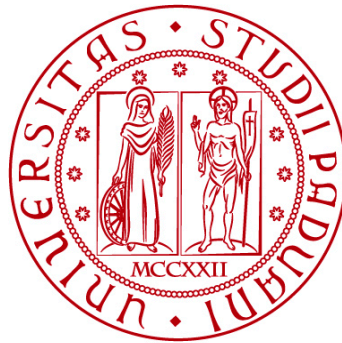


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Analisi dei livelli di espressione di subunità dei complessi respiratori in fibroblasti di paziente affetto da atassia di Friedreich, una malattia mitocondriale neurodegenerativa**

**Tutor: Prof.ssa Paola Costantini  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Federica Cavion**

**Laureando: Giacomo Veronese**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**

# Indice

<b>1. Abstract</b>	<b>2</b>
<b>2. Introduzione</b>	<b>2</b>
2.1 Atassia di Friedreich (FRDA)	2
2.2 Fratassina	4
2.3 Fratassina e catena respiratoria mitocondriale	6
<b>3. Scopo della tesi</b>	<b>8</b>
<b>4. Materiali e metodi</b>	<b>9</b>
4.1 Colture cellulari	9
4.2 Lisi cellulare e preparazione dei campioni	9
4.3 Saggio BCA ed elettroforesi su gel	10
4.4 Western blotting	11
4.5 Immunofluorescenza	13
<b>5. Risultati</b>	<b>16</b>
<b>6. Discussione e Conclusioni</b>	<b>21</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>24</b>

## **1. Abstract**

L'atassia di Friedreich (FRDA) è una malattia neurodegenerativa, causata da una diminuzione della proteina mitocondriale fratassina. Fratassina è coinvolta nella generazione dei centri Fe-S, componenti essenziali dei complessi I, II e III della catena respiratoria deputati al trasporto di elettroni.

Considerata la funzione di fratassina e la riduzione di alcune subunità dei complessi respiratori verificate precedentemente in linfoblasti FRDA, ho condotto analisi di western blot in fibroblasti di pazienti affetti da atassia di Friedreich per confermare l'effetto della riduzione di fratassina sulle subunità dei complessi della catena respiratoria contenenti centri Fe-S: la riduzione dei livelli di tali subunità è paragonabile a quella osservata nei linfoblasti.

Inoltre, si è valutata la possibilità di esprimere Nqo15, proteina del batterio *Thermus thermophilus* strutturalmente simile a fratassina e parte integrante del complesso I, in fibroblasti FRDA trasfettati con vettori lentivirali; sulla base di evidenze sperimentali ottenute precedentemente in laboratorio, si ipotizza che fratassina interagisca con il complesso I e che la sua diminuzione nelle cellule di pazienti possa provocare un danno a questo livello: l'eventuale complementazione del fenotipo respiratorio di cellule FRDA da parte di Nqo15 potrebbe confermare questa ipotesi, aprendo nuove prospettive nello studio del ruolo di fratassina nella fisiopatologia mitocondriale.

## **2. Introduzione**

### **2.1 Atassia di Friedreich**

L'atassia di Friedreich è una malattia cardio- e neurodegenerativa autosomica recessiva, in quanto riguarda principalmente il sistema nervoso, centrale e periferico, e la muscolatura scheletrica e cardiaca; in

aggiunta anche le isole pancreatiche del Langerhans (pancreas endocrino) risultano colpite dalla patologia.

I soggetti affetti da FRDA presentano tipicamente difetti nell'andatura, atassia degli arti, disartria e perdita o diminuzione dei riflessi; frequentemente si possono verificare anche disturbi visivi e uditivi, diabete mellito, cardiomiopatia e scoliosi, che spesso richiede un intervento chirurgico. Tale sintomatologia si manifesta attorno ai 10-16 anni, inizialmente con la comparsa del disturbo nell'andatura seguito poi da sintomi sempre più invalidanti che costringono il paziente alla sedia a rotelle dopo circa 15-20 anni dall'esordio della patologia. La morte prematura che si verifica in circa nel 60% dei pazienti è causata da sintomi non neurologici, specialmente dalla cardiomiopatia ipertrofica dovuta a difetti della muscolatura cardiaca.

L' atassia di Friedreich è dovuta ad una riduzione dei livelli della proteina fratassina conseguenti all'espansione della tripletta GAA nel primo introne del gene *FXN* che la codifica. Individui sani sono caratterizzati da un numero di espansioni inferiori o uguale a 40, mentre ripetizioni della tripletta superiori al valore soglia di 70 (generalmente i pazienti FRDA presentano 600-900 ripetizioni della tripletta) comportano lo sviluppo del fenotipo malato dovuto ad un meccanismo di silenziamento del gene stesso.

Infatti, l'espansione determina l'eterocromatizzazione del promotore riducendo i livelli di trascrizione genica di *FXN*: la quantità della proteina fratassina prodotta sarà quindi inferiore.

Questa alterazione del DNA è presente in omozigosi nella maggior parte dei pazienti (~96%) affetti da FRDA, mentre l'1-3% dei casi sono eterozigoti composti, cioè presentano due diverse mutazioni negli alleli di *FXN*: l'espansione della tripletta GAA in un allele e una mutazione puntiforme o una delezione nell'altro (Cook & Giunti, 2017).

