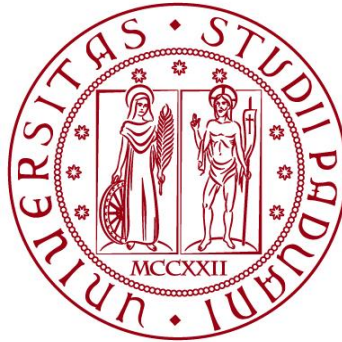


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

**STRATEGIE DI IDENTIFICAZIONE DELLE  
PROTEINE CHE INTERAGISCONO CON AMBRA1  
IN SISTEMI ANIMALI E LORO APPLICABILITA' IN  
PIANTA**

**Tutor: Prof. Alessandro Alboresi  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Alessia Pagliaro**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



## INDICE

Titolo: Strategie di identificazione delle proteine che interagiscono con AMBRA1 in sistemi animali e loro applicabilità in pianta.

<b>1. Introduzione.....</b>	<b>5</b>
1.1 L'autofagia.....	5
1.2 Meccanismi molecolari del processo macroautofagico negli organismi vegetali.....	8
1.3 Ambra1: proteina intrinsecamente disordinata e molecola scaffold..	8
1.4 AMBRA1 è un fattore cruciale coinvolto nella regolazione dell'autofagia nei vertebrati.....	10
1.5 Importanza dell'autofagia nelle piante e possibile ruolo di AMBRA1 durante la carenza di nutrienti.....	12
<b>2. OBIETTIVI DELLA TESI.....</b>	<b>14</b>
<b>3. SISTEMA DEL DOPPIO IBRIDO DEL LIEVITO.....</b>	<b>14</b>
3.1 Generalità sulla tecnica del doppio ibrido del lievito.....	20
3.2 Conferma dell'interazione tra AMBRA1 e BECN1 attraverso la tecnica Y2H.....	20
3.3 Utilizzo di Y2H come un efficace strumento per lo studio delle interazioni proteiche nelle piante.....	21
<b>4. PURIFICAZIONE DEL COMPLESSO MEDIANTE <i>Tandem affinity purification</i>.....</b>	<b>18</b>
4.1 Generalità sulla tecnica TAP.....	18
4.2 Utilizzo della TAP per identificare il complesso proteico legato ad AMBRA1.....	20
4.3 Ottimizzazione della TAP per la purificazione di complessi proteici nei vegetali attraverso il tag GS.....	21
<b>5. IMMUNOPRECIPITAZIONE.....</b>	<b>25</b>
5.1 Generalità sul metodo IP.....	25
5.2 Utilizzo del metodo IP per verificare le interazioni di Ambra1 con i partner proteici individuati.....	26
<b>6. RICERCA DELLE SEQUENZE OMOLOGHE IN <i>P. patens</i> ALLE PROTEINE INTERATTRICI DI AMBRA1.....</b>	<b>29</b>

6.1 Ricerca delle sequenze omologhe in <i>Physcomitrium patens</i> .....	29
6.2 Ricerca delle sequenze omologhe nelle altre piante.....	34
<b>7. ETICHETTATURA ENZIMATICA DI PROSSIMITA' (PL).....</b>	<b>36</b>
7.1 Innovazioni e limitazioni della tecnica PL e comparazione con gli approcci molecolari convenzionali.....	36
7.2 Generalità ed evoluzione della tecnica PL.....	37
7.3 Applicazione della tecnica PL in campo vegetale.....	38
<b>8. CONCLUSIONI.....</b>	<b>39</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>41</b>

# 1 INTRODUZIONE

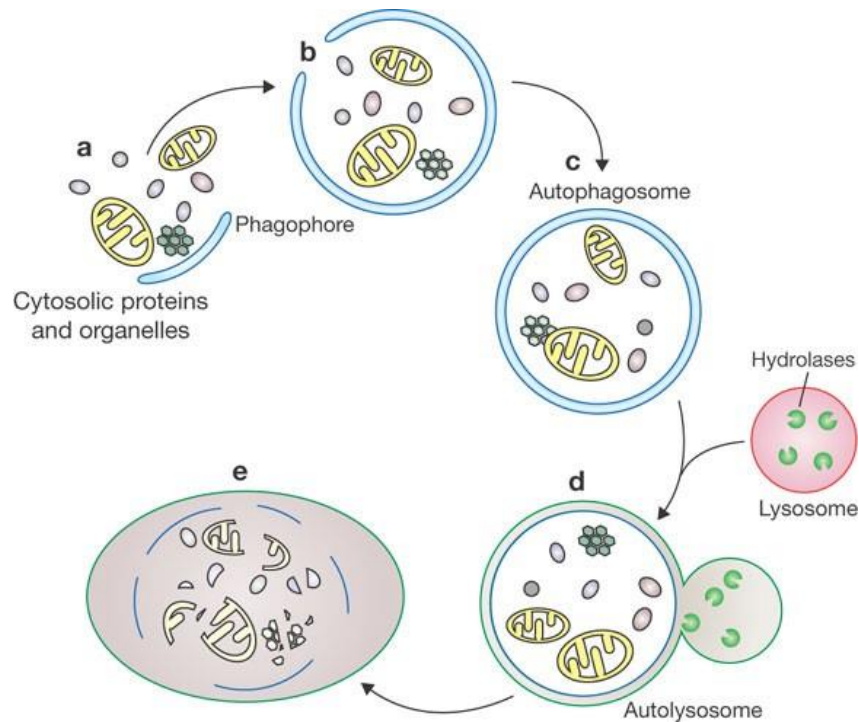
## 1.1 L'autofagia

L'autofagia è un processo catabolico coinvolto nella rimozione di componenti cellulari tossici o danneggiati quali complessi proteici, macromolecole ed organelli citoplasmatici. Questa via auto-degradativa viene mantenuta a livelli fisiologici determinando l'omeostasi e il corretto turnover basale allo scopo di garantire il rinnovamento degli elementi strutturali e funzionali all'interno dell'organismo. Inoltre, l'autofagia rappresenta un meccanismo di risposta indotto dalla carenza di nutrienti e ne assicura il recupero attraverso la digestione del contenuto cellulare nelle condizioni in cui l'organismo sia sottoposto a stress. Gli organismi vegetali, essendo incapaci di movimento, dipendono esclusivamente dalla loro capacità di assorbire i nutrienti disponibili. In questo scenario, un processo di digestione che permette il riciclo dei nutrienti trova un ruolo di fondamentale importanza all'interno delle piante.

Tre distinti tipi di autofagia sono ritrovabili nelle cellule eucariotiche. La tipologia più studiata di autofagia è presente in tutte le cellule eucariotiche ed è la macroautofagia, chiamata generalmente "autofagia", ed è anche il processo che verrà più approfonditamente descritto in seguito e su cui verteranno gli obiettivi di questo lavoro. La microautofagia, presente anche negli organismi vegetali durante lo sviluppo e la germinazione dei semi, è stata studiata soprattutto nel lievito, rimanendo ancora in gran parte inesplorata nei mammiferi, ed è un processo in cui è la membrana lisosomiale o vacuolare stessa a circondare la componente citosolica da digerire. L'autofagia mediata da chaperon prevede la degradazione di proteine citoplasmatiche dispiegate dalle proteine chaperon e traslocate attraverso la membrana del lisosoma. All'interno del regno vegetale è presente, inoltre, la mega-autofagia che è coinvolta nella fase finale del processo di apoptosi in cui i materiali citoplasmatici e la parete cellulare sono degradate a causa del rilascio delle idrolasi contenute nel vacuolo in seguito alla permeabilizzazione del tonoplasto.

La macroautofagia, sia negli animali che nelle piante, ha inizio con la

formazione di doppie membrane a forma di coppa che, espandendosi e fondendosi insieme, formano delle vescicole, dette autofagosomi, che hanno il compito di racchiudere il materiale citoplasmatico destinato all'eliminazione. In seguito, gli autofagosomi permettono il trasporto del materiale inglobato verso organelli litici come lisosomi o vacuoli, rispettivamente presenti in animali e piante (figura 1).

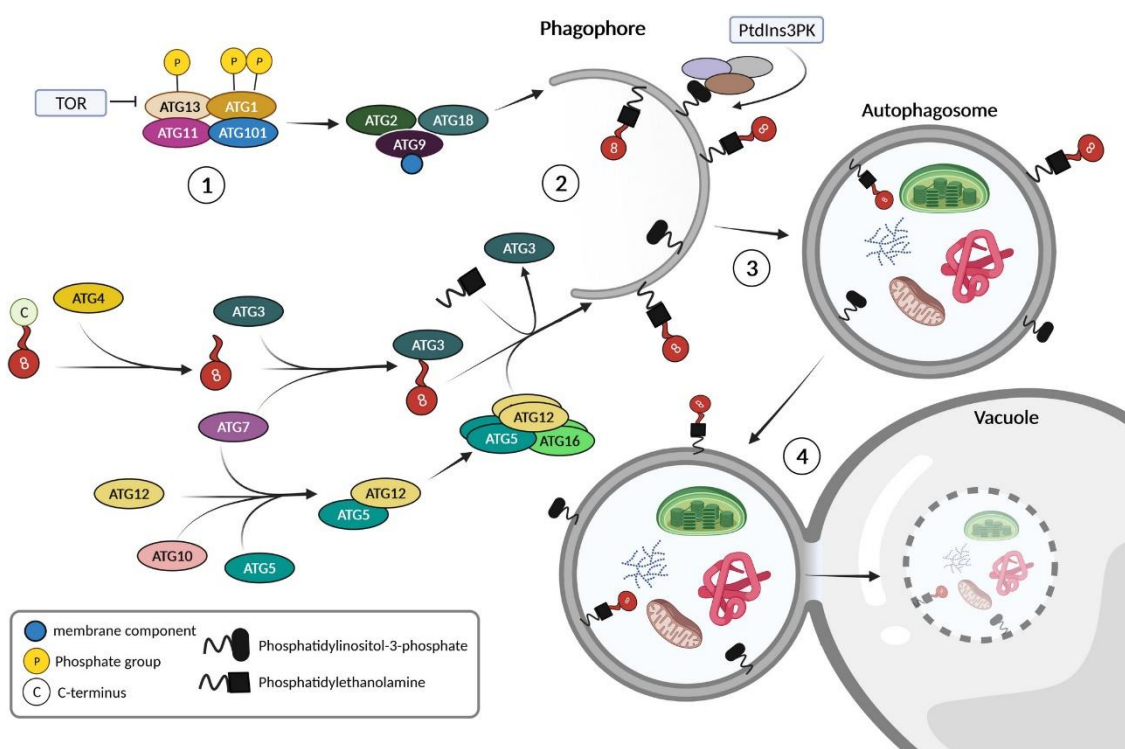


**Figura 1. Meccanismo di formazione dell'autofagosoma.** Il materiale citosolico destinato alla degradazione viene sequestrato all'interno del fagoforo a doppia membrana in via di formazione. In seguito, avviene la formazione dell'autofagosoma per chiusura della doppia membrana che può fondere la sua membrana con il lisosoma (o eventualmente il vacuolo) formando l'autolisosoma (Fonte: Xie e Klionsky, 2007).

Sinteticamente, la via autofagica può essere riassunta in 3 fasi: 1) nucleazione della membrana e formazione del fagoforo; 2) fagocitamento dei componenti citosolici nell'autofagosoma, 3) fusione e degradazione nel lisosoma/vacuolo (Magen et al., 2022; Qi et al., 2021).

I meccanismi molecolari dell'autofagia sono stati descritti in dettaglio negli animali, nei quali la via ha un ruolo di rilievo durante l'embriogenesi e la differenziazione cellulare ed è determinante per il corretto sviluppo così come per la prevenzione dell'insorgere di malattie neurodegenerative

(Michaeli et al., 2016). Inoltre, diversi geni regolatori del processo autofagico, noti come geni ATG (*Autophagy-related genes*) sono conservati tra *Saccharomyces cerevisiae* ed organismi appartenenti al regno animale e vegetale suggerendo la loro conservazione funzionale durante l'evoluzione (Avin-Wittenberg et al., 2011). Negli ultimi decenni, nel lievito e successivamente in piante ed animali, siano state identificate oltre 40 proteine correlate all'autofagia che mostrano una sostanziale conservazione del macchinario centrale dell'autofagia. Nei sistemi vegetali queste proteine vengono suddivise in 4 complessi proteici: 1) il complesso ATG1/13 chinasi che media l'inizio dell'autofagia; 2) il complesso ATG9 che fornisce lipidi agli autofagosomi in formazione; 3) il complesso PI3K (fosfatidilinositolo-3-chinasi); 4) due sistemi di coniugazione, ATG8 e ATG12, reclutati durante l'espansione dell'autofagosoma (figura 2) (Magen et al., 2022; Qi et al., 2020).



**Figura 2. Meccanismo molecolare dell'autofagia nelle piante.** La carenza di nutrienti determina la defosforilazione di ATG13 da parte di TOR e la successiva formazione di un complesso con ATG13, ATG11 ed ATG101. Sussegue l'attivazione del complesso PI3K che, attraverso la generazione di PI3P, permette la formazione del fagoforo.

L'allungamento e la chiusura del fagoforo sono determinati da ATG8 insieme ad ATG12 (Fonte: Magen et. al, 2022).

## **1.2 Meccanismi molecolari del processo macroautofagico negli organismi vegetali**

Nelle piante, le membrane autofagosomiche fondendosi con quella del vacuolo, il tonoplasto, formano delle vescicole a singola membrana dette corpi autofagici, il cui contenuto viene degradato dalle idrolasi acide, fornendo i prodotti di degradazione fondamentali che potranno essere recuperati come materiale riciclato per la costruzione di nuove macromolecole (Qi et al., 2020). In condizioni ricche di nutrienti il complesso della chinasi TOR, regolatore negativo dell'autofagia, è attivo e mantiene ATG13 fosforilato in modo da impedire la formazione del complesso ATG1/ATG13 con conseguente inibizione dell'attività di ATG1. In seguito alla carenza di nutrienti SnRK1 inibisce l'attività TOR che, defosforilando ATG13, determina la possibilità da parte di ATG1 di formare un complesso chinasi con ATG13, ATG11 e ATG101 in grado di avviare l'autofagia. Affinché proceda la nucleazione dell'autofagia e la formazione degli autofagosomi è necessaria l'attivazione del complesso PI3K che catalizza la formazione di PI3P. In seguito, la proteina transmembrana ATG9 forma un complesso con le proteine accessorie ATG12 e ATG8 che è impiegato nel trasporto di lipidi all'autofagosoma, promuovendone la sua espansione e la successiva chiusura (figura 2) (Magen et al., 2022; Qi et al., 2020).

