivo dopo trasformazione. Con un'ansa sterile, sono state prelevate da piastra 2-3 colonie positive al sequenziamento. Sono state inoculate in 50 mL di LB² addizionato con ampicillina (100 µg/mL), fatte crescere a 37 °C, O/N (over-night) e sotto forte agitazione. Quindi, dai 50 mL di coltura satura sono stati prelevati 5 mL e inoculati in 95 mL di LB addizionato con ampicillina (100 µg/mL). I 100 mL sono stati incubati a 37 °C e ogni 30 minuti è stata realizzata la misurazione dell'OD_{600nm} con “Ultraspec 10 Cell Density Meter”, *Amersham Biosciences*. Raggiunta l'OD_{600nm} pari a 0.6, è stato prelevato un volume campione e trasferito in una Eppendorf. Quindi centrifugato a 15000 g, per 5 minuti a 4 °C. Il pellet è stato conservato a -21 °C (*condizione pre-IPTG*, Paragrafo 2.2.1). 90 mL sono stati aliquotati in 9 Falcon in volumi da 10 mL.

Tabella 2

“N” sono le 9 Falcon considerate. “X” è il volume che è stato prelevato e trasferito in Eppendorf. “OD_{600nm} exp” è stato ricavato post-incubazione per ciascuna delle 9 Falcon. “OD_{600nm} theo” è il valore di densità ottica che si vuole raggiungere. È stata applicata la formula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. Dove $C_i = OD_{600nm} \text{ exp}$; $V_i = X$; $V_f = 1 \text{ mL}$; $C_f = OD_{600nm} \text{ theo} = 0.6$.

N	X (µL)	OD _{600nm} exp	OD _{600nm} theo	T (°C)	IPTG (mM)
1	240.00	2.50	0.60	20	0.50
2	315.79	1.90	0.60	20	0.75
3	333.33	1.80	0.60	20	1.00
4	500.00	1.20	0.60	30	0.50
5	500.00	1.20	0.60	30	0.75
6	400.00	1.50	0.60	30	1.00
7	461.54	1.30	0.60	37	0.50
8	500.00	1.20	0.60	37	0.75
9	600.00	1.00	0.60	37	1.00

Con tre concentrazioni di IPTG, 0.5, 0.75 e 1.0 mM, è stata indotta l'espressione di HPDL *troncata*. Quindi, ciascuna delle 3 concentrazioni è stata incubata a tre diversi valori di temperatura: 20, 30 e 37 °C, O/N. Dopo l'incubazione, sono stati prelevati da ciascuna delle 9 Falcon i volumi necessari per avere un valore OD_{600nm} di 0.6³ (Tabella 2). Quindi, sono stati trasferiti in 9 Eppendorf, centrifugate per 5 minuti a 5000 g (*condizioni test*, Paragrafo 2.2.1). I volumi residui delle 9 Falcon sono stati centrifugati a 5000 g per 15 minuti a 4 °C, il pellet è stato conservato a -21 °C (*condizioni test*, Paragrafo 2.3).

² Protocollo “Luria Bertani (LB) + Amp and Tet”, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014.

³ 1 OD_{600nm} corrisponde a 8×10^8 cellule/mL. L'OD_{600nm} è utilizzata per analizzare la crescita batterica, la fase *log* di crescita è fatta corrispondere ai valori OD_{600nm} compresi tra 0.6 e 1. È stato qui scelto il valore OD_{600nm} pari a 0.6 per accertarsi che le colonie fossero appena entrate nella fase *log* e per rendere comparabili le quantità di cellule presenti nella *condizione pre-IPTG* e nelle *condizioni test*.

2.2.1 SDS PAGE

Il pellet della *condizione pre-IPTG* e i pellet delle 9 Eppendorf delle *condizioni test* sono stati risospesi in 20 μL di 1X *Tris-Glycine-SDS* (TGS) Buffer (da stock “10X TGS”, *Bio-Rad*) e 30 μL di *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) loading buffer (protocollo “4X SDS Sample Loading Buffer for Western Blotting”, *MilliporeSigma*, 2024).

Per indurre la lisi batterica, i pellet sono stati incubati a 98 °C per 7 minuti in *thermoblock* (“Digital Dry Baths”, *Labnet AccuBlock™*). È stato realizzato un SDS PAGE⁴, caricando due gel prefabbricati (“Tris-Glycine Precast Gels”, *NuSep*) nell’apposita vaschetta, riempita con 1X TGS Buffer (da stock “10X TGS”, *Bio-Rad*). In ciascun gel sono stati caricati 5 μL dei 10 campioni (*condizioni test* e *condizione pre-IPTG*) e 10 μL di marker (“Precision Plus Protein Unstained Standards”, *Bio-Rad*).

L’ordine di caricamento è riportato in Tabella 3. L’alimentatore elettrico è stato impostato inizialmente a 120 mV per 5 minuti, per favorire l’ingresso uniforme dei campioni nei pozzetti e infine a 170 mV.

Tabella 3

Ordine di caricamento dei due gel di SDS PAGE. Vengono specificate la temperatura e la concentrazione di IPTG di ciascuna *condizione test* presa in esame. Alla *condizione pre-IPTG* non è stato aggiunto IPTG e non è stata incubata O/N.

Lane 1	Lane 2	Lane 3
pre-IPTG	Precision plus protein standards Unstained	20 °C/0.5 mM IPTG
Lane 4	Lane 5	Lane 6
20 °C/0.75 mM IPTG	20 °C/1 mM IPTG	30 °C/0.5 mM IPTG
Lane 7	Lane 8	Lane 9
30 °C/0.75 mM IPTG	30 °C/1 mM IPTG	37 °C/0.5 mM IPTG
Lane 10	Lane 11	Lane 12
37 °C/0.75 mM IPTG	37 °C/1.0 mM IPTG	Vuota

2.2.2 COLORAZIONE CON COOMASSIE BRILLIANT BLUE (CBB) G-250

Il primo gel è stato sottoposto a colorazione con Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250⁵. Il gel è stato adagiato in una vaschetta e lavato 3 volte per 5 minuti con acqua deionizzata. È stato aggiunto il CBB G-250 fino a sommergere interamente il gel. Per favorire la colorazione, la vaschetta è stata riscaldata per 1 minuto a massima potenza in microonde. Il gel è stato incubato O/N sotto agitazione, quindi lavato per 30 minuti con acqua deionizzata. L’acquisizione dell’immagine è stata realizzata con “iBright CL750 Imaging System”, *Invitrogen™*.