Poiché fratassina sembra essere coinvolta nella formazione dei centri Fe-S (ISC), la sua ridotta espressione in cellule dei pazienti affetti da FRDA comporta una riduzione dell'espressione di proteine con centri Fe-S, presenti in numerose subunità dei complessi I, II e III della catena respiratoria mitocondriale.

Inoltre, in queste cellule tende a verificarsi un accumulo di Fe mitocondriale che è responsabile dell'aumento di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali concorrono al danno cellulare.

Dato che i meccanismi molecolari che portano allo sviluppo della malattia non sono ancora stati del tutto caratterizzati, attualmente non esistono delle cure per l'atassia di Friedreich; attualmente si eseguono dei trattamenti palliativi volti a contenere o rallentare lo sviluppo della patologia per migliorare le condizioni di vita di pazienti.

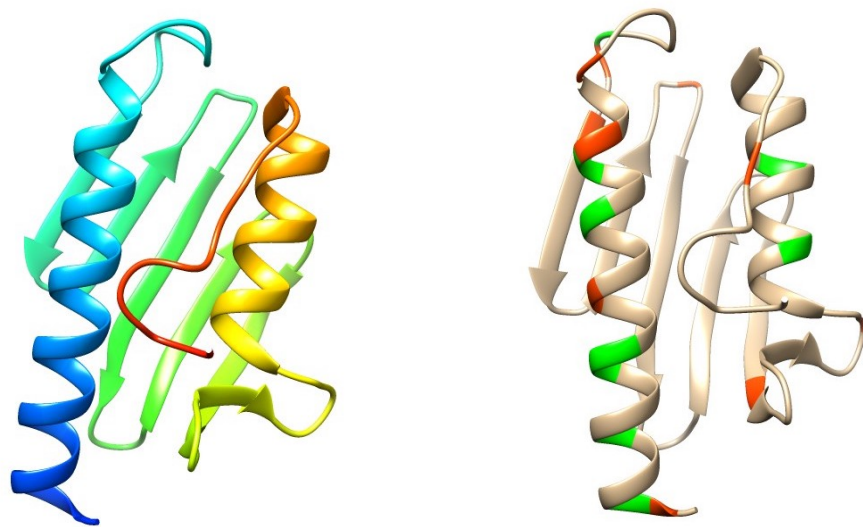
## 2.2 Fratassina

Fratassina è una piccola proteina mitocondriale altamente conservata tra organismi procarioti ed eucarioti.

Nell'uomo fratassina è prevalentemente espressa nei tessuti caratterizzati da un'elevata attività metabolica, come fegato, neuroni, pancreas, midollo spinale, muscolo scheletrico e cuore, che rappresentano i tessuti maggiormente colpiti da atassia di Friedreich.

La fratassina umana è codificata dal gene nucleare *FXN* come un precursore di 210 amminoacidi (23 kDa), il quale viene poi trasportato nei mitocondri, grazie alla presenza di una sequenza di *targeting* N-terminale, e processato proteoliticamente in due passaggi. Nel primo passaggio una peptidasi mitocondriale (MMP) esegue un taglio del precursore proteico tra Gly41 e Leu42, generando la forma intermedia i-FXN di 19 kDa; questa poi subisce un ulteriore taglio proteolitico a livello del residuo Ser81 che produce la forma matura della fratassina m<sub>81</sub>-FXN di 14.2 kDa (Schmucker *et al.*, 2008).

Considerato l'elevato grado di omologia tra i diversi ortologhi di fratassina, tale proteina presenta una struttura altamente conservata che consiste in due regioni ad  $\alpha$ -elica separate da 5-7 foglietti  $\beta$  anti-paralleli. Tra gli amminoacidi più conservati è importante considerare un gruppo di Asp e Glu localizzati tra  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  nella regione N-terminale della proteina (Figura 1); questo *pattern* è presente anche in altre proteine leganti metalli e suggerisce il ruolo di fratassina nel legare il ferro.



**Figura 1.** Struttura cristallografica di FXN *wild-type* umana (a sinistra) e posizione dei residui di aspartato, in rosso, e glutammato, in verde (a destra) (tratto da RCSB PDB)

Sebbene la funzione di fratassina non sia ancora stata chiaramente caratterizzata, in base ad evidenze sperimentali si pensa sia coinvolta nei seguenti contesti: (i) svolge la funzione di *chaperon* durante la formazione del gruppo Fe-S e del gruppo eme; (ii) è in grado di legare il ferro (funzione di deposito) quando questo è presente in eccesso nella cellula; (iii) fornisce un supporto nella riparazione del centro Fe-S dell'enzima aconitasi quando questo risulta danneggiato; (iv) agisce da fattore che controlla lo stress ossidativo cellulare regolando la concentrazione delle ROS; (v) partecipa