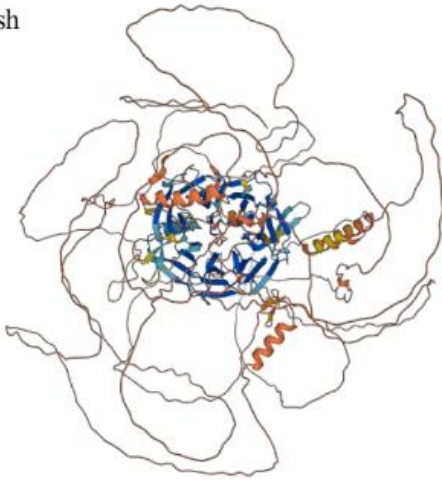
## **1.3 Ambra1: proteina intrinsecamente disordinata e molecola scaffold**

AMBRA1 è una proteina contenente 1300 residui amminoacidici ed è definita come proteina intrinsecamente disordinata (IDP) perché



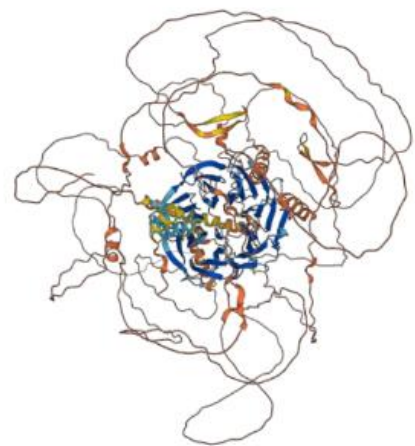
caratterizzata da regioni di disturbo intrinseco (IDR) lungo la sua sequenza (figura 3).

Zebrafish



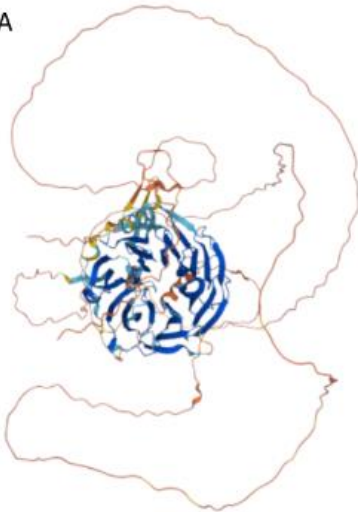
Protein: Activating molecule in beclin-1-regulated autophagy  
Gene: ambra1a  
Source organism: *Danio rerio* (Zebrafish)[go to search](#)  
UniProt: E7FAG6  
[go to UniProt](#)  
Experimental structures: None available in the PDB

Human



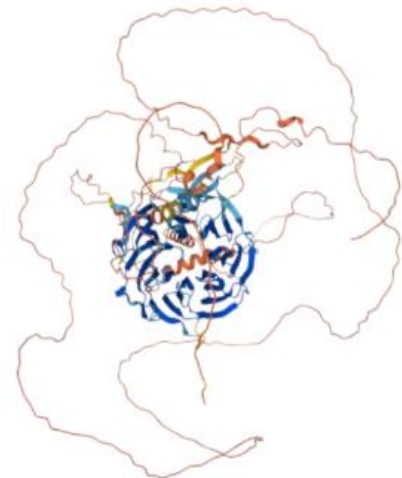
Protein: Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1  
Gene: AMBRA1  
Source organism: *Homo sapiens* (Human)[go to search](#)  
UniProt: Q9C0C7  
[go to UniProt](#)  
Experimental structures: None available in the PDB

*Physcomitrella*  
AMBRA1A



AMBRA1A  
Organism: *Physcomitrium patens* (Spreading-leaved earth moss) (*Physcomitrella patens*)  
Accession: A0A7I4AC29  
Proteome: UP000006727  
Chromosome 10  
Pp3c10\_9370V3.6  
Pp3c10\_9370

*Physcomitrella*  
AMBRA1B



AMBRA1B  
Organism: *Physcomitrium patens* (Spreading-leaved earth moss) (*Physcomitrella patens*)  
Accession: A0A2K1JGJ8  
Proteome: UP000006727  
Chromosome 14  
Pp3c14\_5930V3.1  
Pp3c14\_5930

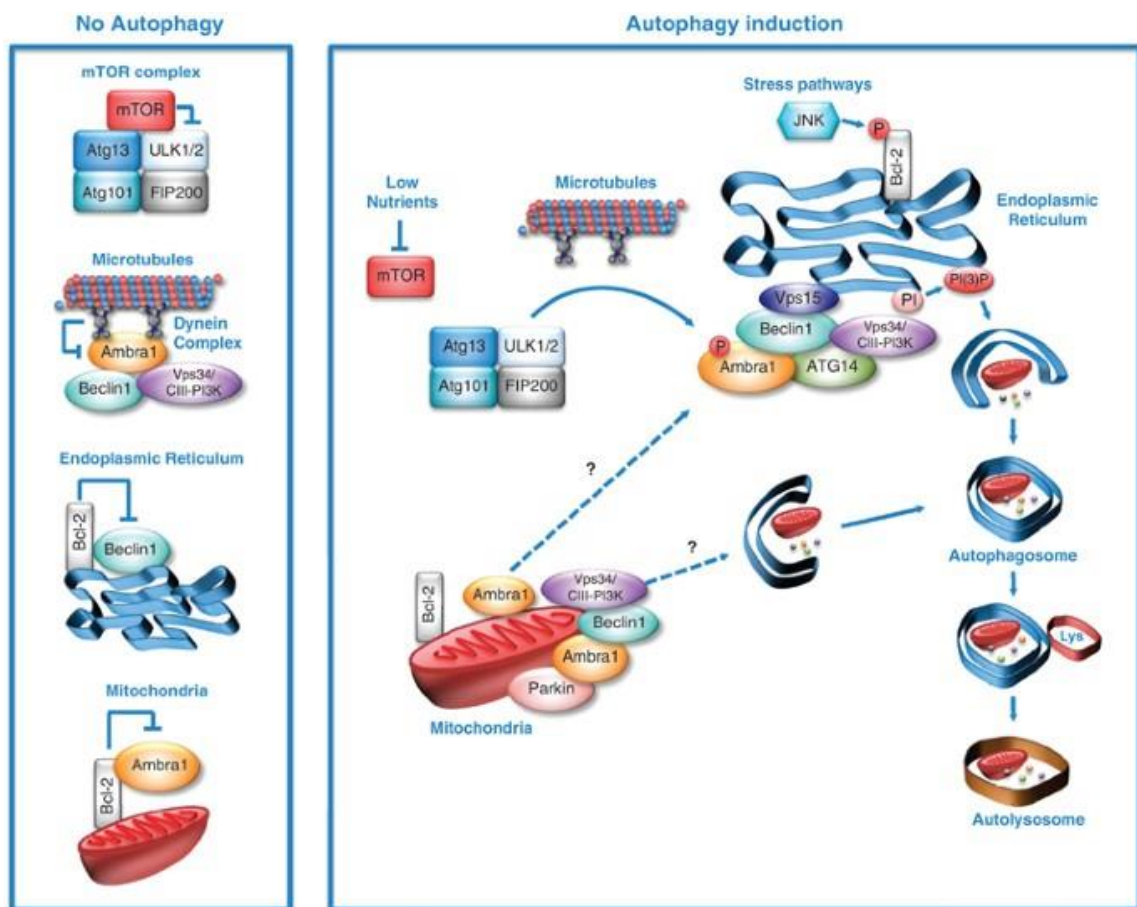
**Figura 3. Strutture alphafold di proteina AMBRA1 di *Danio rerio*, *Homo sapiens* e le due isoforme AMBRA1A ed AMBRA1B di *Physcomitrium patens* (Fonte: Uniprot).**

Le proteine che presentano elevata disorganizzazione strutturale partecipano spesso a reti di interazione proteina-proteina attraverso la regolazione di molteplici vie metaboliche. La disorganizzazione strutturale, infatti, conferendo flessibilità alla proteina, influisce positivamente sulla capacità di subire dei cambiamenti conformazionali e di formare superfici di interazioni multiple che siano complementari a proteine diverse. I motivi di interazione presenti all'interno della stessa regione possono anche legarsi contemporaneamente a partner diversi e formare dei centri molecolari di interazione multipla. Nei vertebrati è stato dimostrato il ruolo di AMBRA1 come molecola scaffold e di interazione multipla per la regolazione di processi differenti attraverso partner diversi nella regolazione della macroautofagia e dell'autofagia selettiva, della morte cellulare programmata, della proliferazione cellulare e dell'embriogenesi (Cianfanelli et al., 2015). L'inattivazione della proteina risulta essere associata a difetti e patologie del sistema nervoso in via di sviluppo con conseguente morte embrionale (Antonioli et al., 2014). Lo studio di AMBRA1 nei mammiferi mostra come abbia una funzione protettiva contro l'insorgenza delle neurodegenerazione, che può portare alla morte precoce nell'embrione, e come perturbazioni del processo autofagico siano associabili all'alterazione della crescita cellulare e allo sviluppo di tumori (Fimia et al., 2007).

#### **1.4 AMBRA1 è un fattore cruciale coinvolto nella regolazione dell'autofagia nei vertebrati**

Di seguito, l'attenzione verrà focalizzata sulla regolazione del processo autofagico da parte di AMBRA1 e sull'individuazione delle proteine interagenti nei vertebrati. Il complesso BECLIN 1 (omologo di ATG6 nelle piante), formato da Vps34, BECLIN1, Vps15 e ATG14, ed il complesso ULK1 (omologo di ATG1 nelle piante), formato da ULK1, mAtg13, FIP200 e Atg101, rappresentano i due complessi proteici responsabili della formazione degli autofagosomi. BECLIN 1 produce fosfatidilinositolo-3-fosfato che funge da sito di attacco per il reclutamento delle proteine necessarie per l'assemblaggio delle vescicole preautofagiche. ULK-1 agisce a monte del complesso BECLIN 1 e rappresenta il collegamento

diretto a diverse vie di segnalazione intracellulare. Così come negli organismi vegetali, l'induzione dell'autofagia è indotta da mTOR, proteina chinasi bersaglio della rapamicina e in grado di funzionare come sensore nutritivo. Questa si trova presente sotto forma di complesso proteico mTORC1, regolatore dell'autofagia. In condizioni normali, mTORC1 mantiene fosforilato ULK1 e mATG13 inibendo l'attività del complesso e l'autofagia (figura 4).



**Figura 4. Regolazione dell'autofagia da parte di AMBRA1 negli animali.** Alti livelli di nutrienti determinano l'inibizione del complesso ULK1 da parte di mTOR. AMBRA1/BECN1 sono associati al complesso di dineina in forma inattiva. Nelle condizioni di carenza nutrizionale mTOR libera ULK1 che consente la dissociazione di BECN1 dal complesso della dineina (Fimia et. al, 2012).

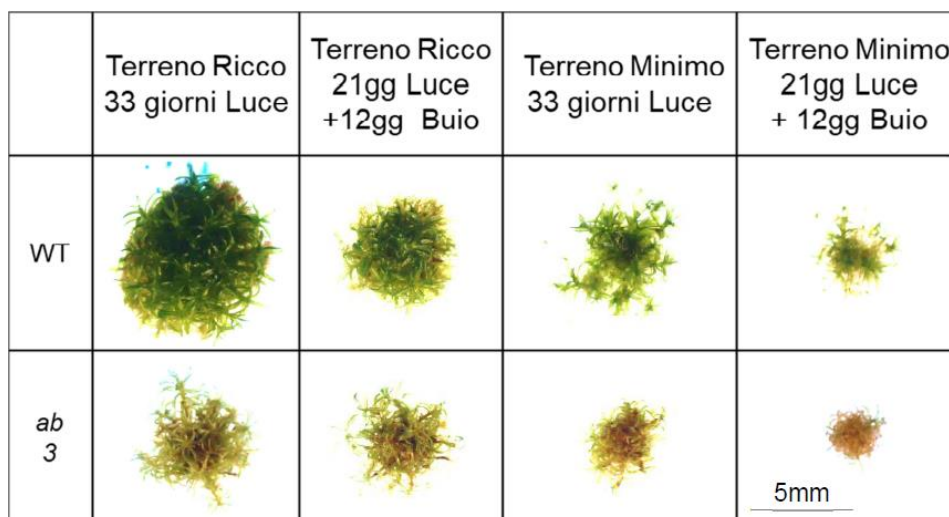
Inoltre, durante questa fase, Ambra1 è legata con Beclin1 e Vps34 alle catene leggere della dineina, DLC1 e DLC2, formando un complesso

inattivo. La carenza di nutrienti porta all'inattivazione e alla dissociazione di mTORC1 da ULK1 che libero di indurre la cascata autofagica mediante la fosforilazione di Ambra1 che viene rilasciata dal complesso motorio della dineina e si trasloca, insieme a BECLIN1 e Vps34, nel reticolo endoplasmatico, sito di formazione degli autofagosomi. Il legame di AMBRA1 con BECLIN1 potenzia la sua attività chinasi e promuove la formazione di autofagosomi mentre il legame con ULK1 ne promuove la stabilità, essenziale per il legame di ULK1 con TRAF6 (figura 4) (Antonioli et al., 2014, Cianfanelli et al., 2015). In uno studio condotto nel 2014 è stato dimostrato che AMBRA1 regola l'autofagia anche attraverso l'interazione con Cullin4 e Cullin5, membri di una famiglia di ligasi dell'ubiquitina E3 che regolano processi cellulari come la proliferazione, la differenziazione, il metabolismo cellulare e la risposta allo stress. Attraverso DDB1, la ligasi Cullin 4 E3 si associa ad AMBRA1 per regolare la sua ubiquitinazione e abbondanza in condizioni normali. Gli stimoli autofagici portano al rilascio di AMBRA1 da DDB1 dipendentemente da ULK1 e TRAF6 con un conseguente aumento dei livelli di AMBRA1. Questa stabilizzazione è transitoria poiché lo stress prolungato provoca la riassociazione di DDB1 ad AMBRA1. La diminuzione dei livelli di AMBRA1 è parallela alla cessazione della risposta autofagica e precede la riattivazione di mTORC. Dopo l'induzione dell'autofagia, AMBRA1 interagisce con Elongin B per sopprimere l'attività di Cullin 5, consentendo la stabilizzazione di DEPTOR, inibitore di mTOR (Antonioli et al., 2014).