2.2.3 WESTERN BLOT SEMI-DRY

Il secondo gel è stato sottoposto a WB con il metodo di *transfer* elettroforetico *semi-dry*. Per la realizzazione del WB, sono stati utilizzati filtri e membrane di nitrocellulosa prefabbricati (“Power Blotter Pre-cut Membranes and Filters”,

⁴ L’SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) è una tecnica di separazione elettroforetica applicata alle proteine che impiega l’SDS, agente che denatura e conferisce una carica netta negativa alle sequenze amminoacidiche e un gel di poliacrilammide, matrice altamente reticolata che si genera per reazione tra acrilammide e bis-acrilammide.

⁵ Seguendo il protocollo “Staining of Proteins in Gels with Coomassie Brilliant Blue G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid”, *Jove*, 2009,

*Thermo Scientific*TM). I reagenti necessari sono stati preparati seguendo il protocollo “Western Blotting (Primary Ab Incubation In Milk)”, *Cell Signaling Technology*, 2005. L’*electrotransfer* è stato realizzato con il “Power Blotter XL System”, *Invitrogen*TM. Siccome il costrutto *pET-21d(+):HPDL troncata* produce una proteina di fusione HPDL *troncata* con *6xHis tag* al C-terminale, la membrana di nitrocellulosa è stata incubata con l’anticorpo anti-His tag “6xHis tag Polyclonal Antibody, HRP”, *Invitrogen*TM, diluito 1: 5.000 e lasciato incubare a 4 °C O/N. L’incubazione con anticorpo secondario con perossidasi di rafano (*Horse radish peroxidase*, HRP)-coniugato non è stata necessaria dato che il “6xHis tag Polyclonal Antibody, HRP” contiene già HRP. La matrice di nitrocellulosa è stata quindi lavata per 5 minuti con 15 mL di 1X Tris Buffered Saline, 0.1% Tween-20 (TBS/T). Sulla membrana di nitrocellulosa sono stati distribuiti 10 mL di soluzione “SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate”, *ThermoScientific*TM (5 mL di *Luminol/Enhancer* e 5 mL di *Stable Peroxide*). Il segnale di chemiluminescenza è stato rilevato esponendo la matrice a “iBright CL750 Imaging System”, *Invitrogen*TM. Il peso molecolare atteso di HPDL *troncata* è di 35.3 kDa; quindi, è stata utilizzata come riferimento la banda del marker a 37 kDa.

2.3 SOLUBILITY ASSAY

Il *solubility assay* o test di solubilità è stato realizzato per comprendere se la proteina HPDL *troncata* è solubile in *E. coli*, quindi conservata nel citoplasma batterico o insolubile, quindi compartimentalizzata nei corpi di inclusione⁶. I pellet delle *condizioni test* risultate positive a WB nel test di espressione e conservati a -21 °C in provette Falcon (vedi Paragrafo 2.2), sono stati scongelati in ghiaccio e risospesi in 5 mL di *lysis buffer*⁷, quindi riposti in ghiaccio. Con *French Press* (“French Pressure Cell Press Model FA-078 With Pressure Cell 3”, *Thermo Spectronic*, pressione: 15000 psi) è stato ottenuto il lisato cellulare dai pellet e conservato in Falcon in ghiaccio. 2 mL di ciascun lisato cellulare sono stati trasferiti in Eppendorf e centrifugati per 45 minuti a 4 °C a massima velocità. Per l’analisi delle proteine solubili, è stato prelevato il surnatante e conservato in Eppendorf. Per promuovere la concentrazione delle proteine presenti, le Eppendorf sono state incubate a 100 °C per 30 minuti in *thermoblock* (“Digital Dry Baths”, *Labnet AccuBlock*TM). Quindi, sono state centrifugate a 5000 g per 2 minuti. Il pellet ottenuto, *pellet proteico*, è stato risospeso in 10 µL di 1X TGS Buffer⁸ e 10 µL di SDS loading buffer⁹. Per l’analisi delle proteine insolubili, è stato risospeso il pellet ottenuto dal lisato cellulare, *pellet batterico*, in 20 µL di 1X TGS Buffer⁸ e 30 µL di SDS loading buffer⁹. Le soluzioni sono state centrifugate a massima velocità per 5 minuti.

⁶Aggregati intracellulari di proteine non foldate.

⁷ Soluzione di 25 mM di HEPES, 250 mM di NaCl, 20 mM di imidazololo. 0.2 % di TWEEN e corretta a pH di 7.8. Addizionata con un frammento di DNasi, “DN25-100MG”, *Sigma-Aldrich* e 2 pastiglie di cocktail di inibitori di proteasi, “cOmpleteTM, Mini, EDTA-free”, *Roche*.

⁸ Per la soluzione fare riferimento al Paragrafo 2.2.1

⁹ Per la soluzione fare riferimento al Paragrafo 2.2.1

Entrambi i saggi sono stati eseguiti con le tecniche biochimiche precedentemente descritte (Paragrafi 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3). Sono stati allestiti due gel, *gel 1* e *gel 2* per l'SDS-PAGE. Il *gel 1* è stato sottoposto a colorazione con CBB G-250 e sono stati caricati: 4 µL di *pellet batterico*, 7 µL di *pellet proteico* e 10 µL di marker¹⁰. Il *gel 2* è stato sottoposto a WB e sono stati caricati 4 µL di *pellet batterico*, 10 µL di *pellet proteico* e 10 µL di marker (Tabella 4). La banda del marker a 37 kDa è stata utilizzata come riferimento approssimativo per la banda di HPDL *troncata*, attesa a 35.3 kDa.

Tabella 4

Ordine di caricamento dei due gel di SDS PAGE. Vengono specificate la temperatura e la concentrazione di IPTG di ciascuna *condizione test* presa in esame. pP indica il *pellet proteico* e pB indica il *pellet batterico*.

Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8
Vuota	Precision plus protein standards Unstained	pP 37 °C/0.5 mM IPTG	pB 37 °C/0.5 mM IPTG	pP 37 °C/0.75 mM IPTG	pB 37 °C/0.75 mM IPTG	pP 37 °C/1 mM IPTG	pB 37 °C/1 mM IPTG

2.4 CLONAGGIO SENZA ENZIMI DI RESTRIZIONE (RFC) di HPDL TRONCATA IN pET SUMO

Il clonaggio senza enzimi di restrizione (*Restriction Free Cloning/ RFC*) è una tecnica di clonaggio che permette di inserire frammenti di DNA in un vettore (*destination vector*) utilizzando due reazioni di PCR, seguite da una digestione con l'enzima *DpnI*. La prima reazione di PCR (PCR 1) permette l'amplificazione del *megaprimer*, mentre la seconda reazione di PCR (PCR 2) consente l'inserzione e il clonaggio del costrutto di interesse nel *destination vector* mediante amplificazione. Il *megaprimer* è una sequenza di DNA composta da due regioni esterne, complementari alle *flanking regions* del *destination vector*, pET SUMO nell'esperienza qui presentata, e una regione interna contenente la sequenza genica del costrutto di interesse, HPDL *troncata* nel caso qui presentato. La fase di digestione con *DpnI*, enzima ad attività metilnucleasica, è necessaria per degradare la popolazione di plasmidi parentali metilati, prodotti nei batteri e non processati mediante PCR, purificando così i plasmidi amplificati che potenzialmente contengono l'inserito di interesse. Rispetto alle tecnologie convenzionali di clonaggio, che impiegano minimo cinque enzimi (due enzimi di restrizione, una fosfatasi, una DNA ligasi e una DNA polimerasi termostabile), la RFC utilizza due soli enzimi, una DNA polimerasi termostabile e l'enzima *DpnI*. Questo riduce la complessità del sistema e il tasso di errori, conservando con maggiore probabilità la sequenza del DNA ricombinante. Tuttavia, nella RFC viene promossa una amplificazione lineare dell'intero plasmide anziché esponenziale; pertanto, la

¹⁰ Per il marker fare riferimento al Paragrafo 2.2.1

quantità di DNA ricombinante prodotta è inferiore rispetto a quella ottenuta con il clonaggio tradizionale (vedi Paragrafo 5.2.1).

2.4.1 PCR 1

È stata realizzata una *miniprep* (con il kit “NucleoSpin Plasmid EasyPure, Mini kit for easy plasmid DNA purification”, *Macherey-Nagel*) delle cellule BL21(DE3) (“BL21(DE3) Competent Cells”, *Thermo Scientific*TM) trasformate con il costrutto *pET-21d(+):HPDL full length* (residui 1-371) e positive al sequenziamento Sanger (*Eurofins Genomics*). Lo stock plasmidico (concentrazione di 109,7 ng/μL, ottenuta con *Nanodrop*, *Thermo Scientific*TM) è stato utilizzato come *template* per amplificare il *megaprimer*. I primer sono stati disegnati con il software *RF-Cloning.org* (www.rf-cloning.org). Il primer *forward* è composto da una sequenza complementare a una regione interna alla *coding sequence* (CDS) del gene *HPDL full length* e da una sequenza complementare alla 5' *flanking region* del *destination vector* (*HPDL_4_fw*, Paragrafo 5.2.2); il primer *reverse* è composto da una sequenza complementare alla regione 3' di *HPDL full length* e una sequenza complementare alla 3' *flanking region* del *destination vector* (*HPDL_3_rv*, Paragrafo 5.2.2). Sono state allestite 3 reazioni identiche da 50 μL (150 μL totali). Per le quantità di reagenti di PCR è stato seguito il protocollo “Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)” della *NEB* (sono stati utilizzati: 5X Phusion Buffer GC e DMSO). La Tabella 5 riporta le condizioni utilizzate in termociclatore.

Tabella 5

Seguendo le linee guida del “PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)”, *NEB* sono state apportate delle modifiche alle condizioni di reazione in termociclatore consigliate. Per ottimizzare la temperatura di *annealing* è stato utilizzato il software *NEB Tm Calculator*. Alla temperatura ottimale consigliata, 72 °C, si è preferito scegliere una temperatura inferiore, di 69 °C, siccome i primer utilizzati sono ricchi in GC ed è stato utilizzato il reagente DMSO.

FASE	TEMP	TEMPO
Denaturazione iniziale	98 °C	3 minuti
30 cicli (anziché 33)	98 °C	30 secondi
	69 °C	30 secondi
	72 °C	45 secondi
Estensione finale	72 °C	7 minuti
Conservazione	4 °C	Inf.

2.4.2 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

È stata allestita una elettroforesi su gel di agarosio 1%¹¹. 25 μL di una delle tre reazioni di PCR sono stati addizionati con 4 μL di loading dye (“Gel Loading Dye, Purple 6X”, *NEB*). Sono stati caricati 7 μL di marker (“SharpMass 1 kb plus-Ready-to-load DNA Ladder”, *Euroclone*) e 28 μL di campione. La sequenza del *megaprimer* è stata progettata in modo da comprendere una regione interna contenente la sequenza codificante *HPDL troncata* e due regioni esterne

¹¹ 0.7 g di agar disciolto in 70 mL di Tris-acetate-EDTA (TAE) 10X e addizionato con 3.5 μL di “Euro Safe Nucleic Acid Staining Solution”, *Euroclone*.

complementari alle *flanking regions* di pET SUMO (*destination vector*); quindi, la banda attesa si posiziona a 1 kb (Paragrafo 5.2.3). Dai 125 μ L residui di PCR 1 è stato purificato il *megaprimer* con kit “Nucleospin Gel and PCR Clean Up”, *Bioanalysis*. Quindi, sono stati quantificati con Nanodrop, *Thermo Scientific*TM, la concentrazione del DNA purificato e il rapporto di assorbanza A_{260}/A_{280} .

2.4.3 PCR 2 E DIGESTIONE CON *DpnI*

Sono state preparate 3 reazioni di *restriction free cloning*, ciascuna da 50 μ L. Per ottimizzare le condizioni di clonaggio sono stati realizzati tre rapporti molari vettore:*megaprimer*, pari a: 1:2, 1:4 e 1:6 (mantenendo fissa la quantità di vettore pET SUMO a 50 ng e variando la concentrazione di *megaprimer*). Sono state utilizzate

le quantità di reagenti di PCR riportate nel protocollo “Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)” della *NEB* (con Buffer Fusion GC 5X e DMSO). La Tabella 6 riporta le condizioni utilizzate in termociclatore. Infine, a 10 μ L delle 3 reazioni di PCR è stato aggiunto 1 μ L di *DpnI* (*NEB*). Quindi sono state incubate per 1 ora a 37 °C in *thermoblock* (*Labnet AccuBlock*TM *Digital Dry Baths*).

Tabella 6

Seguendo le linee guida del “PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)”, *NEB* sono state apportate delle modifiche alle condizioni consigliate in termociclatore. Le condizioni di reazione sono state precedentemente testate dal gruppo di ricerca del DiSC (Università di Padova).