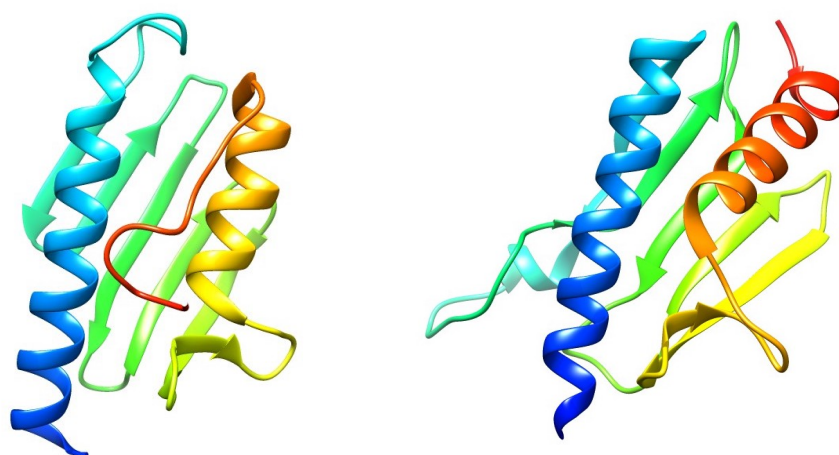
attivamente al *pathway* della fosforilazione ossidativa per la conversione energetica (Bencze *et al.*, 2006).

In particolare, fratassina sembra avere un ruolo nella genesi dei centri Fe-S attraverso l'interazione con la desulfurasi (NFS1), enzima deputato a fornire lo zolfo.

### **2.3 Fratassina e catena respiratoria mitocondriale**

Nei mitocondri i centri Fe-S sono particolarmente importanti per il trasporto degli elettroni all'interno della catena respiratoria mitocondriale, un sistema composto da complessi enzimatici che localizzano a livello delle *cristae* mitocondriali, in cui è presente anche il complesso di assemblaggio di questi cofattori redox. Come dimostrano studi di *immunogold labeling* condotti su linfoblasti *wild-type*, anche fratassina è stata rilevata in corrispondenza delle *cristae* mitocondriali, nonostante sia una proteina solubile (Doni *et al.*, 2021); viceversa, in cellule di paziente FRDA la fratassina residua è ampiamente delocalizzata nella matrice (Doni *et al.*, 2021). Questo suggerisce che per svolgere la sua funzione, fratassina richieda un arricchimento nelle *cristae* mitocondriali: questo potrebbe favorire una sua interazione (strutturale e funzionale) con i complessi della catena respiratoria contenenti centri Fe-S.

Una prova a supporto di una possibile interazione tra FXN e catena respiratoria mitocondriale deriva dalla scoperta della proteina Nqo15, una subunità del complesso I del batterio estremofilo *Thermus thermophilus* che presenta una struttura tridimensionale molto simile a quella di fratassina, pur presentando sequenze primarie diverse (Figura 2).



**Figura 2.** Strutture cristallografiche di frataxina umana (a sinistra) e di Nqo15 di *Thermus thermophilus* (a destra). Si noti una conformazione tridimensionale molto simile tra le due proteine (tratto da RCSB PDB)

Inoltre Nqo15 presenta un dominio potenzialmente in grado di legare il ferro, dato dalla presenza di un glutammato e due istidine, che si colloca nell'interfaccia con le altre subunità del complesso I (Sazanov & Hinchliffe, 2006); tale proteina, a differenza di frataxina, è sempre stata osservata associata al complesso proteico e mai solubile.

Questa evidenza suggerisce che Nqo15 abbia la funzione di proteggere i centri Fe-S della subunità del complesso I con cui interagisce da un eventuale danno ossidativo introdotto da ROS.

Poiché nel complesso I delle cellule umane manca una subunità simile a Nqo15 nella stessa posizione in cui essa si lega nelle cellule di *T. thermophilus*, frataxina potrebbe svolgere una funzione omologa a quella di Nqo15 e quindi essere coinvolta nella stabilità dei centri Fe-S o nella loro formazione.



### 3. Scopo della tesi

L' atassia di Friedreich è una patologia caratterizzata dalla diminuzione nei mitocondri di fratassina, proteina che partecipa nella biogenesi dei centri Fe-S e sembra stabilizzare i complessi della catena respiratoria mitocondriale coinvolti nel trasporto degli elettroni durante la respirazione cellulare.

In particolare, nello stesso laboratorio in cui è stato svolto il presente elaborato di laurea, sono stati condotti studi precedenti in linee di linfoblasti FRDA e *wild-type* per caratterizzare i livelli proteici di diverse subunità contenenti centri Fe-S che compongono i complessi I, II e III, in modo da caratterizzare l'effetto che fratassina ha sulla catena respiratoria mitocondriale. In questi studi è emerso che la riduzione di fratassina si ripercuote principalmente in alcune subunità del complesso I, i cui livelli risultano diminuiti: NDUFS1 (che contiene tre centri Fe-S) e altre subunità strettamente in contatto con essa, sebbene non siano direttamente coinvolte nel trasporto degli elettroni; mentre per i complessi II e III non risultano variazioni significative.

Considerando questi risultati, nel presente lavoro di tesi in primo luogo è stato valutato (mediante western blot) se lo stesso *trend* di livelli proteici relativi a determinate subunità dei complessi della catena respiratoria mitocondriale venisse mantenuto anche in altre linee cellulari; a tale scopo è stata selezionata una linea di fibroblasti FRDA e *wild-type*.