### **1.5 Importanza dell'autofagia nelle piante e possibile ruolo di AMBRA1 durante la carenza di nutrienti**

Un recente studio ha indagato la funzione di AMBRA1 e il suo ruolo durante l'autofagia nell'organismo *Physcomitrium patens*, in cui due differenti geni codificano per le due isoforme AMBRA1a ed AMBRA1b, utilizzando i singoli mutanti *ambra1a* KO ed *ambra1b* KO ed il doppio mutante *ambra1a/b* KO coltivati su terreno ricco di nutrienti e su terreno minimo, sia in condizioni di luce che con periodo al buio. Lo scopo della ricerca è quello di verificare se delezioni di AMBRA1 comportino alterazioni nel processo autofagico

durante condizioni di stress dovute alla carenza nutrizionale indotta. I risultati hanno riportato che il doppio mutante *ambra1alb* KO presenta un fenotipo di crescita sempre inferiore rispetto agli altri mutanti e al wild-type e gametofori sottili, arcuati e raggrinziti (figura 5).



**Figura 5. Fenotipo della colonia mutante *ambra1alb* dell'organismo *P. patens* confrontato con il WT.** Le colonie del doppio mutante sono di minori dimensioni e presentano un fenotipo ingiallito nelle condizioni di crescita con periodo al buio (Fonte: Zuin I., 2020).

Inoltre, se cresciuto su terreno ricco e alla luce, in questo mutante avviene un notevole calo dell'efficienza del fotosistema. L'efficienza del fotosistema II è il parametro che fornisce indicazioni sullo stato fisiologico della pianta che, se sottoposta a stress, determina la sua parziale degradazione con conseguente diminuzione della sua efficienza. In tutti gli altri genotipi, la senescenza indotta dal buio determinava un abbassamento di efficienza paragonabile e meno drastico. Questo ha suggerito il ruolo di AMBRA1 nell'impedire un calo di efficienza del fotosistema II in seguito alla senescenza indotta dal buio. Questi risultati hanno riportato l'importanza di AMBRA1 nel mantenimento dell'alta efficienza del fotosistema II, in particolar modo su terreni ricchi in cui il riciclo dei nutrienti attraverso la regolazione della via autofagica è fondamentale per il corretto turnover cellulare. Nonostante le conclusioni ottenute non permettano di affermare con sicurezza il coinvolgimento di AMBRA1 nel processo autofagico, queste

rappresentano un punto di inizio per eventuali studi futuri a sostegno dell'ipotesi che AMBRA1, così come negli animali, sia una proteina chiave durante la regolazione di un così importante processo cellulare (Zuin, 2020).

## **2 OBIETTIVI DELLA TESI**

Alla luce di quanto rilevato dai risultati precedentemente riportati, è stata avanzata l'ipotesi per cui AMBRA1 possa funzionare come regolatore dell'autofagia anche nei sistemi vegetali. Al fine di chiarificare ulteriormente il ruolo di AMBRA1, in questo lavoro, viene proposto di caratterizzare la proteina anche dal punto di vista del suo interattoma. Di seguito, verranno analizzate le tecniche molecolari più utilizzate per lo studio delle proteine interattive di AMBRA1 già identificate nei mammiferi e verrà discussa la possibilità di poter applicare le stesse allo studio del regno vegetale. A questo scopo verranno ricercate le sequenze omologhe delle proteine animali interagenti con AMBRA1 nel genoma di *P. patens*. Questo organismo verrà utilizzato come modello per avanzare l'ipotesi, qualora il livello di significatività sia sufficientemente alto, che le sequenze conservate delle suddette proteine abbiano una funzione simile e, dunque, siano implicate durante il processo dell'autofagia. È di fondamentale importanza l'indagine delle interazioni proteina-proteina allo scopo di caratterizzare e comprendere i processi biologici a livello molecolare dal momento che esse svolgono un ruolo chiave all'interno della cellula durante la formazione di strutture macromolecolari cellulari e complessi enzimatici necessari per la regolazione delle vie di trasduzione del segnale (Ferro e Trabalzini, 2013).

## **3 SISTEMA DEL DOPPIO IBRIDO DEL LIEVITO**

### **3.1 Generalità sulla tecnica del doppio ibrido del lievito**

La tecnica del doppio ibrido del lievito, Y2H, descritta per la prima volta da Fields e Song nel 1989, può rappresentare un utile strumento nello studio e nella conferma delle interazioni di una coppia di proteine, di seguito nominate generalmente come "X" e "Y". Questo approccio si basa sull'osservazione che i fattori di trascrizione eucariotici possiedono una

struttura modulare formata da due domini di interazione fisicamente separabili. Una volta separati, questi perdono la loro attività trascrizionale che può essere recuperata solo se posti nuovamente in prossimità l'uno dell'altro. Il dominio che lega il DNA (BD = binding domain) lega una specifica sequenza di DNA nella regione del promotore di un gene mentre il dominio di transattivazione (AD = activating domain) è in grado di contattare altre proteine del meccanismo trascrizionale per dare il via al processo di trascrizione. Questa tecnica prevede che il gene che codifica per la proteina X venga clonato all'interno di un plasmide che presenta la sequenza codificante per il dominio BD, separatamente il gene codificante per la proteina Y viene clonato in un secondo plasmide che presenta la sequenza codificante per AD. Attraverso questa fusione verranno create due proteine ibride BD-X e AD-Y che vengono co-espresse in un ceppo di lievito recante dei geni reporter a valle del fattore di trascrizione. In questo modo, l'associazione fisica tra X e Y nelle cellule del lievito porta conseguentemente all'avvicinamento dei domini BD e AD che, potendo funzionare in prossimità l'uno dell'altro senza legame covalente, ricostituiscono il fattore di trascrizione originario ed attivo che è ora in grado di guidare la trascrizione dei geni reporter. L'interazione tra X e Y è verificata fenotipicamente attraverso l'osservazione della crescita cellulare o mediante un test enzimatico. I ceppi di lievito utilizzati per la verifica dell'interazione proteica presentano delle mutazioni dei geni coinvolti nella biosintesi di alcuni amminoacidi che, se omessi dal terreno di coltura, ne determinano l'incapacità di crescita che potrà essere ripristinata solo attraverso l'inserimento nei plasmidi degli specifici geni reporter all'interno delle cellule (Ferro e Trabalzini, 2013).

### **3.2 Conferma dell'interazione tra AMBRA1 e BECN1 attraverso la tecnica Y2H**

Ambra1 è stata descritta nei vertebrati per la prima volta in uno studio del 2007 che ha riportato l'isolamento della proteina e ne ha studiato la regolazione ed il coinvolgimento nell'autofagia attraverso il suo legame con Beclin1 nella crescita e nella morte cellulare attraverso l'osservazione di

mutanti AMBRA1 caratterizzati da gravi difetti durante la formazione del tubo neurale. Allo scopo di indagare i processi molecolari regolati da AMBRA1 è stata utilizzata la tecnica del doppio ibrido del lievito, seguendo il protocollo Clontech, per identificare gli interattori della proteina di interesse. La proteina di interesse, anche indicata con il termine di “bait protein”, viene espressa in fusione con il dominio di legame del DNA, BD, del fattore di trascrizione Gal4 mentre la proteina esca, indicata come “prey protein”, viene espressa in fusione al dominio di attivazione, AD, di Gal4. Quando le proteine interagiscono, i due domini si avvicinano attivando la trascrizione di geni reporter indipendenti: ADE2 e HIS3. HIS3 consente alla cellula di sintetizzare istidina e permette la crescita su un suolo minimo di istidina mentre ADE2 consente alle cellule di sintetizzare adenina e di crescere su un suolo minimo di adenina. Questo studio ha permesso di isolare un nuovo gene, Ambra1, coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso nel topo e di riconoscere Ambra1 come regolatore positivo di Beclin1, uno dei principali fattori che guidano la formazione degli autofagosomi durante il processo dell'autofagia. Affinché venga generato un gene in grado di codificare per la proteina di interesse sotto forma di ibrido con GAL4 DNA-BD è necessario clonare AMBRA1 in fusione con il dominio di legame del DNA all'interno del plasmide pGBKT7. A questo scopo pGBKT7-AMBRA1 è stato generato tramite la clonazione della regione N-terminale della proteina nei siti EcoRI e BglII del plasmide. Isolando il gene AMBRA1, questo frammento di DNA può essere inserito in un vettore plasmidico in modo che esso possa essere co-trasfettato all'interno delle cellule del lievito. Il DNA complementare che codifica per i primi 667 amminoacidi dell'ortologo umano di AMBRA1 è stato allineato con sequenze degli organismi *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Danio rerio* e, in seguito alla consultazione delle librerie di cDNA del cervello umano, è stato individuato il clone codificante per la proteina Atg BECN1, componente del complesso Vps34. Il cDNA umano di BECN1 viene ottenuto attraverso l'amplificazione PCR e clonato nei siti EcoRI e NotI del plasmide pCLPCX. Le cellule del lievito sono state co-trasfettate con i plasmidi descritti precedentemente e sono state piastrate in un mezzo



nelle condizioni di presenza ed assenza degli amminoacidi istidina ed adenina. Le cellule 2FTGH vengono co-infettate con vettori retrovirali codificanti BECN1 ed AMBRA1 taggata Myc. L'estratto proteico viene sottoposto ad immunoprecipitazione attraverso l'utilizzo degli anticorpi anti-Myc ed anti-BECN1 e viene analizzato attraverso la tecnica del western blot, confermando l'interazione AMBRA1-BECN1 (Fimia et al.; 2007).

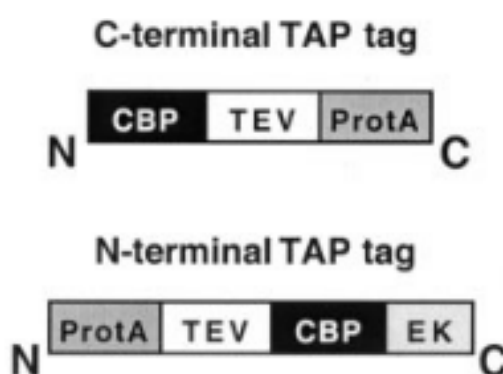
### **3.3 Utilizzo di Y2H come un efficace strumento per lo studio delle interazioni proteiche nelle piante**

Il sistema finora descritto offre notevoli vantaggi nello studio delle vie di segnalazione cellulare in vivo permettendo non solo di verificare delle putative interazioni proteiche ma anche di conoscere nuovi partner interagenti. Inoltre, dimostra un alto livello di sensibilità anche al rilevamento di interazioni deboli o transitorie e ad un basso costo dal momento che non necessita della produzione di anticorpi e della purificazione delle proteine. Inoltre, le librerie di espressione del cDNA possono essere facilmente utilizzate per isolare le proteine che interagiscono con la proteina d'interesse. La tecnica del doppio ibrido del lievito è stata largamente utilizzata all'interno del mondo vegetale allo scopo di scoprire i complessi proteici coinvolti in processi molecolari come lo sviluppo dei fiori, meccanismi di incompatibilità, ritmi circadiani, resistenza alle malattie e segnalazione fitormonale. Tuttavia, questa tecnica presenta delle limitazioni intrinseche come la possibilità di ottenere dei falsi positivi dal momento che le proteine, pur interagendo durante il test del doppio ibrido del lievito, non lo farebbero nel contesto biologico se non sono espresse contemporaneamente nello stesso compartimento cellulare. L'utilizzo di più geni reporter è di fondamentale importanza nell'eliminazione di un gran numero di falsi positivi. Inoltre, un terzo partner può collegare l'esca e la preda che non possono più interagire direttamente (Ferro e Trabalzini, 2013).