FASE	TEMP	TEMPO
Denaturazione iniziale	98 °C	30 secondi
33 cicli	98 °C	30 secondi
	60 °C	1 minuto
	72 °C	5 minuti
Estensione Finale	72 °C	7 minuti
Conservazione	4 °C	Inf.

2.4.4 TRASFORMAZIONE BATTERICA

Sono stati preparati 80 mL di LB Agar (protocollo "LB-Agar - Powder according to Miller", *PanReac AppliChem*) addizionato con kanamicina (50 μ g/mL) e distribuiti in tre piastre. Le cellule “DH5 α Competent Cells”, *Thermo Scientific*TM, conservate a -80 °C, sono state scongelate in ghiaccio per 20 minuti. In 3 stock batterici sono stati aggiunti 10 μ L di una delle 3 reazioni di PCR 2, quindi posti in ghiaccio per 20 minuti. Per promuovere lo shock termico, i batteri sono stati incubati a 42 °C per 90 secondi in *thermoblock* (“Digital Dry Bath”, *Labnet AccuBlock*TM). Quindi riposti in ghiaccio per 3 minuti. Per favorire la ripresa batterica e l’espressione della resistenza a kanamicina, nei volumi batterici sono stati addizionati 950 μ L di *Recovery Medium* (“S.O.C Outgrowth medium”, da *Thermo Scientific*TM). Quindi, è stata realizzata una centrifugazione a 5000 g per 5 minuti. 3/4 di *Recovery Medium* sono stati prelevati e il pellet risospeso nel volume residuo. Quindi, è stato distribuito a gocce su una piastra di LB-Agar addizionato con kanamicina (50 μ g/mL) e piastrato con ansa sterile. Le piastre sono state incubate a 37 °C, O/N. La colonia cresciuta è stata inoculata in una Falcon con 10

mL di LB addizionato con kanamicina (50 µg/mL) e incubata a 37 °C, O/N e sotto agitazione. Quindi è stata realizzata una *miniprep* con il kit “NucleoSpin Plasmid. Mini kit for plasmid DNA”, *Macherey-Nagel*. Sono state apportate alcune modifiche al protocollo: al punto 6 è stata allestita una centrifugazione di 10 minuti anziché di 3 minuti e al punto 13 la colonnina è stata caricata e incubata per 10 minuti con 50 µL di acqua MilliQ anziché Buffer AE. Il plasmide purificato è stato quantificato con Nanodrop, *Thermo Scientific*TM. Il gruppo impegnato nel progetto di ricerca “HPDL” verificherà mediante sequenziamento l’avvenuta trasformazione delle cellule DH5α con il costrutto *pET SUMO::HPDL troncata*.

2.5 PREDIZIONI STRUTTURALI CON ALPHAFOLD SERVER E CHIMERA X

AlphaFold Server è un servizio web basato sull’algoritmo *AlphaFold 3*, programma di intelligenza artificiale sviluppato da *DeepMind* che consente la predizione di strutture proteiche a partire dalle sequenze amminoacidiche in formato FASTA, disponibili su Uniprot. Inoltre, con questo algoritmo è possibile predire strutture di oloenzimi, includendo ligandi e ioni. *ChimeraX* è un software all’avanguardia sviluppato da *Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics* presso la UCSF che consente di visualizzare i file in formato “. cif” creati da *AlphaFold Server*. Inizialmente, è stata valutata la fedeltà delle predizioni strutturali operate da *AlphaFold Server*, sovrapponendo le strutture *wild type* di HPDL *full length* e HPDL *troncata* e utilizzando il tool *AlphaFold Error Plot* disponibile su *ChimeraX*. Successivamente, sono state isolate le strutture secondarie e identificati i putativi domini proteici VOC nelle due strutture *wild type*. Sono state quindi sovrapposte le strutture di HPDL *wild type* e con mutazione G50D, prima nella conformazione *full length* e poi nella conformazione *troncata*. Le conseguenze fisico-chimiche causate dalla mutazione G50D sono state analizzate con *ChimeraX* mediante gli strumenti *H-bonds* e *stick* e il comando *coulombic*, che descrive la variazione di carica superficiale con tre colori: rosso per le regioni a potenziale elettrico negativo, bianco per le regioni a potenziale neutro e blu per le regioni a potenziale positivo.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 TEST DI ESPRESSIONE: COLORAZIONE CON CBB-G250 E WESTERN BLOT

I risultati ottenuti dal gel sottoposto a WB (Figura 7) mostrano che l'espressione della proteina HPDL *troncata* da cellule BL21(DE3) è limitata alla *condizione pre-IPTG*, probabilmente risultato della *leaky activity* del promotore *lac*, e alle *condizioni test* “37 °C/ IPTG 0.50 mM”, “37 °C/ IPTG 0.75 mM” e “37 °C/ IPTG 1.00 mM”. Si osserva, infatti, una banda positiva a chemiluminescenza a circa 35 kDa, al di sotto della banda del marker di 37 kDa. Non si notano delle bande apprezzabili per le *condizioni test* incubate a 20 e 30 °C. Presumiamo che le bande a peso molecolare superiore a 35 kDa siano aspecifici o forme dimeriche della proteina che non si sono denaturate nel gel. Considerando i risultati della colorazione con CBB G-250 del secondo gel (Figura 8) le *lanes*: 1, 9, 10 e 11 (Tabella 3) presentano una banda leggermente intensa con peso molecolare inferiore rispetto alla banda di 37 kDa del marker, che rappresenta con elevata probabilità il prodotto di espressione HPDL *troncata*. Inoltre, è stata notata una banda a peso molecolare inferiore a 37 kDa ma superiore alla putativa banda di HPDL *troncata*, che rappresenta probabilmente una proteina endogena altamente espressa (banda intensa). Coerentemente con l'assenza di bande positive a chemiluminescenza nel gel sviluppato con WB, nel gel colorato con CBB G-250 le *lanes*: 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (condizioni incubate a 20 e 30 °C) presentano una banda di intensità inferiore a confronto con la banda presente nelle condizioni incubate a 37 °C.

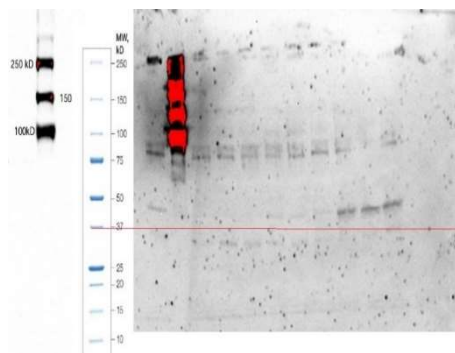


Figura 7

Partendo da destra si riportano: l'immagine rilevata con “iBright CL750 Imaging System”, *Invitrogen™* del gel dei test di espressione, l'immagine del marker proteico e il segnale di chemiluminescenza rilevato dal marker. La linea rossa evidenzia il margine dimensionale entro cui dovrebbe localizzarsi HPDL *troncata*. Per la rilevazione del segnale di chemiluminescenza è stata richiesta una esposizione elevata, come mette in evidenza il segnale sovrassaturo ottenuto per il marker (lane 2).