In secondo luogo, è stata valutata tramite immunofluorescenza e western blot l'espressione della proteina Nqo15 in fibroblasti FRDA precedentemente trasfettati con vettore lentivirale contenente la sequenza batterica della proteina.

## **4. Materiali e metodi**

### **4.1 Colture cellulari**

Per i seguenti esperimenti si prendono in esame fibroblasti umani *wild-type*, utilizzati come controllo, e FRDA (GM04078, dal *Coriell Institute*), provenienti da un soggetto maschio di circa 30 anni affetto da atassia di Friedreich; questi ultimi sono caratterizzati da un'espansione in omozigosi nel gene *FXN* della tripletta GAA compresa tra le 200 e le 900 copie. Entrambe le linee cellulari vengono fatte crescere in adesione ad una temperatura di 37°C e in condizioni di 5% di CO<sub>2</sub>. Circa due volte alla settimana ogni coltura viene passata, ed eventualmente splittata, per permettere una crescita ottimale delle cellule: si rimuove il terreno di coltura e si eseguono alcuni lavaggi con PBS (Phosphate Buffered Saline); si procede staccando le cellule dalla piastra con tripsina/EDTA 0,25% (*Life Technologies*) e si risospende poi in terreno di coltura fresco contenente FBS (Fetal Bovine Serum) al 10% per inibire l'azione della tripsina.

Per la conta delle cellule si prelevano 10 µL di cellule risospese in terreno e si aggiungono 90 µL di Trypan Blue, un colorante in grado di evidenziare le cellule morte. Infine, si caricano 10 µL di soluzione in ciascun lato della cameretta Burker per procedere con la conta delle cellule al microscopio ottico.

### **4.2 Lisi cellulare e preparazione dei campioni**

Dopo aver contato le cellule in coltura si centrifuga per 5 minuti a 200 g a temperatura ambiente per rimuovere il terreno di coltura e si eseguono alcuni lavaggi con PBS; dopo aver nuovamente centrifugato e rimosso il surnatante, si ottiene il pellet di cellule che deve essere mantenuto in ghiaccio per evitare la degradazione delle proteine cellulari. A questo punto le cellule vengono lisate utilizzando RIPA (un tampone di lisi) e un cocktail di inibitori di proteasi, per evitare che le proteine oggetto

di analisi vengano degradate a seguito della lisi cellulare. Si aggiunge un volume pari a circa 20  $\mu\text{L}$  di tale mix per milione di cellule in ciascun campione da analizzare (FRDA e *wild-type*). Dopo aver lasciato i campioni in ghiaccio per circa 30 minuti in modo che la soluzione di lisi abbia effetto, si centrifugano i campioni a 4°C per 30 minuti a 13300 g e si preleva un quantitativo noto di surnatante ponendo attenzione a non risospendere il pellet; da questo si rimuove un volume pari a 4  $\mu\text{L}$  per ciascun campione che verrà utilizzato per il saggio BCA.

Al volume rimanente si aggiunge invece una quantità di tampone Laemmli in modo da ottenere una concentrazione finale di 1x: questi campioni verranno utilizzati per l'elettroforesi su gel e in seguito per il western blot.

### **4.3 Saggio BCA ed elettroforesi su gel**

Per poter confrontare tra loro mediante western blotting campioni contenenti circa la stessa quantità di proteine è necessario caricare un dato volume di ciascun campione nel corrispettivo pozzetto del gel dell'elettroforesi.

Per quantificare le proteine presenti in un dato campione si utilizza il saggio BCA (acido bicinconinico), un metodo colorimetrico che si basa sulla formazione di un complesso tra due molecole di BCA e uno ione  $\text{Cu}^{+1}$  ridotto dalle proteine stesse in un ambiente alcalino; tale composto, che assume una tipica colorazione viola, presenta un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di  $\lambda = 562 \text{ nm}$ .

Si inizia allestendo una retta di taratura utilizzando diverse soluzioni a concentrazione nota di BSA (albumina di siero bovino) e successivamente si preparano i campioni a concentrazione incognita aggiungendo al pozzetto della piastra i due reagenti A e B in rapporto 50:1. Dopo incubazione dei campioni a 37°C per circa 30 minuti si esegue la misurazione allo spettrofotometro per determinare la concentrazione proteica in ciascun campione sfruttando la legge di Lambert-Beer; dalla concentrazione proteica è quindi possibile ricavare il volume di soluzione da prelevare per ottenere campioni tra loro omogenei in termini di quantità

per poterli confrontare correttamente nelle successive analisi di western blotting.

I campioni ottenuti si caricano poi nei diversi pozzetti di un gel di poliacrilammide in gradiente di concentrazione 4-20%: tale gradiente permette una buona separazione di proteine con pesi molecolari compresi tra 250 Da e 10 kDa.

Si ottengono così le diverse proteine contenute in ciascun campione separate sulla base dei loro pesi molecolari, sfruttando la loro migrazione in un campo elettrico dovuta alla presenza di una carica proteica di superficie.