## 4 PURIFICAZIONE DEL COMPLESSO MEDIANTE *Tandem affinity purification*

### 4.1 Generalità sulla tecnica TAP

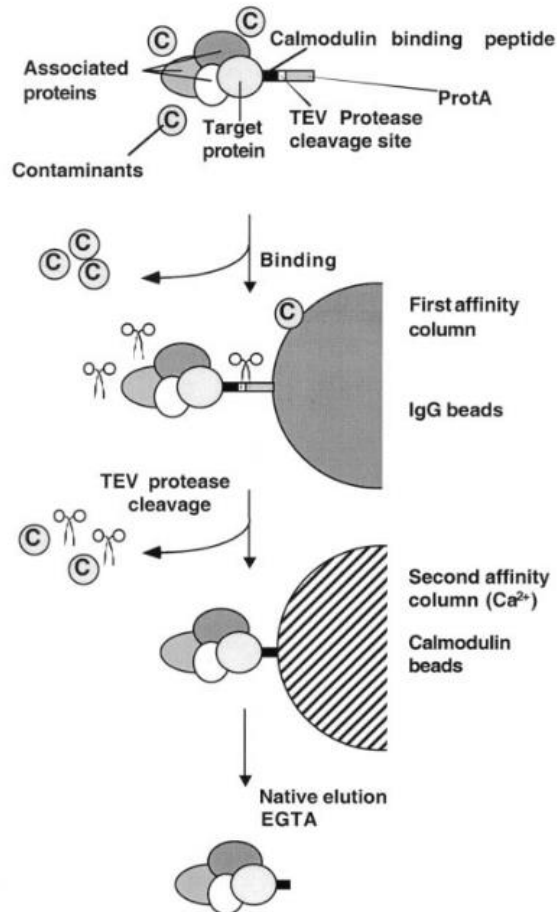
La tecnica di purificazione del complesso mediante TAP, indicata con il termine di “Tandem affinity purification” combinata con la spettrometria di massa è l’analisi più largamente utilizzata per la purificazione e l’identificazione dei complessi multiproteici. Il metodo permette l’isolamento di complessi proteici attraverso l’introduzione di un costrutto all’interno di una linea cellulare costituito dalla fusione di un tag, denominato TAP tag, ad una delle estremità della proteina di interesse. Successivamente, il complesso proteico derivante dall’interazione tra la proteina target e i suoi partner interagenti può essere isolato mediante uno schema di purificazione basato su due step sequenziali, approccio che permette di ridurre il numero di errori dovuto ad interazioni non specifiche. Il TAP tag è formato da 2 unità leganti l’immunoglobulina (IgG) della proteina A dell’organismo *Staphylococcus aureus* (ProtA) e da un peptide legante la calmodulina (CBP) che sono separati dal sito di scissione TEV di *Nicotiana tabacum*, anche conosciuto come virus del tabacco, e consente il rilascio proteolitico del materiale legato alle IgG in condizioni native (figura 6).



**Figura 6. Rappresentazione schematica del TAP tag.** (Fonte: Puig et. al, 2001).

In seguito alla formazione del costrutto di fusione e alla sua espressione nelle cellule dell’organismo, il complesso può essere sottoposto a due

distinte fasi di purificazione. La prima fase di purificazione prevede l'aggiunta all'estratto proteico di sfere di immunoglobulina G che legano i domini della proteina A. La proteina di interesse e le proteine interagenti possono essere rilasciate dalle sferette grazie alla proteasi TEV che rompe il tag nel sito di scissione TEV (figura 7).



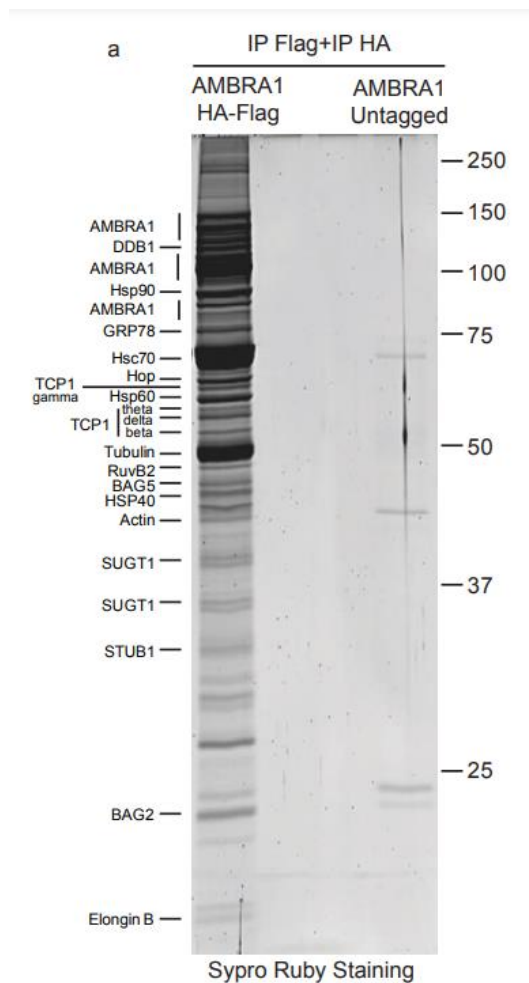
**Figura 7. Rappresentazione schematica del processo di purificazione mediante TAP.** (Fonte: Puig et. al, 2001).

La seconda fase di purificazione consiste nell'introduzione di sferette ricoperte di calmodulina che, in presenza di calcio, si legano al restante pezzo del tag, ossia al peptide legante la calmodulina, ancora legato al complesso proteico. Questa seconda fase di purificazione permette di separare la proteina di interesse insieme alle sue proteine interagenti (figura

7). L'eluato finale può, quindi, essere analizzato mediante elettroforesi su gel e spettrometria di massa (Leene et. al., 2008).

#### **4.2 Utilizzo della TAP per identificare il complesso proteico legato ad AMBRA1**

Nella pubblicazione del 2014 su *Developmental Cell* Antonioli e collaboratori hanno riportato i risultati ottenuti sperimentalmente durante la regolazione temporale della risposta autofagica procedendo con la caratterizzazione dei regolatori di AMBRA1 mediante TAP. Da questo studio è emerso che le proteine interagenti sono rappresentate soprattutto da membri della famiglia Cullin E3 ubiquitina ligasi. Per l'identificazione delle proteine che interagiscono con AMBRA1 sono state utilizzate cellule di fibroblasti umani 2FTGH in cui sono stati inseriti dei vettori retrovirali codificanti per AMBRA1 marcata con Flag-emoagglutinina (HA) e codificanti per la proteina GFP, utilizzando anche AMBRA1 privata del tag come controllo negativo. L'estratto proteico ottenuto è stato sottoposto a due stadi di purificazione sequenziale attraverso l'utilizzo di anticorpi anti Flag e anti HA. In seguito, gli immunocomplessi sono stati analizzati tramite spettrometria di massa MALDI-TOF. La spettrometria di massa è una tecnica analitica ampiamente utilizzata nel campo della biologia molecolare che permette la misurazione del peso molecolare delle macromolecole di studio al fine di determinare la loro natura. La classe più rappresentata di proteine interagenti corrisponde agli adattatori di Cullin E3 ubiquitina ligasi come Elongina B (Elo B) appartenente alla famiglia CUL5, SUGT1 appartenente alla famiglia CUL7 e DDB1 appartenente alla famiglia CUL4A/B (figura 8).

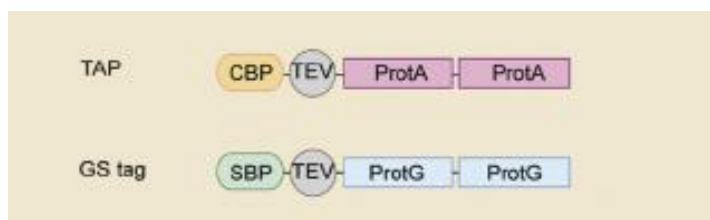


**Figura 8. Risultati ottenuti dal processo di purificazione mediante TAP.** (Fonte: Antonioli et. al, 2014).

Successivamente ai risultati ottenuti, è stata condotta una nuova analisi dell'interattoma attraverso l'utilizzo della tecnica TAP basata sull'etichettatura di isotopi stabili da parte di aminoacidi in coltura cellulare che ha portato ai medesimi risultati. Si tratta di una tecnica proteomica che si basa sull'incorporazione di aminoacidi essenziali (marcatura leggera) e aminoacidi isotopici (marcatura pesante) nella coltura cellulare, portando alla sintesi di proteine marcate in maniera pesante e leggera. In seguito all'estrazione delle proteine, queste vengono analizzate alla SM (Antonioli et al., 2014).

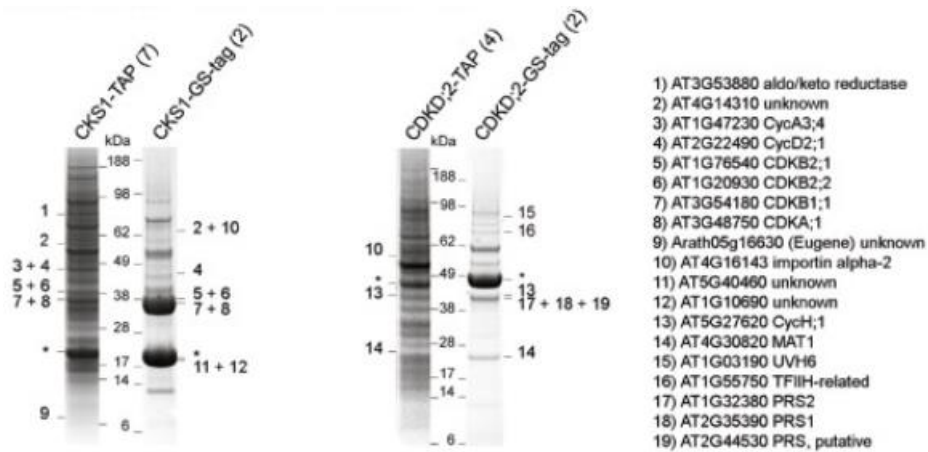
#### **4.3 Ottimizzazione della TAP per la purificazione di complessi proteici nei vegetali attraverso il tag GS**

La purificazione attraverso TAP è stata originariamente sviluppata allo scopo di determinare le interazioni nel lievito, bensì ha dimostrato la sua efficacia nella mappatura dell'interazione proteica nel lievito e nel campo animale, anche nei mammiferi, ma l'approccio è rimasto arretrato per quanto riguarda la ricerca sulle piante in cui sono stati segnalati un numero limitato di purificazioni. Le purificazioni a partire da materiale vegetale che sono state portate a termine, in *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, sono state eseguite principalmente attraverso il tradizionale tag del lievito oppure attraverso il TAPi ossia un TAP-tag migliorato che contiene gli stessi moduli del tag tradizionale ma possiede una sequenza di codoni ottimizzata per le piante e un introne per una maggiore espressione genica. I problemi associati a questo metodo sono il risultato della difficoltà di ottenere un'efficiente ricombinazione omologa nelle piante superiori per cui la proteina endogena e la controparte associata al tag competono per il sito di assemblaggio del complesso. Per aumentare il tasso di successo della purificazione viene proposto di utilizzare piante mutanti per la proteina endogena che viene soppressa oppure aumentare la concorrenza mediata dalla sovraespressione dell'esca. Inoltre, permane il problema legato ai falsi positivi che può essere eventualmente aggirato con purificazioni parallele ripetute di diversi eluati proteici. Al fine di ottimizzare il processo di purificazione è stato ideato un tag alternativo in grado di aumentare di 10 volte il recupero dell'esca rispetto al tradizionale TAP tag e prevede la combinazione di due domini di legame IgG della proteina G con un peptide legante la streptavidina separati da due siti di scissione TEV (figura 9).



**Figura 9. Illustrazione delle strutture del TAP tag e del GS tag.** (Fonte: Leene et. al, 2008, modificato).

Allo scopo di definire il GS tag come più efficiente per la purificazione in pianta, i ricercatori hanno utilizzato l'organismo modello *Arabidopsis thaliana* per identificare i partner interagenti delle proteine CKS1 e CDKD;2 operando il confronto tra un protocollo che prevede l'utilizzo del GS-tag e uno che prevede quello del TAP-tag (figura 10).



**Figura 10. Risultati ottenuti dalla purificazione con TAP tag e GS tag per le proteine CKS1 e CDKD;2.** (Fonte: Leene et. al, 2008, modificato).

La maggior parte degli interattori di CKS1 individuati in 7 purificazioni avvenute con il tradizionale TAP tag, sono stati rilevati e confermati con sole 2 purificazioni seguendo il protocollo di utilizzo del GS tag (figura 11); mentre nuove interazioni significative sono state trovate per CDKD;2 con il GS tag che non erano state rilevate con il TAP tag (figura 12) (Leene et. al., 2008).

a) Confirmed proteins purified with CKS1 fused to GS tag from 2 purification experiments.

<i>Prey</i>	<i>MW</i>	<i>Peptide Count</i>	<i>Seq coverage %</i>	<i>Protein score/ threshold</i>	<i>Best ion score/ threshold</i>
AT3G48750 CDKA;1	34160	16	49	585/61	86/31
AT3G54180 CDKB1;1	35524	5	24	277/61	115/31
AT1G76540 CDKB2;1	35741	10	33	252/61	80/31
AT1G20930 CDKB2;2	37223	7	23	235/61	80/31
AT2G22490 CYCD2;1	41124	15	49	551/61	99/31
AT4G14310 unknown	106008	11	15	292/61	80/31
AT4G16143 importin alpha-2	50097	11	31	72/61	
AT5G40460 unknown	12932	6	47	255/61	91/31
AT1G10690 unknown	12329	6	39	152/61	38/31

b) Confirmed proteins purified with CKS1 fused to TAP tag from 7 purification experiments.

<i>Prey</i>	<i>MW</i>	<i>Peptide Count</i>	<i>Seq coverage %</i>	<i>Protein score/ threshold</i>	<i>Best ion score/ threshold</i>
AT3G53880 aldo/keto reductase	35185	9	38	79/61	
AT3G48750 CDKA;1	34123	7	31	312/61	92/31
AT3G54180 CDKB1;1	35524	4	20	178/61	99/31
AT1G76540 CDKB2;1	35741	14	38	83/61	
AT1G20930 CDKB2;2	36052	2	8	79/61	49/31
AT1G47230 CYCA3;4	42647	4	14	110/61	78/31
AT2G22490 CYCD2;1	41124	12	31	73/61	
AT4G14310 unknown	106008	9	12	219/61	60/31
Arath05g16630 Eugene unknown	3896	4	96	75/61	

**Figura 11. Tabella delle proteine interagenti con CKS1 risultate dalla purificazione con TAP tag e GS tag. (Fonte: Leene et. al, 2008).**

c) Confirmed proteins purified with CDKD;2 fused to GS tag from 2 purification experiments.

<i>Prey</i>	<i>MW</i>	<i>Peptide Count</i>	<i>Seq coverage %</i>	<i>Protein score/ threshold</i>	<i>Best ion score/ threshold</i>
AT5G27620 CYCH;1	38448	13	53	731/61	110/31
AT4G30820 MAT1	20149	12	47	426/61	112/31
AT2G35390 PRS 1	38647	7	26	108/61	43/31
AT1G32380 PRS 2	43819	7	22	137/61	43/31
AT2G44530 PRS, putative	42926	6	25	106/61	41/31
AT1G55750 TFIIF-related	67586	13	31	131/61	45/31
AT1G03190 UVH6	87093	31	44	1030/61	97/31

d) Confirmed proteins purified with CDKD;2 fused to TAP tag from 4 purification experiments.