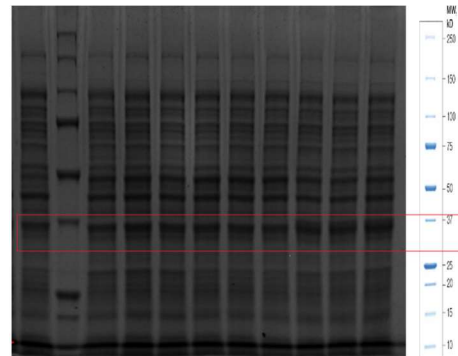


Figura 8

Immagine del gel dei test di espressione sottoposto a colorazione con CBB G-250, ottenuta con “iBright CL750 Imaging System”, *Invitrogen™* e del marker proteico utilizzato (caricato nella *lane* 2 del gel). Il riquadro rosso evidenzia il margine dimensionale entro cui dovrebbe localizzarsi HPDL *troncata*. Da notare che oltre ad HPDL *troncata* è espressa in *E. coli* una proteina endogena con un segnale più intenso rispetto a quello ottenuto per la proteina eterologa.

3.2 SOLUBILITY ASSAY: COLORAZIONE CON CBB-250 E WESTERN BLOT

Il test di espressione ha permesso di identificare tre *condizioni test* “37 °C/ IPTG 0.50 mM”, “37 °C/ IPTG 0.75 mM” e “37 °C/ IPTG 1.00 mM”, ove si apprezza l’espressione della proteina HPDL *troncata*. I risultati ottenuti nel *gel 1* (Figura 9) mostrano la presenza di una banda poco intensa, localizzata al di sotto della banda del marker di 37 kDa, che potrebbe rappresentare la proteina HPDL *troncata*. Dal

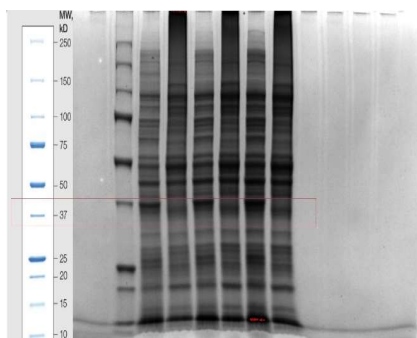


Figura 9
A destra vengono riportati i risultati della colorazione CBB G-250 del gel ottenuto dal *solubility assay*; a sinistra l’immagine del marker proteico utilizzato (lane 2 del gel). Il riquadro rosso evidenzia la regione in cui la proteina HPDL *troncata* dovrebbe localizzarsi. L’immagine del gel è stata ottenuta con “iBright CL750 Imaging System”, *Invitrogen*TM.

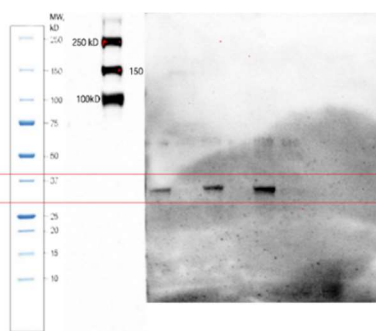


Figura 10
Partendo da destra, vengono riportati i risultati del WB del gel ottenuto dal *solubility assay*, le bande positive a chemiluminescenza del marker proteico e l’immagine completa del marker proteico. Il riquadro rosso mette in evidenza la regione in cui dovrebbe localizzarsi HPDL *troncata* (circa 35 kDa). L’immagine del gel è stata ottenuta con “iBright CL750 Imaging System”, *Invitrogen*TM.

confronto delle *lanes 3, 5 e 7*, caricate con il *pellet proteico* con le *lanes 4, 6 e 8*, caricate con il *pellet batterico*, si evince che la banda appare più intensa in corrispondenza delle seconde, suggerendo come la proteina HPDL *troncata* sia con elevata probabilità insolubile in *E. coli*. Supportano questa osservazione i risultati ottenuti dallo sviluppo con WB del *gel 2* (Figura 10), in cui è possibile osservare come le *lanes 3, 5 e 7* sono le uniche a dare positività alla reazione di chemiluminescenza.

3.3 RESTRICTION FREE CLONING

L’elettroforesi su gel di agarosio della PCR 1 (Figura 11) ha restituito una singola banda in corrispondenza della banda a 1 kb del ladder, come atteso dall’amplificazione del *megaprimer* (Paragrafo 5.2.3). L’analisi con Nanodrop, *Thermo Scientific*TM, ha restituito una concentrazione di DNA pari a 53.2 ng/μL e un rapporto A_{260}/A_{280} di 1.87. Il *megaprimer* purificato è quindi di buona qualità. La trasformazione del ceppo DH5α ha dato come risultato una singola colonia per il solo rapporto molare vettore:*megaprimer* di 1:2. È stata

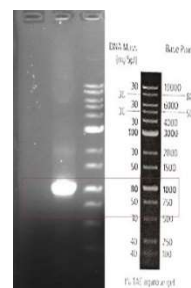


Figura 11
Partendo da destra vengono riportati l’immagine del ladder utilizzato nella corsa elettroforetica e i risultati della elettroforesi su gel di agarosio 1%. Il riquadro rosso evidenzia la regione in cui si localizza il prodotto di amplificazione ottenuto da PCR1, con elevata probabilità della dimensione attesa di 1,0 kb.

purificata una quantità di plasmide pari a 81,4 ng/μL.