#### **4.4 Western blotting**

Una volta conclusa la corsa elettroforetica si procede con il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di nitrocellulosa, che è fotosensibile; per farlo si usano delle spugnette per il trasferimento e il *transfer buffer*, una soluzione di 100 mL di TBS (Tris Buffered Saline), 100 mL di acqua e 300 mL di etanolo. In questo modo il gel e la membrana di nitrocellulosa si troveranno all'interno della camera di trasferimento tra due pile di 7 spugnette imbevute di *transfer buffer*. La camera di trasferimento viene poi posizionata nell'apposito strumento per 30 minuti: al termine della procedura le bande corrispondenti alle proteine a diverso peso molecolare sono state trasferite dal gel alla membrana.

Per visualizzare le proteine di interesse sulla membrana di nitrocellulosa si sfruttano anticorpi primari che legano le proteine da analizzare (nei nostri esperimenti le diverse subunità dei complessi della catena respiratoria mitocondriale) ed anticorpi secondari, entrambi in soluzione di TTBS (50 mL di TBS 20x + 2,5 mL di Tween 20% + acqua deionizzata per portare a volume di 1 L), che permettono di rilevare un segnale di luminescenza grazie all'enzima perossidasi coniugato all'anticorpo stesso: l'aggiunta del substrato ECL (Enhanced Chemiluminescence) permette di amplificare il segnale di luminescenza a seguito della reazione catalizzata dalla

perossidasi. Le condizioni di utilizzo degli anticorpi primari e le loro caratteristiche tecniche sono riportate nella figura 3.

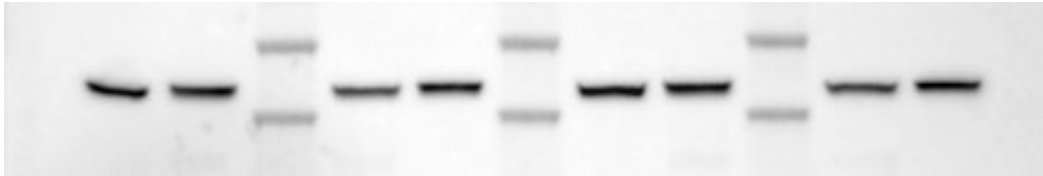
<b>Anticorpi primari</b>		
<b>Ab</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluizione</b>
FXN (rabbit)	Proteintech	1:500 in TTBS 1x
NFS1 (mouse)	Santa Cruz	1:500 in TTBS 1x
NDUFS1 (mouse)	Santa Cruz	1:500 in TTBS 1x
UQCRFS1/Rieske (mouse)	Santa Cruz	1:500 in TTBS 1x
SDHB (mouse)	Santa Cruz	1:1000 in TTBS 1x
Citrato sintasi (mouse)	Invitrogen	1:1000 in TTBS 1x
NDUFS8 (mouse)	Santa Cruz	1:500 in TTBS 1x
NDUFV1 (mouse)	Santa Cruz	1:250 in 5% latte in TTBS 1x
<b>Anticorpi secondari</b>		
<b>Ab</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluizione</b>
Anti-rabbit	Sigma Aldrich	1:20'000 in TTBS 1x
Anti-mouse	Sigma Aldrich	1:10'000 in TTBS 1x

**Figura 3.** Anticorpi utilizzati nelle analisi di western blot con relative condizioni sperimentali adottate.

Prima di aggiungere gli anticorpi è necessario bloccare tutti i potenziali siti aspecifici degli anticorpi primari tramite incubazione in TBS e latte 10%; dopo circa 1 ora e 30 minuti di bloccaggio si eseguono dei lavaggi con TTBS (Tween-Tris Buffered Saline), si aggiunge l'anticorpo primario e si pone in incubazione tutta la notte a 4°C.

Il giorno seguente si rimuove l'anticorpo primario e, dopo alcuni lavaggi con TTBS, si aggiunge l'anticorpo secondario e si pone in incubazione per 1 ora a temperatura ambiente; quindi si rimuove l'anticorpo secondario e si lava con TTBS.

Infine si cosparge la membrana con ECL, una miscela contenente il substrato della perossidasi, e si rileva la banda di interesse, in cui si è accumulato il prodotto chemiluminescente della reazione utilizzando lo strumento *Chemidoc*; un esempio dell'immagine acquisita dallo strumento viene proposta nella figura 4.



**Figura 4.** Esempio di immagine di un western blot ottenuta dallo strumento Chemidoc.

Una volta acquisita l'immagine è possibile quantificare il segnale di luminescenza con un programma informatico come ImageJ. La quantificazione delle proteine è stata normalizzata contro l'enzima citrato sintasi, un marcatore mitocondriale che è indice del numero di mitocondri presenti all'interno della cellula, in modo da valutare il livello di espressione proteica nei campioni FRDA e *wild-type* indipendentemente da quanti mitocondri presentino.

#### 4.5 Immunofluorescenza

Dopo aver fatto crescere i fibroblasti di interesse (non trasfettati e trasfettati con vettore lentivirale a diverse concentrazioni) in vetrini copri-oggetto sul fondo di piastre *multi-wells* fino ad ottenere una confluenza di circa il 70%, si esegue un lavaggio con PBS, le cellule vengono permeabilizzate con TRITON 0,1% in PBS e i vetrini vengono fissati con PFA (paraformaldeide) 4% a 4°C per 15 minuti.