<i>Prey</i>	<i>MW</i>	<i>Peptide Count</i>	<i>Seq coverage %</i>	<i>Protein score/ threshold</i>	<i>Best ion score/ threshold</i>
AT5G27620 CYCH;1	38448	9	33	361/61	89/31
AT4G16143 importin alpha-2	50097	2	20	59/61	47/31
AT4G30820 MAT1	20149	6	40	71/61	

**Figura 12. Tabella delle proteine interagenti con CDKD;2 risultate dalla purificazione con TAP tag e GS tag. (Fonte: Leene et. al, 2008).**



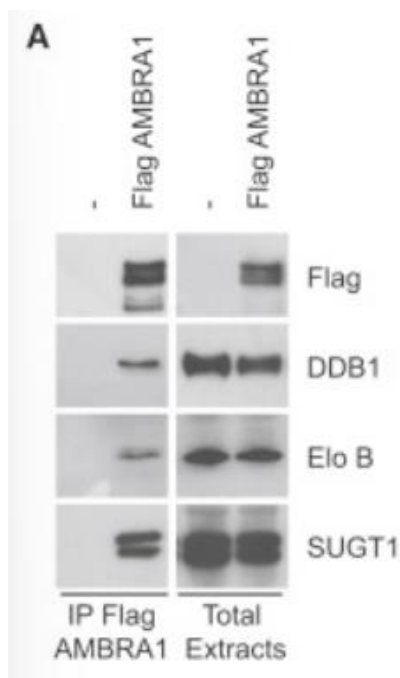
## **5 IMMUNOPRECIPITAZIONE**

### **5.1 Generalità sul metodo IP**

L'immunoprecipitazione, IP, rappresenta una tecnica popolare e largamente utilizzata allo scopo di identificare e verificare le interazioni molecolari più rilevanti e, attraverso la selezione di una specifica proteina, viene reso possibile l'isolamento dell'intero complesso proteico ad essa associato. La tecnica della co-immunoprecipitazione, Co-IP, rappresenta un'evoluzione della tecnica IP, e, a differenza di quest'ultima che viene utilizzata soprattutto per l'isolamento di una particolare proteina al fine di caratterizzarla nelle sue proprietà o nelle molecole che interagiscono con essa, la Co-IP viene eseguita per la verifica delle interazioni proteiche. Infatti, questo metodo prevede l'utilizzo di anticorpi che, legandosi specificatamente ai corrispondenti antigeni delle proteine di studio, ne permettono l'isolamento e, indirettamente, anche quello delle proteine che fisiologicamente interagirebbero con le molecole target. In entrambi i casi, le due tecniche mostrano una forte utilità nel rilevamento delle interazioni proteiche allo scopo di svelare i complessi molecolari che coordinano le diverse funzionalità delle cellule. Il processo di identificazione delle interazioni cellulari prevede innanzitutto l'allestimento del campione cellulare da analizzare che esprime la proteina di interesse, al fine di verificare l'ipotesi che essa sia parte di un complesso proteico più ampio, viene operata la lisi attraverso la distruzione delle membrane cellulari. Conseguentemente, le proteine intracellulari vengono rilasciate e possono, dunque, essere estratte e sottoposte a centrifugazione. L'estratto cellulare, raccolto dal surnatante, viene incubato con biglie che possiedono sulla loro superficie anticorpi specifici per gli antigeni presenti sulle proteine di studio e, in seguito alla precipitazione dei complessi proteici, esse vengono raccolte insieme alla proteina di interesse e le proteine che, a loro volta, interagiscono con essa. I complessi proteici sono sottoposti ad un lavaggio che permette di rimuovere le proteine che si sono legate in maniera non specifica mentre quelle rimanenti sono analizzate attraverso il metodo dell'immunoblotting (Jiang et al., 2022).

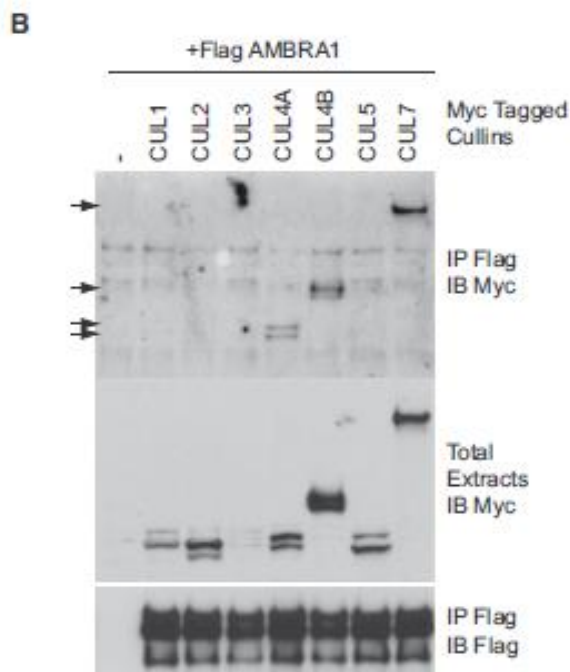
## 5.2 Utilizzo del metodo IP per verificare le interazioni di Ambra1 con i partner proteici individuati.

In seguito alla descrizione dei risultati ottenuti durante lo studio di Antonioli e collaboratori pubblicato nel 2014 su *Developmental Cell* sull'identificazione del complesso proteico legato ad AMBRA1, gli autori hanno convenuto che fosse utile verificare l'effettiva corrispondenza dell'interattoma purificato insieme alla proteina target attraverso la tecnica della coimmunoprecipitazione in vivo. I risultati dello studio hanno riportato che durante la risposta alla fame e nell'induzione dell'autofagia AMBRA1 forma un complesso proteico con alcuni membri appartenenti alla famiglia Cullin E3 ubiquitina ligasi quali Elongina B, SUGT1 e DDB1. Al fine di verificare l'effettiva interazione di AMBRA1 con questi adattatori è stata condotta un'ulteriore analisi delle proteine attraverso la tecnica dell'immunoprecipitazione utilizzando degli anticorpi specifici anti-DDB1, anti-Elongina B ed anti-SUGT1 all'interno degli immunocomplessi. L'analisi dei risultati conferma quanto precedentemente ottenuto dagli esperimenti di TAP (figura 13).



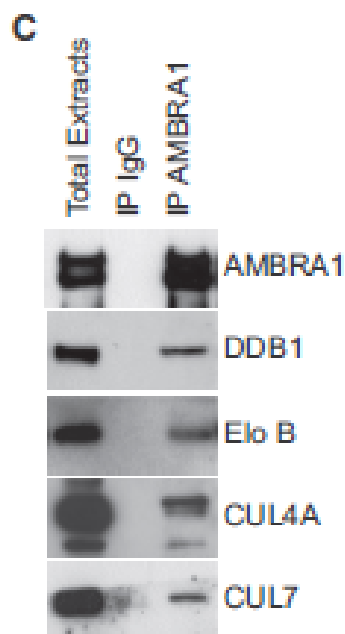
**Figura 13. Risultati degli esperimenti di immunoprecipitazione per la verifica dell'interazione con DDB1, Elo B e SUGT1.** La verifica delle interazioni proteiche avviene attraverso l'analisi dell'estratto totale di cellule 2FTGH esprimenti Flag-AMBRA1 utilizzando gli anticorpi anti-DDB1, anti-Elo B e anti SUGT1 (Fonte: Antonioli et al., 2014).

In seguito, allo scopo di dimostrare l'effettiva associazione di AMBRA1 con Flag-tag con i membri delle proteine Cullin con tag-Myc sono stati condotti ulteriori esperimenti di immunoprecipitazione. È stato, dunque, possibile verificare l'interazione attraverso la purificazione di AMBRA1 con Cullin 4A, Cullin 4B e Cullin 7 ma negli immunocomplessi non sono stati rilevati Cullin 2 né Cullin 5 (figura 14).



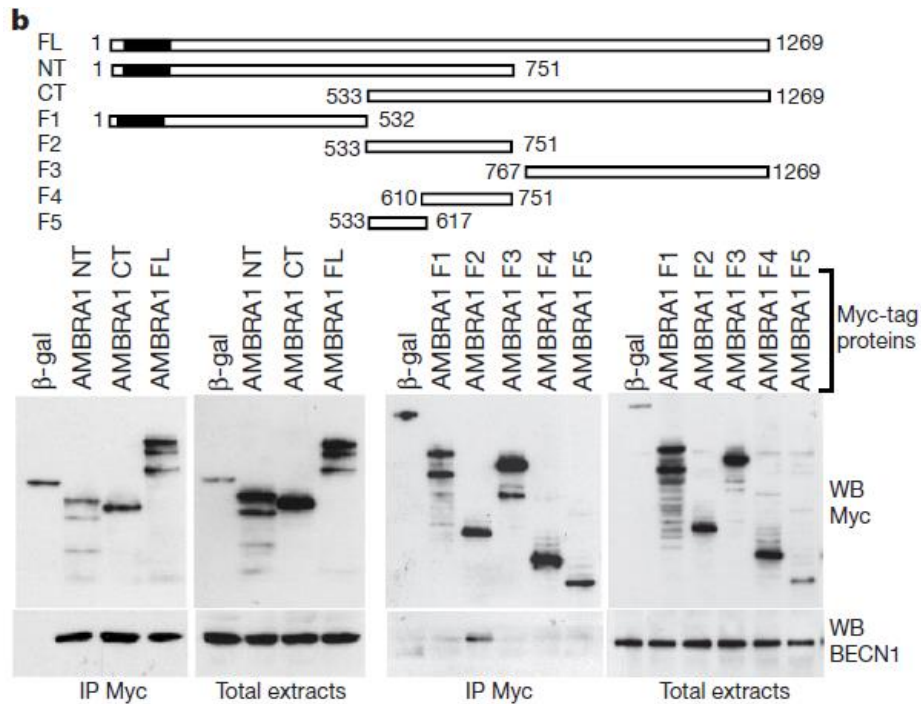
**Figura 14. Risultati degli esperimenti di immunoprecipitazione per la verifica dell'interazione di AMBRA1 con CUL1, CUL2, CUL3, CUL 4A, CUL 4B, CUL5 e CUL7.** La verifica delle interazioni proteiche avviene attraverso l'analisi dell'estratto totale attraverso l'utilizzo di anticorpi anti-Myc ed anti-Flag (Fonte: Antonioli et al., 2014).

DDB1 ed Elo B sono state immunoprecipitate in condizione di sazietà di nutrienti e in condizione di fame di nutrienti dopo 1 ora in cellule 2FTGH e ne è stata analizzata l'interazione con AMBRA1, Elo B, DDB1 e SUGT1 attraverso la tecnica del western blotting e l'utilizzo di anticorpi specifici (figura 15) (Antonioli et al. 2014).



**Figura 15. Risultati degli esperimenti di immunoprecipitazione a livello endogeno per la verifica dell'interazione di AMBRA1 con DDB1, Elo B, CUL4A e CUL7.** La verifica delle interazioni proteiche avviene attraverso l'analisi dell'estratto totale attraverso l'utilizzo di anticorpi anti-DDB1, anti-Elo B, anti-CUL4A ed anti-CUL7 (Fonte: Antonioli et al., 2014).

Un ulteriore utilizzo della tecnica è stato riportato nello studio condotto nel 2007 da Fimia e collaboratori e pubblicato sulla rivista *Nature*, il quale ha permesso di individuare AMBRA1 come un fattore centrale nella regolazione di BECLIN1 durante l'autofagia attraverso la loro interazione proteica individuata mediante la tecnica del doppio ibrido del lievito e, in seguito, confermata attraverso degli esperimenti di co-immunoprecipitazione. Questa verifica è stata condotta a livello delle cellule 2FTGH di fibroblasti umani, le quali sono state co-trasfettate con vettori retrovirali codificanti per BECN1 ed AMBRA1 a cui è stato fuso un Myc-tag. Successivamente, l'estratto proteico è stato sottoposto ad immunoprecipitazione con l'utilizzo di un anticorpo anti-Myc ed i complessi purificati sono stati analizzati attraverso la tecnica del western blot eseguita con anticorpi anti-Myc ed anti-BECN1. I risultati hanno confermato l'interazione della proteina di studio nella formazione di un complesso molecolare tra AMBRA1, BECN1 e Vps34 (figura 16) (Fimia et al.; 2007).



**Figura 16. Risultati degli esperimenti di co-immunoprecipitazione per la verifica dell'interazione AMBRA1-BECN1.** La verifica delle interazioni proteiche avviene attraverso l'analisi dell'estratto utilizzando gli anticorpi anti-Myc e anti-BECN1 (Fonte: Fimia et al., 2007).

## 6 RICERCA DELLE SEQUENZE OMOLOGHE IN *P. patens* ALLE PROTEINE INTERATTRICI DI AMBRA1

### 6.1 Ricerca delle sequenze omologhe in *Physcomitrium patens*

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) è uno strumento di ricerca di allineamento locale utilizzato durante il confronto di una sequenza, nucleotidica o proteica, di interesse con un database di sequenze già conosciute e presenti nelle banche dati. Grazie a questo algoritmo è possibile trovare le regioni simili all'interno di sequenze biologiche differenti, ricercando possibili domini proteici che sono in grado di mediare funzioni specifiche e che sono conservati in organismi diversi. Nel caso in cui la sequenza selezionata risulti molto simile ad una proteina od un gene di funzioni note allora è probabile che possano avere la stessa funzione o una funzione correlata. A questo scopo, di seguito sono riportate le sequenze amminoacidiche di alcune proteine interattrici di AMBRA1 isolate in *H. sapiens* durante gli esperimenti precedentemente descritti per permettere il

loro allineamento con proteine omologhe presenti in *P. patens*. Nel caso in cui la percentuale di identità delle sequenze abbia una significatività sufficiente allora è possibile avanzare l'ipotesi che queste proteine abbiano in *P. patens* la stessa funzione che hanno nei mammiferi e, attraverso studi futuri, testare il loro ruolo di regolazione come partner interagenti di AMBRA1 durante il processo autofagico. I risultati relativi al confronto delle sequenze proteiche delle proteine SUGT1, DDB1 e BECN1 purificate in *Homo sapiens* con le sequenze proteiche di *P. patens* mostrano la bontà dell'allineamento delle sequenze query con quelle trovate dal database (figura 17).