3.4 PREDIZIONI STRUTTURALI

Sovrapponendo le strutture *wild type* di HPDL *full length* e di HPDL *troncata*, la predizione strutturale ottenuta tramite *AlphaFold Server* è complessivamente di “elevata fedeltà” (Figura 13). Prevale infatti la colorazione blu (pLDDT¹² > 90) che indica una elevata confidenza nella predizione strutturale. Sono inoltre presenti

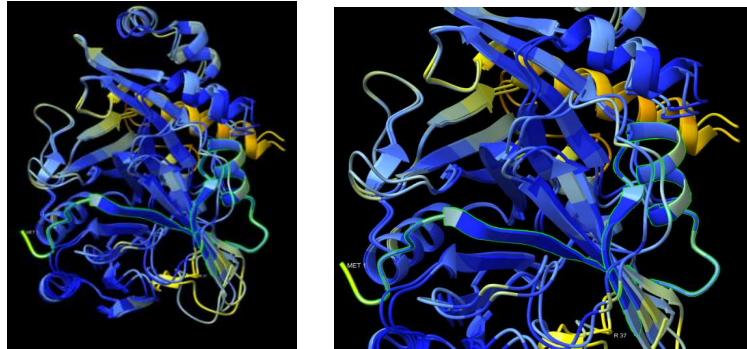


Figura 13

Immagini ottenute con il software *ChimeraX* (tool *AlphaFold Error Plot*) a partire da file “. cif” generati da *AlphaFold Server*. A sinistra una veduta completa delle strutture *wild type* HPDL *full length* e *troncata* sovrapposte; a destra è evidenziata con un margine verde la sequenza amminoacidica 1-37, dove sono stati riportati il residuo MET 1 e il residuo R 37.

delle regioni azzurre, in cui la predizione strutturale è “fedele” ($70 < \text{pLDDT} < 90$). Infine, una piccola regione compresa tra i residui 351-371, evidenziata in giallo, presenta un punteggio pLDDT tra 50 e 70, indicando una predizione strutturale di

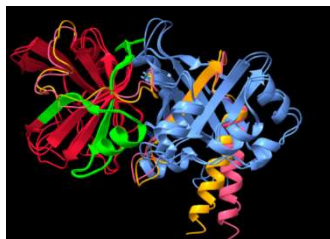


Figura 14

L’immagine riporta le strutture *wild type* di HPDL *full length* e di HPDL *troncata* sovrapposte. Sono stati messi in evidenza in rosso il putativo dominio VOC 1, in indaco il putativo dominio VOC 2 e in verde il putativo peptide di localizzazione mitocondriale.

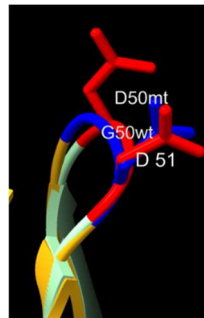


Figura 15

Rappresentazione con stick del sito G/D50D51, interni a un random coil. D50mtD51 sono rappresentati in rosso e appartengono alla struttura in verde chiaro di HPDL mutata. G50wtD51 sono evidenziati in blu e appartengono alla struttura in arancione ocra di *wild type*.

fedeltà inferiore. Dall’analisi di predizione strutturale (Figura 14), è possibile osservare che le proteine hanno strutture secondarie ben definite: α eliche (10 in HPDL *full length* e 9 in HPDL *troncata*), β -foglietti (17 in HPDL *full length* e 15 in HPDL *troncata*) e random coils (28 in HPDL *full length* e 25 in HPDL *troncata*). La sequenza del putativo peptide di localizzazione mitocondriale (residui 1-37) nella struttura di HPDL *full*

length si organizza a formare una α -elica, un random coil, un β -foglietto completo

¹² Il punteggio pLDDT (*Predicted Local Distance Difference Test*) è una misura per residuo che valuta la fedeltà nella predizione locale della struttura proteica. Ha un valore compreso tra 0 e 100, dove i punteggi più alti indicano una maggiore fedeltà di predizione.

e parte di un secondo β -foglietto. Partecipa inoltre al putativo dominio VOC 1 (residui 7-135). Dalla sovrapposizione delle strutture *full length* e *troncata* di HPDL *wild type* e di HPDL con mutazione G50D, è stato possibile evincere come la mutazione G50D si localizzi a livello di un random coil (Figura 15). Nella struttura mutata di HPDL *full length*, sono stati presi in esame i legami a idrogeno a cui partecipano i 3 residui S49, D50 e D51. L'unico residuo che varia il numero di interazioni è D51, che interagisce esclusivamente con il residuo S159 mentre nella struttura HPDL *full length wild type*, mentre nella struttura HPDL *full length* mutata interagisce anche con il residuo R7, all'interno del putativo dominio VOC 1 (Figura 16). Dall'analisi degli stessi residui nella struttura HPDL *troncata* mutata, S12, D13 e D14, il residuo D13 genera dei nuovi legami a idrogeno (Figura 17). A livello del residuo 50/13 (a seconda che si consideri la struttura di HPDL *full length* o di HPDL *troncata*), è stata messa in evidenza la variazione della carica di superficie, negativa nella struttura mutata contenente il residuo D50/D13 e neutra nella struttura *wild type*, con il residuo G50/G13 (Figura 18).

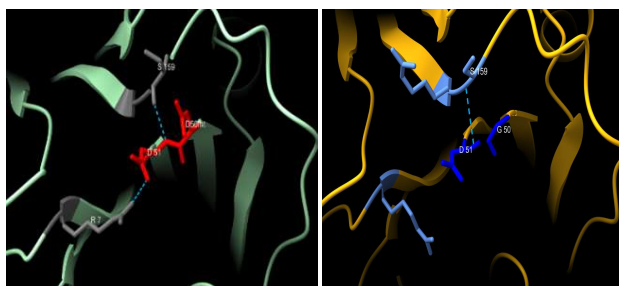


Figura 16
Vengono riportate le posizioni 50 e 51, con mutazione D50 a sinistra e con residuo *wild type* G50 a destra, a livello della proteina HPDL *full length*. Sono stati messi in evidenza i residui S159 e R7. Il residuo D51 interagisce con entrambi gli amminoacidi nella struttura mutata, mentre solo con il residuo S159 nella struttura *wild type*.

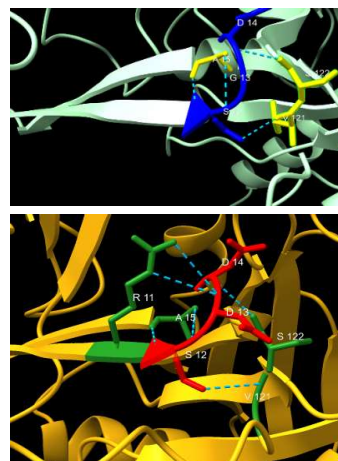


Figura 17
Vengono riportati in immagine i residui 12, 13 e 14 della struttura di HPDL *troncata wild type* in alto e di HPDL *troncata* contenente la mutazione G13D in basso.