Si esegue il bloccaggio dei siti aspecifici con BSA in 2% PBS in agitazione per 10 minuti e si aggiunge poi l'anticorpo primario contro il flag, un tag di 8 amminoacidi legato all'estremità della proteina Nqo15 espressa a partire dal vettore lentivirale, in quanto non è disponibile un anticorpo anti-Nqo15.

Poiché non è nota la concentrazione adatta di anticorpo primario per tale procedura, ciascuna linea cellulare (fibroblasti FRDA non infettati e fibroblasti FRDA infettati con vettore lentivirale in concentrazione di virus 2x e 3x rispetto ad un protocollo standard di trasduzione) è stata incubata con anticorpi primari con diluizioni 1:250, 1:500 e 1:1000. Tutti i campioni sono stati incubati anche con un anticorpo primario anti-citrato sintasi alla stessa concentrazione che permette di marcare i mitocondri.

Dopo incubazione tutta la notte a 4°C in cameretta umida si aggiunge l'anticorpo secondario e si ripone nuovamente in incubazione a temperatura ambiente per 1 ora nella cameretta umida al buio. Un campione di fibroblasti trasdotto con Nqo15 è stato incubato solamente con anticorpo secondario per visualizzare il livello di fluorescenza basale. Tutti gli anticorpi, primari e secondari, utilizzati in questa immunofluorescenza sono riportati nella figura 5.

<b>Anticorpi primari</b>		
<b>Ab</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluizione</b>
Flag (rabbit)	Invitrogen	1:250/ 1:500/ 1:1000 in PBS/FBS 10%
Citrato sintasi (mouse)	Invitrogen	1:500 in PBS/FBS 10%
<b>Anticorpi secondari</b>		
<b>Ab</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluizione</b>
Anti-mouse Alexa Fluor 568	Invitrogen	1:500 in PBS Tween 0,1%
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:500 in PBS Tween 0,1%

**Figura 5.** Anticorpi utilizzati nelle analisi di immunofluorescenza con relative condizioni sperimentali adottate.

Infine si eseguono dei rapidi lavaggi con PBS e si trasferiscono nuovamente i vetrini copri-oggetto, su cui sono adese le cellule, nei pozzetti della piastra. Si aggiunge una goccia di soluzione montante e DAPI (colorante blu che serve per visualizzare i nuclei delle cellule) in vetrini porta-oggetto e ci si appoggia sopra il vetrino copri-oggetto prelevandolo dalla piastra.

Dopo aver atteso che la soluzione montante si sia asciugata, si procede fissando il vetrino copri-oggetto su quello porta-oggetto usando dello smalto.

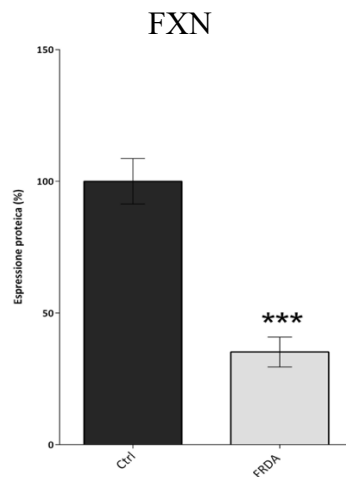
Le immagini di fluorescenza sono state acquisite al microscopio confocale ad epifluorescenza Leica SP5 presso il Servizio di Microscopia Ottica e Confocale del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

Inoltre è stata eseguita un'analisi di western blotting sui fibroblasti utilizzati in immunofluorescenza (non infettati e infettati con vettore lentivirale) per verificare l'effettiva espressione della proteina Nqo15. Per la visualizzazione del segnale si sono sfruttati gli stessi anticorpi utilizzati anche nell'immunofluorescenza (anticorpo primario anti-flag e anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con l'enzima perossidasi) nelle stesse condizioni sperimentali.