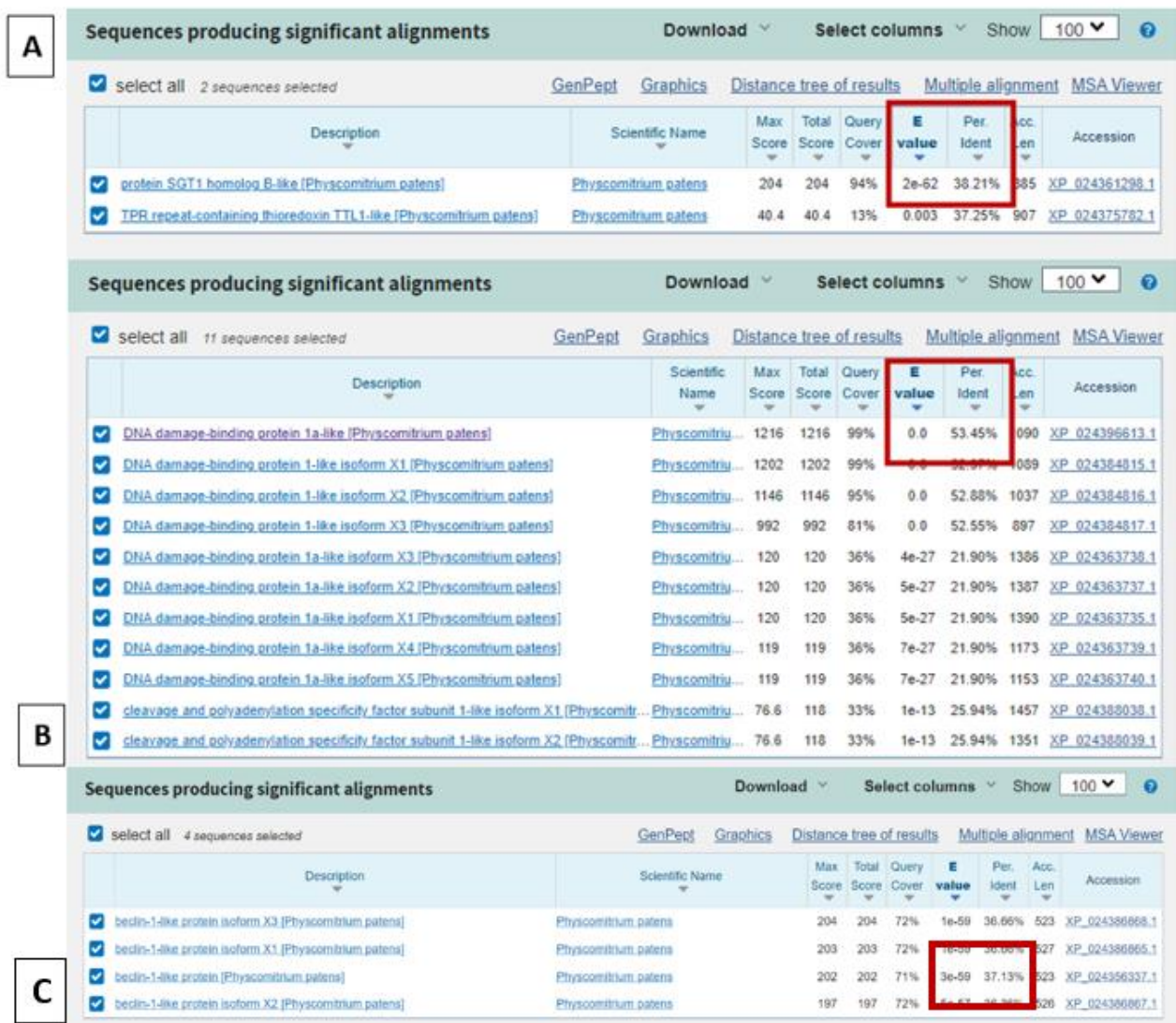
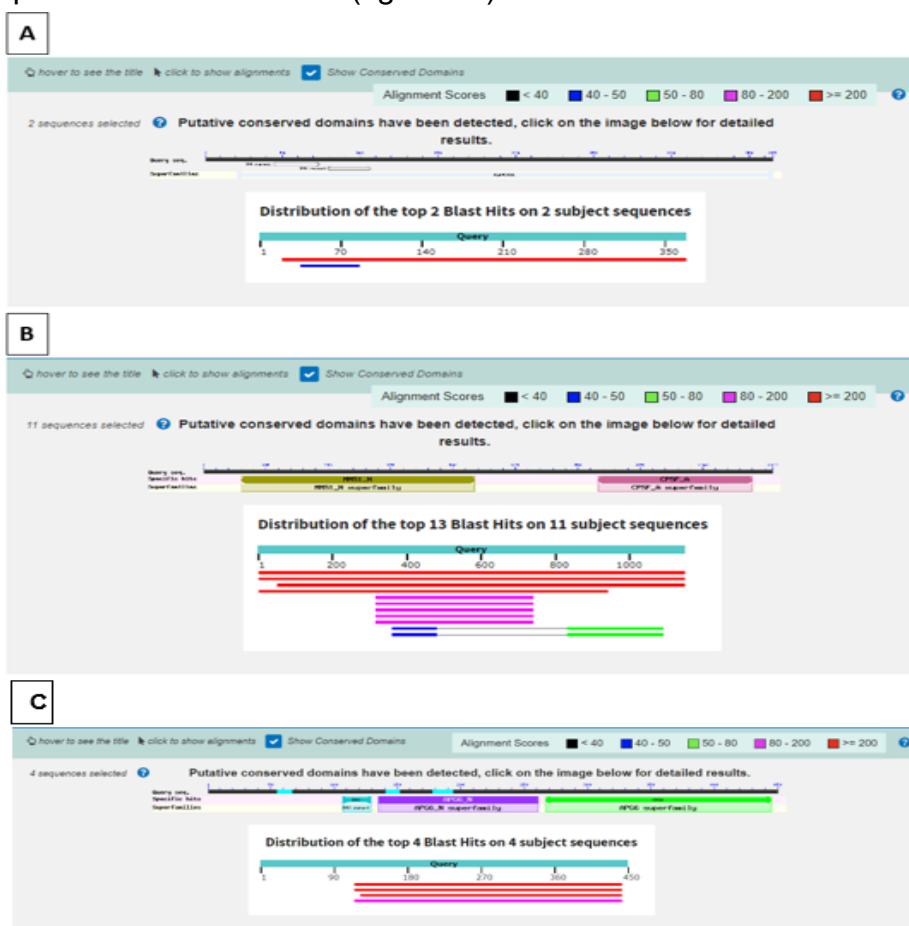


Figura 17. Risultati dell'allineamento BLAST per la proteina SUGT1 (A), DDB1 (B) e BECN1 (C) di *Homo Sapiens* (Fonte: NCBI).

I risultati riportano le proteine di *P. patens* che mostrano la maggiore similarità ed il calcolo della percentuale di identità con errore, rispettivamente del 38.21%, del 53.45% e del 37.13% per SUGT1, per DDB1 e per BECN1 nei risultati che mostrano il miglior allineamento. Il grafico che riporta l'allineamento relativo alla proteina SUGT1 mostra un'elevata conservazione della proteina per la prima sequenza riportata mentre risulta essere parziale e limitata alla regione N-terminale della proteina per la seconda sequenza riportata (figura 18). Per quanto riguarda, invece, i risultati di identità relativi alle proteine DDB1 e BECN1, questi mostrano un maggior livello di similarità e con un maggior set di sequenze disponibili all'allineamento (figura 18).



**Figura 18. Risultati grafici dell'allineamento BLAST per la proteina SUGT1 (A), DDB1 (B) e BECN1 (C) di *Homo Sapiens* (Fonte: NCBI).**

Le sequenze amminoacidiche delle due proteine che hanno mostrato il maggior livello di similarità, per SUGT1 (figura 19), DDB1 (figura 20) e BECN1 (figura 21), mostrano più precisamente quali siano i punti conservati lungo la proteina.

**protein SGT1 homolog B-like [Physcomitrium patens]**

Sequence ID: [XP\\_024361298.1](#) Length: 385 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 17 to 383 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
204 bits(520)	2e-62	Compositional matrix adjust.	141/369(38%)	207/369(56%)	26/369(7%)
Query 21	ALIDEDPQAAL EELTKALEQKPDQAQYQCQRAYCHILLGNYCVAADAKKSLELNPNINST				80
Sbjct 17	A +DED + A+ T+AL +P +A RA H L NY AVADA +++ELNP				76
Query 81	AMLRKGICEYHEKNYAAALETFTEGQKLD-----IETGFHRVQVGLQLLTSSDPP				131
Sbjct 77	A LRKGI +H + Y A +F G LD I ++ + ++ +S P				136
Query 132	ALDSQSAGITGADANFSWIKRCQ-----EAQNGSESEVWTHQS-----KIKYDWMYQTE				180
Sbjct 137	A SA S + E + S SEV + K ++ WYQ++				196
Query 181	SQVVITLMIKNVQKNDVNVFSEKELSAVLKLPSEGED-YNLKLELLHPIPEQSTFKVLS				239
Sbjct 197	S I + K ++K D+ V+F E+ LS ++K E+ Y + L I+P + ++ +LS				256
Query 240	TKIEIKLKKPEAVRWEKLEGGQDVPTPKQFVADVKNL--YPSSSPY-TRNWDKLVGeike				296
Sbjct 257	TK+EIKL K + +W++LE T K VA K++ YPSS+ +++HD++ E+K+				314
Query 297	eekneklegDAALNRLFQQIYSDGSDEVKRAMNKSFMESGGTVLSTNWSVGVGRKVEINP				356
Sbjct 315	EEK+EKLEGGDAALN+LF+ IYS ++ +RAMNKSF+ES GTVLSTNW DVGK+KVE +				374
Query 357	PDDMEWKKY 365				
Sbjct 375	P +H+ KK+ PTGMDHKKW 383				

**Figura 19. Risultati dell'allineamento della proteina SUGT1 di *Homo sapiens* con il suo omologo in *P. patens* (Fonte: NCBI).**