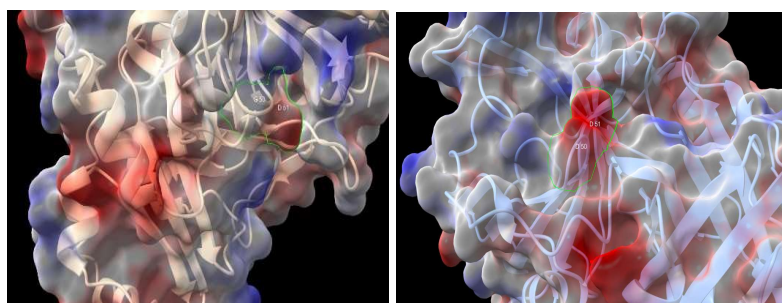


Figura 18
A sinistra vengono evidenziati con contorno verde i residui G50D51/G13D14, delle strutture *wild type* di HPDL *full length* e di HPDL *troncata*. A destra vengono messi in evidenza i residui D50D51/D13D14 delle strutture mutate di HPDL *full length* e di HPDL *troncata*. È possibile osservare come la mutazione D50/D13 porti a un potenziale negativo (a destra, colore rosso), che risulta neutro nella struttura nativa della proteina (a sinistra, colore bianco).

4. CONCLUSIONE

Questo studio evidenzia come HPDL *troncata* (residui 38-371) probabilmente non venga espressa in una forma biologicamente attiva, ma in una struttura non foldata che in *E. coli* genera degli aggregati insolubili compartmentalizzati nei corpi di inclusione. Nell'ambito dell'esperimento di clonaggio di HPDL *troncata* nel vettore pET SUMO è stata avviata una strategia biotecnologica mirata a incrementare la solubilità e a promuovere il corretto *fold*ing della proteina nel batterio. Tuttavia, i risultati ottenuti tramite predizioni strutturali bioinformatiche suggeriscono che HPDL *troncata* abbia probabilmente delle caratteristiche strutturali diverse da HPDL *full length*. La variazione nel numero di legami a idrogeno che la proteina *wild type* genera nella forma *troncata* ma che mancano nella forma *full length*, suggeriscono che il putativo peptide di localizzazione mitocondriale (residui 1-37) sia necessario al corretto *fold*ing della proteina. Un altro risultato importante riguarda la struttura di HPDL *full length* con mutazione G50D; è stato evidenziato come il residuo D50 permetta al residuo vicinale D51 di instaurare una interazione a idrogeno con il residuo R7, situato all'interno del putativo dominio catalitico VOC 1, suggerendo il ruolo cruciale che la frequente mutazione G50D potrebbe avere nella patogenesi della NEDSWMA. Tuttavia, poiché si tratta di studi predittivi, è necessario risolvere la struttura di HPDL per validare empiricamente queste osservazioni, attraverso, per esempio, tecniche di biologia strutturale quali la cristallografia a raggi-X. Una caratterizzazione più approfondita di HPDL avrebbe, in primo luogo, un impatto positivo nel campo della conoscenza della biochimica metabolica umana, dato che HPDL molto probabilmente partecipa alla sintesi del Coenzima Q10, oltre a generare una via "alternativa" al catabolismo canonico della tirosina. In secondo luogo, la risoluzione della struttura di HPDL potrebbe fornire una comprensione più chiara delle basi molecolari della patologia NEDSWMA, permettendo lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate.

5. MATERIALI SUPPLEMENTARI

5.1 VARIANTI ALLELICHE DI HPDL ISOLATE IN PAZIENTI AFFETTI DA NEDSWMA

Tabella 1

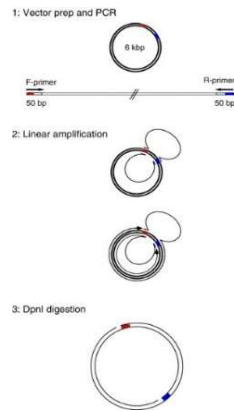
Varianti alleliche di HPDL isolate in pazienti affetti da NEDSWMA. Modificato da: Husain RA *et al.* (2020).

368 The American Journal of Human Genetics 102, 364–373, August 6, 2020

Individual	F1: I1.1	F1: I1.2	F2: I1.1	F2: I1.3	F3: I1.3	F4: I1.1	F5: I1.2	F6: I1.1	F6: I1.3	F7: I1.2	F8: I1.1	F9: I1.1	F10: I1.1	F11: I1.1	F12: I1.3	F13: I1.1	F13: I1.2
Gender	M	F	M	M	M	M	M	M	M	M	M	F	M	F	M	M	M
Country of origin	Algeria	Algeria	Iran	Iran	Turkey	Syria	Canada	Germany	Germany	Germany	Germany	Germany	USA	Turkey	Syria	Turkey	Turkey
cDNA change ^a variant 1	c.342_343 insTGCC	c.342_343 insTGCC	c.779 G>A	c.779 G>A	c.721 C>T	c.1024 C>T	c.650 T>C	c.503 G>A	c.503 G>A	c.701 T>C	c.469 T>C	c.698_699 insTGGGCC AGCATTG TCCCACT CTGCTTCT GGCTGAGTC	c.280 del	c.149 G>A	c.149 G>A	N/D	c.149 G>A
Protein change ^b variant 1	p.Ala115 Cysfs*82	p.Ala115 Cysfs*82	p.Gly290Glu	p.Gly290Glu	p.Gln244*	p.Gln342*	p.Leu217Pro	p.Cys168Tyr	p.Cys168Tyr	p.Leu234Pro	p.Tip157Arg	p.Leu234 Glyfs*94	p.Glu94 Serfs*37	p.Gly30Asp	p.Gly30Asp	N/D	p.Gly30Asp
cDNA change ^c variant 2	homo zygous	homo zygous	homo zygous	homo zygous	homo zygous	homo zygous	c.797 T>C	c.537 G>C	c.537 G>C	c.743 T>C	c.753 C>A	homo zygous	c.859 T>C	homo zygous	homo zygous	N/D	homo zygous
Protein change ^b variant 2	homo zygous	homo zygous	homo zygous	homo zygous	homo zygous	homo zygous	p.Ile266Ile	p.Tip179Cys	p.Tip179Cys	p.Leu248Pro	p.His251Gln	homo zygous	p.Tyr287His	homo zygous	homo zygous	N/D	homo zygous
Phenotype	congenital	congenital	infantile	infantile	infantile	infantile	infantile	infantile	infantile	infantile	infantile	infantile	juvenile	juvenile	juvenile	juvenile	juvenile
Age of onset/current age	congenital/8 y	congenital/7 y	6 m/34 y	2 m/21 y	6 m/10 y	1 y/10 y	1 w/22 y	3 w/5 y	6 w/1 y 7 m	6 w/5 y	5 m/2 y	5 y/8.5 y	15 y/17 y	15 y/20 y	15 y/19 y	14 y/39 y	15 y/33 y
Delay of motor development	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Intellectual impairment	+ (severe)	+ (severe)	+ (severe)	+ (severe)	+ (moderate)	+ (mild)	+	+	+	N/A	+	+	-	-	-	-	-
Chronic progression	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Regression	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Acute respiratory failure (age)	-	-	-	+ (2 x childhood)	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Microcephaly (SD)	+ (-5.3)	+ (-5.0)	+ (-4.6)	+ (-5.3)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	N/D	-	-
Seizures	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Spastic paraplegia (tetraparesis)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5.2 CLONAGGIO SENZA ENZIMI DI RESTRIZIONE