## 5. Risultati

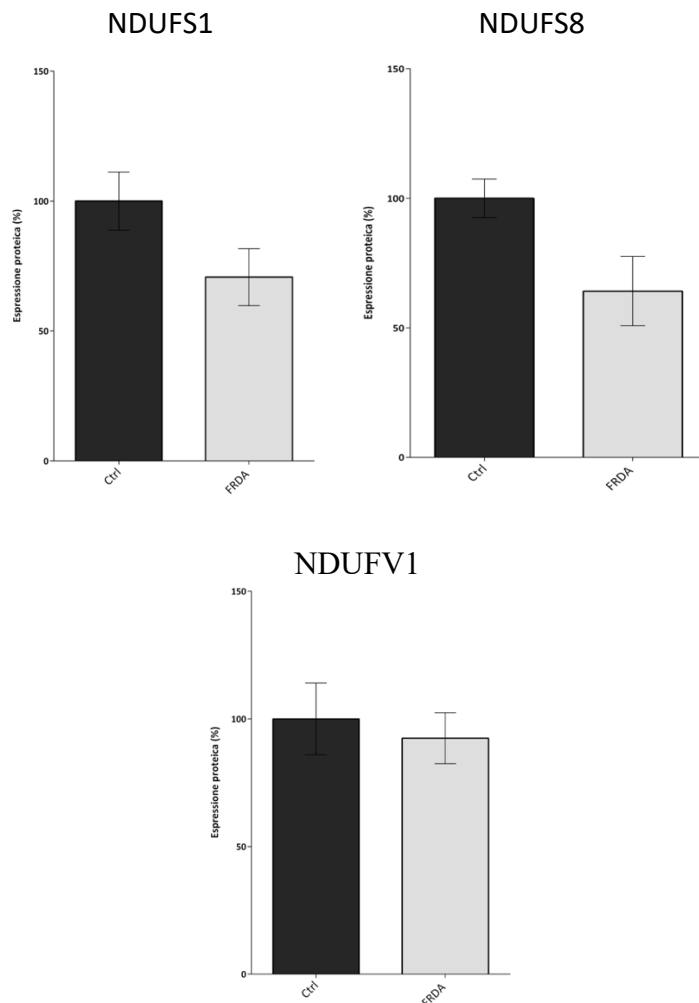
Come ben noto in letteratura, dalle analisi di western blotting risulta che le cellule FRDA siano caratterizzate da una significativa riduzione dei livelli di espressione della proteina fratassina, che comporta poi la comparsa del fenotipo malato. Questa riduzione è stata confermata con analisi di western blotting nelle linee di fibroblasti FRDA utilizzate nel nostro lavoro (Figura 6).



**Figura 6.** Analisi quantitativa dei livelli di espressione della proteina fratassina in fibroblasti *wild-type* e FRDA. I dati riportati risultano dalla media dei valori ottenuti da quattro esperimenti indipendenti  $\pm$  SEM. La significatività statistica è stata determinata utilizzando il test t di student (\* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , comparato al controllo).

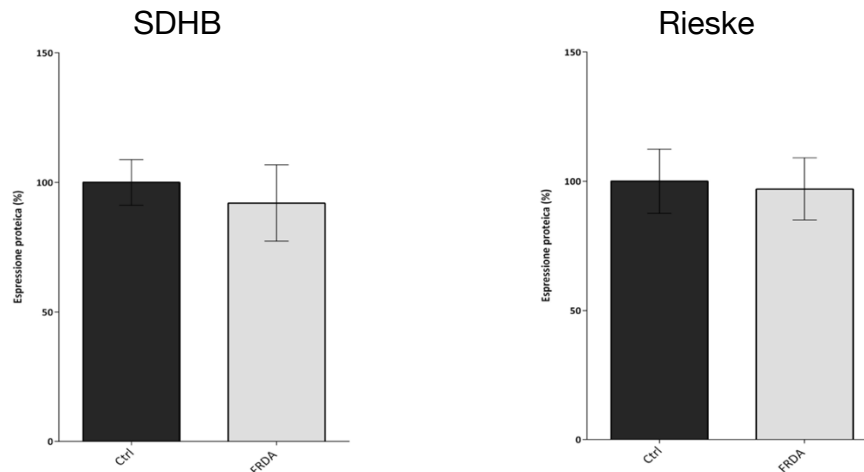
Sono poi stati presi in considerazione i livelli proteici di alcune subunità chiave dei complessi della catena respiratoria mitocondriale, con i quali fratassina potrebbe interagire.

Per il complesso I si sono valutate le subunità NDUFS1, NDUFS8 e NDUFV1 e i loro rispettivi livelli sono riportati nella figura 7.



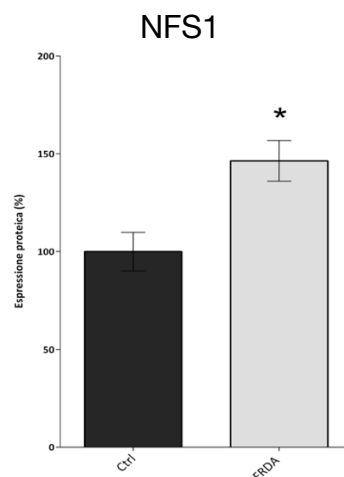
**Figura 7.** Analisi quantitativa dei livelli di espressione delle subunità NDUF1, NDUF8 e NDUFV1 del complesso I in fibroblasti *wild-type* e FRDA. I dati riportati risultano dalla media dei valori ottenuti da quattro esperimenti indipendenti  $\pm$  SEM. La significatività statistica è stata determinata utilizzando il test t di student (\* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , comparato al controllo).

Delle tre subunità analizzate, NDUFV1 non sembra avere una riduzione significativa nei fibroblasti FRDA, mentre le subunità NDUF1 e NDUF8 sono ridotte di circa il 30% rispetto ai livelli rilevati nelle cellule *wild-type*; sebbene tale riduzione non risulti significativa dal punto di vista statistico, rimane comunque apprezzabile e caratteristica delle cellule con fenotipo alterato. Inoltre si è valutata la subunità SDHB per il complesso II e la subunità Rieske per il complesso III; in entrambi i casi non sono stati rilevati cambiamenti significativi nei loro livelli di espressione proteica, come si può notare nella figura 8.