**DNA damage-binding protein 1a-like [Physcomitrium patens]**

Sequence ID: [XP\\_024396613.1](#) Length: 1090 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 4 to 1090 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1216 bits(3145)	0.0	Compositional matrix adjust.	612/1145(53%)	808/1145(70%)	65/1145(5%)
Query 3		YNYVVTAQKPTAVNGCVTGHFTSAEDLNLLIAKNTREIYVVTAEGLRPVKEVGMYGKIA			62
Sbjct 4		+NYVVTA KPT V G+FT+ ++LNL+IAK TR+EI+++TA GL+P+ +V +YG+IA WNYVVTAHKPTNVTHSCVGYFTNPQELNLLIAKCTRIEIHLLTASGLQPLDVPYIGRIA			63
Query 63		VMELFRPKGESKDLLFILTAKYNACILEYKQSGESIDIITRAHGMVODRIGRPSSETGIIG			122
Sbjct 64		+ELFRP GES+D+LFI +Y C+L++ E+ ++TRA G+V DRIGR++ G IG TLELFRPPGESQDVLFSFERVKFVLQW--DAETGLLVTRAMGDVSDRIGRPTDNGQIG			121
Query 123		IIDPECRMIGLRLYDGLFKVIPLDRDNKELKAFNIRLEELHVIDVKFLYGCQAPTICFVY			182
Sbjct 122		I+DP+CR+IGL LYDGLFKVIP+D + +AFNIRLEEL V+D+KFLYGC PTI +Y IVDPQCRILGLHLYDGLFKVIPIDNKGQLKEAFNIRLEELQVLDIKFLYGCAPTIAVLV			181
Query 183		QDPQ-GRHVKTVEVSLREKEFNKGPWKQENVEAEASHVIAVPEPFGGAIIGQESITYHN			241
Sbjct 182		QD + RHVKTVEV L+EK+F +GPW Q N++ A ++I VP P GGAIIG++I Y+N QDNKDARHVKTVEVQLKEKDFGEGPWLQNNLDNGAGLLIPVPLPGGAIIGQETIYYVN			241
Query 242		GDKYLAIAPPYIKQSTIVCHNRVDPNGSRYLKGMGRFLMLLLEKEEQMDGTVTLKDLR			301
Sbjct 242		G + AI I+ S + RVD +GSRYL D G L++L++ +++ + L GSVFKAIIP---IRPSITKAYGRVDSGSRYLSDHNGMLYLLVVISHDKE----RVSALN			293
Query 302		VELLGETSIAECLTYLDNGVVFVSGSLGDSQLVKLVNDSNEQGSYVVAEMFTNLGPVID			361
Sbjct 294		VE LGETS A L+YLDNGVVFVGS GDSQL+LN ++ +SYV +E++ NLGPIVD VEPLGETSAASTLSYLDNGVVFVGSYGSQQLRLNHQADAKNSYVVEVLESYVNLGPIVD			353
Query 362		MCVVDLERQGGQQLVTCGSAFKGSLRIIRNGIGIHEHASTDLPGIKGLWLRSDPNRET			421
Sbjct 354		+CVVDLERQGGQ+VTCGSAFK+GSLRI+RNGIGI+E AS +L GIKG+W LR+ + LCVVDLERQGGQVVTCSGSAFKDGSRLVIRNGIGINEQASAEQGIKGMWLRASSSDVY			413
Query 422		DDTLVLSFVGGQTRVLMN-GEEVEETELMGFVDDQDTFFCGNVAHQQLIQTISASVRLVS			480
Sbjct 414		D LV+SF+ +TR+L +N +E+EETE+ GF + QT FC N H QL+Q+T+ S+RLV DTFLVVSFISETRILAMNTDDELEETEIDGDFSEAOQLFCYNAVHDQLVQVTAAGSLRLVD			473
Query 481		QEPKALVSEWKEPQAKNISVASCNSQVVVAVGRA-LYYLQIHPQELRQISHTEMEHEVA			539
Sbjct 474		+ + ++EWK P I+VA+ N+SQV++A G L Y++I L +++H ++E+E++ AKTRRQLTEWKAPAMTINVATANASQVLLATGGNLVYIEIQGQTLVEVAHVQLEYEIS			533
Query 540		CLDITPLGDSNGLSPLCAIGLWTDISARILKLPSEFELLHKEMLGGEIIPRSLMTTFESS			599
Sbjct 534		CLDI P+GD+ S L A+G+WDIIS RI LPS L+ KEMLGGEIIPRSL+ +F+ CLDINPVGDNPERSNLVAVGMWTDISIRIFALPSLITKEMLGGEIIPRSLFCSFDGI			593
Query 600		HYLLCALGDGALFYFGLNIETGLLSDRKKVLTGTQPTVLRFRSLSTNVFACSDRPTVI			659
Sbjct 594		YLLCALGDG LF F LN TG LSDRKK++LGTQP LRTFRS +TT+VFA SDRPTVI AYLLCALGDGHLFNFTLNPATGELSDRKKISLGTQPIALRTRFRSMNTHVFAASDRPTVI			653
Query 660		YSSNHKLVSNNVNLKEVNYMCPNLSGYPDSLALANNSTLTIGTIDEIQKLHIRTVPVLE			719
Sbjct 654		YSSN KL++SNVNLKEVN+MCP NS +PDSL+ LTIGTIDEIQKLHIRTVP L E YSSNKKLVSNNVNLKEVNHMCPNLSAFPDSLAIKGEKELTIGTIDEIQKLHIRTVP LGE			713
Query 720		SPRKICYQEVSCFCVLSRRIEVQDTSGGTTALRPsastqalsssvssk1fssstAPHE			779
Sbjct 714		PR+I +QE S+ F + S++ AP HPRRIAHQEQSRTFAICSAK-----YAP--			736
Query 780		TSFGEEVEVHNLIIDQHTFVFLHAHQFLQNEYALSLVSCGLKGPNTYFIVGTAMVYPE			839
Sbjct 737		S GE+++E H + +I+ TFE++ E S+++C D N Y+ VGTA PE GNGEDMETHYVRLIEDQTFEIIISGFPLDPYENGCSIIITCSFTDSSNVYYCVGTAYALPE			796
Query 840		EAEPKQGRIVVFQYSDGKLQVAEKEVKGAVYSMVEFNGKLLASINSTVRLYEWTTE---			896
Sbjct 797		E+EP +GRI+VF DGK+Q VAEKEVKGAVY++ FNGKLLA IN + LY+WT ESEPSKGRILVFSVEDGKIQLVAEKEVKGAVYLNFAFNGKLLAGINQKIALYKWLTRDDG			856
Query 897		-KELRTECNHYNNIMALYKTKGDFILVGDLMRSVLLLAYKPMEGNFEEIARDFPNWM			955
Sbjct 857		+EL+ E +H+ +I+ALY+++GDFI+VGDLM+S+ LL YKP EG EE ARD+N NWM+ TRELQYESHHGHILALYVQSRGDFIVVGDLMKSISSLIYKPEEGAIEERARDYNANWMT			916
Query 956		AVEILDNDNFLGAENAFNLVFCQKDSAAATDEERQHLQEVGLFHLGFEVWVFCGSLVMQ			1015
Sbjct 917		AVEILDND +LGAEN+FNLF +K++ A TDEER L+ VG +HLGFEVW F HGSLVM+ AVEILDNDTFLGAENFNLFVTRKNDAATDEERGRLEVVGVEYHLGFEVWVFRHGLVMR			976
Query 1016		NLGETSTPTQGSVLFGTVNGMIGLVTLSSESWYNLLDMQNRNLNKKVSVGKIEHSFWRS			1075
Sbjct 977		L ++ +V+FGTVNG+IG++ SL + + L +Q L KVIK VG + H WRS -LPDSEASQIPTVIFGTVNGVIGVIASLPDQDFLFLQKLQQLVKVIVGGLSHEQWRS			1035
Query 1076		FHTERKTEPATGFIDGDLIESFLDISRPKMQEAVANLQYDDGSGMKREATADDLIKVVEE			1135
Sbjct 1036		F ERKT A F+DGLDIESFLD+SR KM+E+ +L E + ++L K VEE FSNERKTVDARNFLDGLDIESFLDLSRNKMEETATSL-----EVSVEELHKAVEE			1085
Query 1136		LTRIH 1140			
Sbjct 1086		LTR+H 1090			

**Figura 20. Risultati dell'allineamento della proteina DDB1 di *Homo sapiens* con il suo omologo in *P. patens* (Fonte: NCBI).**

### beclin-1-like protein [Physcomitrium patens]

Sequence ID: [XP\\_024356337.1](#) Length: 523 Number of Matches: 1

[See 2 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 177 to 492 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
202 bits(515)	3e-59	Compositional matrix adjust.	124/334(37%)	189/334(56%)	31/334(9%)
Query 123	FDIMSGQTDVDHPLCEECtdt1ldqldtq1NVTENECQNYKRCLILEQ----	MNEDDS			177
Sbjct 177	F+I S QT V+ PLC EC L ++LD Q+ N+ + Y CL+ LE+ +NE+D				236
Query 178	eqlqmelkelaleeer1IQELEdVEKNRIVAENLEKVVQAEERLDQEEAQYQREYSEFK				237
Sbjct 237	LKEKLAEEEDERRLEAAIR---DIEQQKEETMAQIHDVELKTEDFLELEEKFWHDFNDFK				293
Query 238	RQQLELDDELKSVENQMRYAQTQLDKLKKTNVFNATFHIWHSQGFGTINNFRGLRPLSVP				297
Sbjct 294	++ + ++ Q+QL+ LK+TNV N FHIWH G+FGTINNFRGLRPL+VP				353
Query 298	VEWNEINAAWGQTVLLHLALANKMGLKFQRYRLVPYGNHSYLES LTDKSKELPLYCSGGL				357
Sbjct 354	VEWDEINAAWGQACLLLHTMAQFCCLNFS-YQIIPMGSY- -KVADNKNTYELY--GPV				407
Query 358	RFFWDNKFHAMVAFLDVCVQQF-----KEEVEKGETRFCLPYRMDVEKGIKIEDTGGG				409
Sbjct 408	FW +++D AM F+ C++++ KE E F LPY+ +E K+E+				461
Query 410	GGSYSIKTQFNSEEQWKALKFMLTNLKWGLAWV		443		
Sbjct 462	---LTITQSFNRQERWTKALKLTLNKLWALYWL		492		

**Figura 21. Risultati dell'allineamento della proteina BECN1 di *Homo sapiens* con il suo omologo in *P. patens* (Fonte: NCBI).**

Per quanto riguarda Elo B, invece, non è stata trovata alcuna similarità significativa con le sequenze proteiche già conosciute nel muschio.

## 6.2 Ricerca delle sequenze omologhe nelle altre piante

Phytozome, il portale di Plant Comparative Genomics, è un database che permette la ricerca e l'analisi di dati del genoma vegetale, riportandone la sequenza, le famiglie di geni e la loro storia evolutiva. Questa banca dati fornisce, dunque, un utile strumento alla comunità scientifica per gli studi di genomica comparativa permettendo il confronto di sequenze appartenenti ai sistemi modello più utilizzati nella ricerca con altri organismi appartenenti al regno vegetale allo scopo di assegnare una funzione presunta alle sequenze ritrovabili in questi ultimi. Attraverso l'inserimento delle sequenze proteiche di SUGT1 (figura 22), DDB1 (figura 23) e BECN1 (figura 24) ritrovate nel genoma di *P. patens* è, dunque, possibile ricercare le similitudini con le sequenze presenti in altri organismi vegetali al fine di verificare che queste si siano conservate all'interno delle piante. I risultati

mostrano le proteine che possiedono la maggiore similarità con gli organismi *C. purpureus*, *S. magellanicum* e *S. fallax*, tutti organismi appartenenti alla divisione delle Briophyta.

Protein Homologs Export Add To Cart

<input type="checkbox"/>	Views	Organism	Transcript Name	Ortho	Score	Similarity	Define
<input type="checkbox"/>		<i>C.purpureus_R40</i> v1.1	CepurR40.8G172100.1	1-1	515	85.5%	(1 of 1) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>C.purpureus_GG1</i> v1.1	CepurGG1.8G166800.1	1-1	515	85.5%	(1 of 1) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v0.5	Sphfalx0107s0069.1	1-1	425	79.7%	(1 of 1) PTHR22904:SF344 - PROTEIN SGT1...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v1.1	Sphfalx04G109500.1	1-1	419	78.7%	(1 of 1) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>S.magellanicum</i> v1.1	Sphmag04G113600.1	1-1	410	80.5%	(1 of 1) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>M.polymorpha</i> v3.1	Mapoly0141s0033.1	1-1	396	71.8%	(1 of 1) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>L.sativa</i> V8	Lsat_1_v5_gn_8_6441.1	1-M	392	70.7%	(1 of 2) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>T.plicata</i> v3.1			390	72.6%	
<input type="checkbox"/>		<i>H.annuus</i> r1.2	HanXRQChr13g0392421	1-M	389	70.7%	Probable phosphatase-related
<input type="checkbox"/>		<i>H.annuus</i> r1.2	HanXRQChr14g0462581	1-M	378	69.4%	Probable protein SGT1 homolog
<input type="checkbox"/>		<i>L.sativa</i> V8	Lsat_1_v5_gn_2_131520.1	1-M	378	70.2%	(1 of 2) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>G.max</i> Wm82.a4.v1	Glyma.09G128800.1	1-M	374	66.5%	(1 of 5) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>G.soja</i> v1.1	GlysoP1483463.09G098800.1	1-M	374	66.5%	(1 of 5) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>G.max</i> Wm82.a2.v1	Glyma.09G128800.1	1-M	374	66.5%	(1 of 6) PTHR22904:SF344 - PROTEIN SGT1...
<input type="checkbox"/>		<i>G.max</i> Lee v1.1	GlymaLee.09G101300.1	1-M	374	66.5%	(1 of 5) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>G.max</i> Fiskeby v1.1	GlymaFiskIII.09G117500.1	1-M	373	66.5%	(1 of 5) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>G.max</i> Fiskeby v1.1	GlymaFiskIII.16G160100.1		372	67.3%	(1 of 5) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>P.acutifolius</i> v1.0	Phacu.CVR.004G131100.1		372	67%	phosphatase-related
<input type="checkbox"/>		<i>P.vulgaris_Labor_Ovalle</i> v1.1	PvLabOv.04G100600.1	1-M	372	67%	(1 of 2) K12795 - suppressor of G2 allele of S...
<input type="checkbox"/>		<i>G.max</i> Wm82.a2.v1	Glyma.16G176200.1	1-M	372	67.3%	(1 of 6) PTHR22904:SF344 - PROTEIN SGT1...

**Figura 22. Risultati delle omologie nel regno vegetale attraverso l'allineamento BLAST della proteina SUGT1 di *P.patens* (Fonte: Phytosome).**

Protein Homologs Export Add To Cart

<input type="checkbox"/>	Views	Organism	Transcript Name	Ortho	Score	Similarity	Define
<input type="checkbox"/>		<i>P.patens</i> v3.3	Pp3c15_18160V3.1		2149	97.2%	(1 of 7) PTHR10644 - DNA REP...
<input type="checkbox"/>		<i>C.purpureus_R40</i> v1.1	CepurR40.7G155500.1		2114	97.2%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>C.purpureus_GG1</i> v1.1	CepurGG1.7G121900.1		2110	97.2%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>C.purpureus_GG1</i> v1.1	CepurGG1.10G158000.1		2092	96.5%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>C.purpureus_R40</i> v1.1	CepurR40.10G162600.1		2092	96.5%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>S.magellanicum</i> v1.1	Sphmag09G031800.1	M-M	2054	95.2%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v1.1	Sphfalx07G080900.1		2052	94.9%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v0.5	Sphfalx0173s0001.1	M-1	2051	95.1%	(1 of 7) PTHR10644 - DNA REP...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v1.1	Sphfalx09G083300.1	M-M	2051	95.1%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>S.magellanicum</i> v1.1	Sphmag07G078200.1		2049	94.9%	(1 of 2) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>M.polymorpha</i> v3.1	Mapoly0054s0064.1	M-1	1991	93.1%	(1 of 1) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v0.5	Sphfalx0089s0076.1		1962	93%	(1 of 7) PTHR10644 - DNA REP...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v0.5	Sphfalx0302s0001.1		1960	93.4%	(1 of 7) PTHR10644 - DNA REP...
<input type="checkbox"/>		<i>S.moellendorffii</i> v1.0	145521	M-1	1926	91.7%	(1 of 4) PTHR10644 - DNA REP...
<input type="checkbox"/>		<i>S.fallax</i> v1.1	Sphfalx07G017700.1		1867	91.4%	(1 of 7) PTHR10644 - DNA REP...
<input type="checkbox"/>		<i>A.trichopoda</i> v1.0	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00023.81	M-1	1863	90.1%	(1 of 4) PTHR10644 - DNA REP...
<input type="checkbox"/>		<i>C.richardii</i> v2.1	Ceric.30G020500.1	M-1	1862	91.4%	(1 of 1) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>D.alata</i> v1.1	Dioal.1625s0024.1	M-1	1852	90.8%	(1 of 1) K10610 - DNA damage...
<input type="checkbox"/>		<i>M.acuminata</i> v1	GSMUA_Achr8T07200_001	M-1	1846	90.4%	(1 of 4) PF03178/PF10433 - C...
<input type="checkbox"/>		<i>A.coerulea</i> v3.1	Aqcoe1G185100.1	M-1	1840	89.9%	(1 of 6) PTHR10644 - DNA REP...