5.2.1 PRINCIPIO DELLA RFC



In figura

Principio di funzionamento della RFC. Le tre fasi della RFC: PCR 1, PCR 2 e digestione con *DpnI*.

Si noti che con la PCR 2, l'amplificazione del DNA ricombinante è lineare. Modificato da: Fusinita van den Ent, Jan Löwe (2006).

5.2.2 PRIMER PCR 1

Primer forward: *HPDL_4_fw*¹³

GCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTGAGGTGGACGGCTGGCGGCAGC

pET_SUMO

HPDL

46 basi, 63% GC, Tm: 87 °C.

Primer reverse: HPDL_3_rv¹³

ATCTGCCAGGAGCCAGGAAGCCTAAAGACAAGCTTAGGTATTTATTC
GGC

HPDL

pET_SUMO

50 basi, 48% GC, Tm: 80 °C.

5.2.3 PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE ATTESO DA PCR 1

- **pET SUMO-complementary regions**
- HPDL-complementary regions
- Sequenza di HPDL *troncata*

GCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTGAGGTGGACGGCTGGCGGCAGC
TAGCCCTGCGCAGCGGCGACGCGGTCTTTTTGGTGAACGAGGGGCGCAG
GGTCTGGAGAGCCGCTGTACGGCCTGGATCCGCGTCACGCCGTGCCCA
GCGCCACAAACCTGTGCTTCGACGTGGCGGACGCCGGCGCTGCAACCC
GGGAGCTGGCAGCGCTGGGCTGCAGCGTGCCTGTCCCTCCCGTTTCGCG
TGCGGGACGCGCAGGGTGCCGCCACTTACGCCGTGGTCAGCTCGCCTG
CCGGCATCCTCAGCCTGACCTTGCTGGAGCGCGCTGGCTACCGCGGAC
CCTTCCTACCCGGCTTCAGGCCCGTGTCTCTGCGCCTGGCCCCGGGTG
GGTCAGCCGCGTGGACCACCTGACCTTGGCCTGCACCCCCGGCAGCTC
CCCCACACTTTTGGCGCTGGTTCCACGACTGCCTGGGCTTTTGCCACTTG
CCGCTGAGCCCAGGTGAGGATCCCGAGCTGGGCCTCGAAATGACAGCA
GGGTTTGGGCTTGGGGGACTGAGGCTTACAGCCCTGCAGGCCAGCCG
GGCAGCATTGTCCCCACTCTTGTTCTGGCTGAGTCCCTTCCGGGGGCGA
CGACACGACAGGACCAGGTGGAGCAGTTCCTGGCCCCGGCACAAGGGG
CCAGGCCTGCAGCACGTGGGGCTGTATACGCCTAACATTGTGGAGGCC
ACTGAGGGGGTGGCAACTGCTGGAGGCCAGTTCCTGGCTCCCCCTGGG
GCATACTACCAGCAGCCAGGAAAGGAGAGGCAGATCCGAGCTGCAGG
GCACGAGCCTCATCTGCTTGCTCGACAGGGGATCCTGCTAGATGGTGAT
AAAGGCAAGTTTCTGCTTCAGGTCTTCACCAAGTCCCTTTTTACTGAGG
ACACTTTCTTCCTGGAGCTGATTCAGAGGCAGGGGGCCACTGGCTTTG
GTCAGGGCAACATCAGAGCTCTGTGGCAGTCCGTACAGGAGCAATCTG
CCAGGAGCCAGGAAGCCTAAAGACAAGCTTAGGTATTTATTCGGC

(1054 basi)

¹³ Per la lettura dei primer, considerare i caratteri in grassetto, riferiti alla sequenza complementare pET_SUMO e i caratteri sottolineati, riferiti alla sequenza complementare ad HPDL.

6. BIBLIOGRAFIA

- >Entry 6189944. HPDL, (2023). *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Entry - *618994 – 4 HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE-LIKE; HPDL - OMIM*
- >Husain R. A., *et al.* (2020) Bi-allelic HPDL Variants Cause a Neurodegenerative Disease Ranging from Neonatal Encephalopathy to Adolescent-Onset Spastic Paraplegia. *American Journal of Human Genetics*, 107(2), 364-373. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.015>
- >Morgan N.V. *et al.* (2021) Evidence that autosomal recessive spastic cerebral palsy-1 (CPSQ1) is caused by a missense variant in HPDL. *Brain Communications*; 3(1). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab002>
- >Banh, R.S., *et al.* (2021) The polar oxy-metabolome reveals the 4-hydroxymandelate CoQ10 synthesis pathway. *Nature* 597, 420–425. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03865-w>
- >Gerald Litwack Ph.D. (2018) Chapter 13-Metabolism of Amino Acids. *Human Biochemistry*, 359-394. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383864-3.00013-2>.
- >Anutthaman Parthasarathy *et al.* (2018). A Three-Ring Circus: Metabolism of the Three Proteogenic Aromatic Amino Acids and Their Role in the Health of Plants and Animals. *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 5. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00029>
- >Oliveira, J., Farias, H.R. & Streck, E.L (2021). Experimental evidence of tyrosine neurotoxicity: focus on mitochondrial dysfunction. *Metab Brain Dis* 36, 1673–1685 <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00781-w>
- >Fusinita van den Ent, Jan Löwe (2006), RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* Volume 67, Issue 1, Pages 67-74; <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.12.008>
- >Subramaniam, S., Kleywegt, G.J. (2022). A paradigm shift in structural biology. *Nat Methods* 19, 20–23 <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01361-7>
- >Santucci A, *et al.* (2017) 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase and Its Inhibition in Plants and Animals: Small Molecules as Herbicides and Agents for the Treatment of Human Inherited Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (9), 4101-4125. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01395>