**Figura 23. Risultati delle omologie nel regno vegetale attraverso l'allineamento BLAST della proteina DDB1 di *P.patens* (Fonte: Phytosome).**

<input type="checkbox"/>	Views	Organism	Transcript Name	Ortho	Score	Similarity	Define
<input type="checkbox"/>		C.purpureus_R40 v1.1	CepurR40.6G188400.1	1-1	848	93.2%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		P.patens v3.3	Pp3c10_4130V3.1		808	88.7%	(1 of 2) PTHR12768 - BECLIN 1
<input type="checkbox"/>		S.magellanicum v1.1	Sphmag02G031700.1	M-1	775	86.6%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		S.fallax v1.1	Sphfalx02G030700.1	M-1	772	86.6%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		S.fallax v0.5	Sphfalx0069s0063.1	M-1	739	87.7%	(1 of 1) PTHR12768 - BECLIN 1
<input type="checkbox"/>		M.polymorpha v3.1	Mapoly0091s0016.1	M-1	655	79.2%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		T.plicata v3.1			653	79.2%	
<input type="checkbox"/>		S.moellendorffii v1.0	94233	M-1	629	76.3%	(1 of 1) PTHR12768 - BECLIN 1
<input type="checkbox"/>		L.sativa V8	Lsat_1_v5_gn_3_139961.1	M-1	629	77.8%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		A.officinalis V1.1	evm.model.AsparagusV1_01.340	M-1	626	76.5%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		S.polyrhiza v2	Spipo26G0016600	M-1	614	77%	Beclin 1 protein
<input type="checkbox"/>		V.vinifera v2.1	VIT_215s0046g00950.1	M-1	612	78%	
<input type="checkbox"/>		D.carota v2.0	DCAR_005384	M-1	611	75.9%	hypothetical protein
<input type="checkbox"/>		A.coeurulea v3.1	Aqcoe2G049600.1	M-1	609	77.5%	(1 of 1) PTHR12768 - BECLIN 1
<input type="checkbox"/>		Fx_ananassa v1.0.a1	maker-Fvb7-2-snap-gene-128.72-mRNA-1		604	75.6%	(1 of 4) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		D.alata v1.1	Dioal.0161s0060.1	M-1	602	74.6%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		D.alata v2.1	Dioal.20G068600.1	M-1	601	74.6%	(1 of 1) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		C.arabica v0.5	evm.model.Scaffold_2039.424	M-M	601	75.2%	(1 of 2) K08334 - beclin 1 (BECN...
<input type="checkbox"/>		A.trichopoda v1.0	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00162.2	M-1	599	78.5%	(1 of 1) KOG2751 - Beclin-like pr...
<input type="checkbox"/>		C.arabica v0.5	evm.model.Scaffold_513.61	M-M	597	75%	(1 of 2) K08334 - beclin 1 (BECN...

**Figura 24. Risultati delle omologie nel regno vegetale attraverso l'allineamento BLAST della proteina BECN1 di *P.patens* (Fonte: Phytosome).**

## 7 ETICHETTATURA ENZIMATICA DI PROSSIMITA' (PL)

### 7.1 Innovazioni e limitazioni della tecnica PL e comparazione con gli approcci molecolari convenzionali

L'approccio di etichettatura enzimatica di prossimità, PL, è stato recentemente sviluppato come metodo in grado di conferire una maggiore applicabilità e accessibilità allo studio delle vie cellulari, permettendo di superare alcune limitazioni rispetto alle tecniche molecolari esistenti ma che, allo stesso tempo, necessita ancora della sua combinazione con esse per la verifica delle interazioni proteiche. Questo metodo prevede che la proteina di interesse venga fusa ad un enzima catalitico e che vengano inseriti i suoi substrati corrispondenti in modo da attivare la reazione di marcatura covalente delle proteine prossimali alla proteina di interesse all'interno delle cellule viventi. La co-immunoprecipitazione identifica solamente interazioni ad alta affinità, risultando in un metodo poco ottimale per il rilevamento di interazioni deboli o transitorie. Inoltre, mostra scarsi risultati durante l'identificazione delle interazioni in cui sono coinvolte proteine insolubili come quelle associate alla membrana. L'approccio del doppio ibrido del lievito, invece, risulta laborioso durante la costruzione delle librerie di cDNA. Questo accade dal momento che le interazioni a bassa

affinità non vengono normalmente mantenute in seguito alla lisi cellulare e all'estrazione proteica, problema che viene risolto attraverso la biotinilazione delle proteine interagenti. L'approccio di etichettatura di prossimità risulta di maggiore efficienza nell'individuazione di PPI deboli, transitori o idrofobici nel loro stato nativo, rappresentando un potente strumento per la comprensione dei processi biologici ma, come per le altre tecniche ampiamente utilizzate nel campo animale, la sua applicazione nei sistemi vegetali è ancora nella sua infanzia (Yang et al., 2021).

## **7.2 Generalità ed evoluzione della tecnica PL**

Negli ultimi anni l'etichettatura enzimatica di prossimità è emersa come metodo innovativo per integrare i dati necessari alla comprensione dei meccanismi molecolari che regolano i processi fisiologici negli organismi animali, proponendo la possibilità di espandere questo sistema anche nei sistemi vegetali. Gli enzimi che vengono generalmente utilizzati sono la biotina ligasi BioID di *Escherichia coli* e l'ascorbato perossidasi APEX. APEX è una proteina che può biotinilare i residui di tirosina delle proteine che si trovano entro un raggio di 20 nm dalla proteina bersaglio in presenza di ATP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, che presenta lo svantaggio di essere tossica per le cellule, e biotina-fenolo a 37°C con un periodo di etichettatura ottimale di 1 minuto. Al fine di migliorare l'enzima, è stata sviluppata una variante con aumentata attività catalitica, APEX2, che permette di ottenere una più efficiente biotinilazione a bassi livelli di espressione enzimatica ed una riduzione dell'effetto tossico, necessitando di una minore concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e di biotina-fenolo. Un secondo enzima utilizzato durante la tecnica PL è BioID che, se da un lato utilizza biotina non tossica come substrato per la biotinilazione dei residui di lisina delle proteine presenti nel raggio di 10 nm, eliminando il problema dello stress ossidativo, dall'altro possiede un tempo di etichettatura nettamente superiore rispetto ad APEX che si aggira intorno alle 18-24 ore a 37°C. In seguito, è stata sviluppata una nuova versione anche di questo enzima, denominata BioID2, che ha l'ulteriore vantaggio di richiedere una concentrazione minore di biotina per la sua funzionalità. Recentemente, i vantaggi forniti dagli enzimi precedentemente descritti

sono stati combinati nella realizzazione degli enzimi TurboID e miniTurboID, che mostrano non solo una cinetica veloce e l'utilizzo di un substrato non tossico ma anche una attività catalitica funzionale a 25°C che rappresenta la temperatura ottimale di crescita per le cellule vegetali, rendendo questo sistema ampliabile alle piante (Yang et al., 2021).

### **7.3 Applicazione della tecnica PL in campo vegetale**

Il primo tentativo di applicazione della tecnica PL in campo vegetale è stato eseguito in uno studio del 2017 che ha permesso di identificare i partner interagenti con il fattore di trascrizione OsFD2 attraverso l'utilizzo dell'enzima BioID nella pianta del riso. Nei due anni successivi ulteriori studi hanno permesso di individuare nuove interazioni proteiche, sempre grazie all'enzima BioID, negli organismi *Nicotiana benthamiana* ed *Arabidopsis thaliana*; oltre ad una ricerca finalizzata al riconoscimento dell'interattoma della proteina ATG8 correlata all'autofagia. Successivamente, l'introduzione delle varianti TurboID e miniTurboID ha ampliato sostanzialmente il campo di utilizzo della tecnica PL, dimostrando l'efficienza di questi enzimi in diversi organismi vegetali. Inoltre, in uno di questi studi è stata riscontrata una più efficace attività di questi enzimi, attraverso il confronto dell'attività di BioID, BioID2, TurboID e miniTurboID, alle temperature di crescita delle piante con efficiente biotinilazione delle proteine prossimali e con tempi di etichettatura tra i 5-15 minuti (Mai et al., 2022). In particolare, questo studio condotto nel 2020 ha fatto luce sul confronto degli enzimi PL e sul loro potenziale di applicabilità in 3 diversi organismi vegetali. Il primo organismo che viene preso in considerazione è la pianta di pomodoro, *Solanum lycopersicum*, in cui gli enzimi sono stati espressi nelle cellule delle radici, confrontando l'applicabilità del metodo PL con BioID, BioID2, TurboID e miniTurboID. L'efficienza della biotinilazione è stata testata a livello dell'apparato radicale e i risultati hanno mostrato una cinetica più rapida per TurboID e miniTurboID rispetto a BioID e BioID2. Successivamente, l'efficienza dell'etichettatura è stata studiata nell'organismo *N. benthamiana* attraverso l'iniezione di biotina a livello delle cellule del mesofillo fogliare e in colture cellulari di *Arabidopsis*, portando a

conclusioni analoghe rispetto a quelle precedentemente raccolte e confermando TurboID come l'enzima con il maggior livello di biotinilazione. In contrasto con l'ampia applicazione del PL nei sistemi animali, il suo utilizzo nelle piante rimane ancora piuttosto inesplorato. Inoltre, i metodi PL non sono una conferma certa dell'interazione proteica diretta dal momento che la maggior parte degli enzimi utilizzati durante il processo di identificazione rilasciano il proprio substrato e diffondono causando la marcatura casuale di molecole che condividono la stessa posizione subcellulare della proteina esca, rendendo dunque fondamentale la verifica attraverso l'utilizzo di metodi complementari (Yang et al., 2021).

## **8 CONCLUSIONI**

Esistono molteplici vie di segnalazione essenziali per la crescita e lo sviluppo delle piante che controllano processi importanti come le vie di segnalazione ormonale e della luce, la difesa dai patogeni e dallo stress, la divisione cellulare e i ritmi circadiani. La maggior parte degli aspetti della crescita e della fisiologia delle piante sono regolati da reti di meccanismi di segnalazione con formazione di strutture macromolecolari e complessi enzimatici per la regolazione delle vie di trasduzione del segnale e non da percorsi di trasduzione del segnale lineare. In questo lavoro sono state descritte le più importanti tecniche biologiche che hanno permesso di ottenere informazioni dettagliate sulla regolazione e sui meccanismi molecolari della via autofagica attraverso lo studio delle interazioni proteiche in sistemi animali. Queste tecniche si sono rivelate degli strumenti di fondamentale importanza nella ricerca sulle interazioni proteina-proteina, e nonostante queste siano state focalizzate soprattutto in campo animale, in cui sono stati riportati numerosi progressi e scoperte collocando geni e proteine all'interno di un contesto funzionale; le stesse risultano ad un livello più arretrato nell'evoluzione del loro utilizzo nel mondo vegetale. Allo stesso tempo è emerso che non esiste un approccio più valido o efficiente per avere una chiara comprensione delle interazioni proteina-proteina e che ognuno, presentando vantaggi e svantaggi, risulta essere un potente alleato

che contribuisce alla ricerca sulla regolazione delle vie molecolari nelle piante. La cooperazione dei metodi, infatti, permette di riconoscere e verificare le principali interazioni proteiche ad alta affinità e di individuare anche quelle a bassa affinità, di confermare putativi partner delle proteine di studio, di conoscere la natura dei complessi molecolari ed il loro ruolo durante il funzionamento di processi cellulari fondamentali per la fisiologia dell'organismo e delle vie di trasduzione del segnale, fornendo un quadro ampio e dettagliato.



## 9 BIBLIOGRAFIA

1. Antonioli, M., Albiero, F., Nazio, F., Vescovo, T., Perdomo, A., Corazzari, M., Marsella, C., Piselli, P., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Cecconi, F., Piacentini, M., Fimia, G., AMBRA1 interplay with cullin E3 Ubiquitin ligases regulates autophagy dynamics. *Dev Cell* **31**, 734–746 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.013> (2014).
2. Avin-Wittenberg, T., Honig, A. & Galili, G. Variations on a theme: Plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* vol. 249 285–299 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0296-z> (2012).
3. Cianfanelli, V. *et al.* Ambra1 at a glance. *J Cell Sci* **128**, 2003–2008 (2015).
4. Ferro, E. & Trabalzini, L. The yeast two-hybrid and related methods as powerful tools to study plant cell signalling. *Plant Molecular Biology* vol. 83 287–301 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0094-4> (2013).
5. Jiang, Z., Yang, M., Cao, Q., Zhang, Y., Li, D. A Powerful Method for Studying Protein-Protein Interactions in Plants: Coimmunoprecipitation (Co-IP) Assay. *Methods in Molecular Biology* vol. 2400 87-92 Preprint at [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1835-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1835-6_9) (2021).
6. Magen, S., Seybold, H., Laloum, D. & Avin-Wittenberg, T. Metabolism and autophagy in plants—a perfect match. *FEBS Letters* Preprint at <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14359> (2022).
7. Mair, A. & Bergmann, D. C. Advances in enzyme-mediated proximity labeling and its potential for plant research. *Plant Physiol* **188**, 756–768 (2022).
8. Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A. R. & Avin-Wittenberg, T. Autophagy in Plants - What's New on the Menu? *Trends in Plant Science* vol. 21 134–144 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.008> (2016).
9. Qi, H., Xia, F. N. & Xiao, S. Autophagy in plants: Physiological roles and post-translational regulation. *Journal of Integrative Plant Biology* vol. 63 161–179 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jipb.12941> (2021).
10. Yang, X. *et al.* Proximity labeling: an emerging tool for probing in planta molecular interactions. *Plant Communications* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100137> (2021).

11. Zuin Ilenia, Analisi funzionale di AMBRA1, regolatore putativo della via autofagica nel muschio *Physcomitrella patens*. Tesi di laurea in Biologia Evoluzionistica, Università degli studi di Padova, a.a. 2019/20 (2020).