**Figura 8.** Analisi quantitativa dei livelli di espressione della subunità SDHB del complesso II e della subunità Rieske del complesso III in fibroblasti *wild-type* e FRDA. I dati riportati risultano dalla media dei valori ottenuti da quattro esperimenti indipendenti  $\pm$  SEM. La significatività statistica è stata determinata utilizzando il test t di student ( $*p \leq 0.05$ ,  $***p \leq 0.001$ , comparato al controllo).

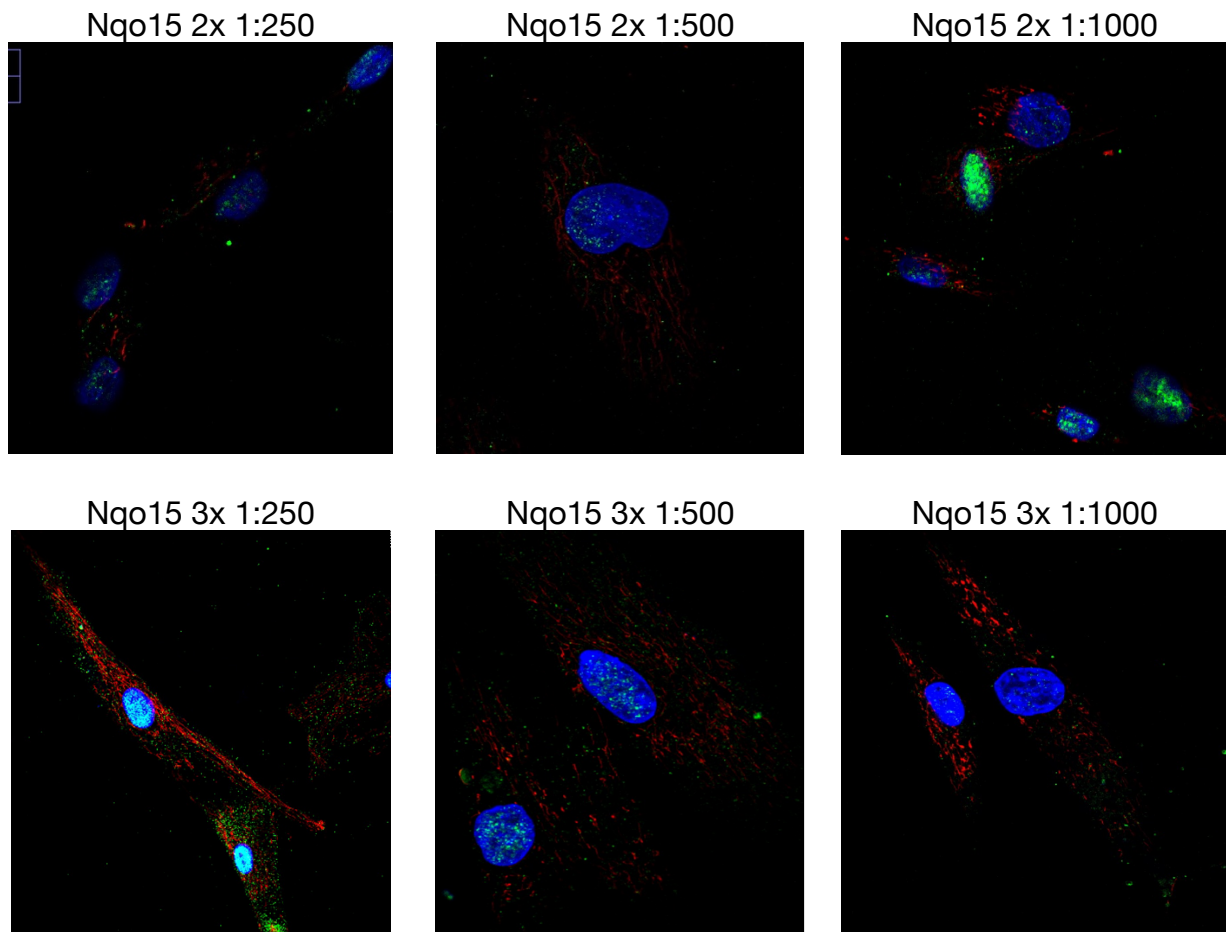
Infine si è presa in considerazione anche la cisteina desulfurasi NFS1, enzima coinvolto nella biogenesi dei centri Fe-S insieme a fratassina; come visibile nella figura 9, nei fibroblasti FRDA questo enzima viene sovraespresso di circa il 50%.



**Figura 9.** Analisi quantitativa dei livelli di espressione dell'enzima cisteina desulfurasi in fibroblasti *wild-type* e FRDA. I dati riportati risultano dalla media dei valori ottenuti da quattro esperimenti indipendenti  $\pm$  SEM. La significatività statistica è stata determinata utilizzando il test t di student ( $*p \leq 0.05$ ,  $***p \leq 0.001$ , comparato al controllo).

Le analisi di immunofluorescenza, invece, sono volte a verificare l'espressione della proteina eterologa Nqo15 in fibroblasti infettati con vettore lentivirale per valutare un eventuale ripristino del normale fenotipo

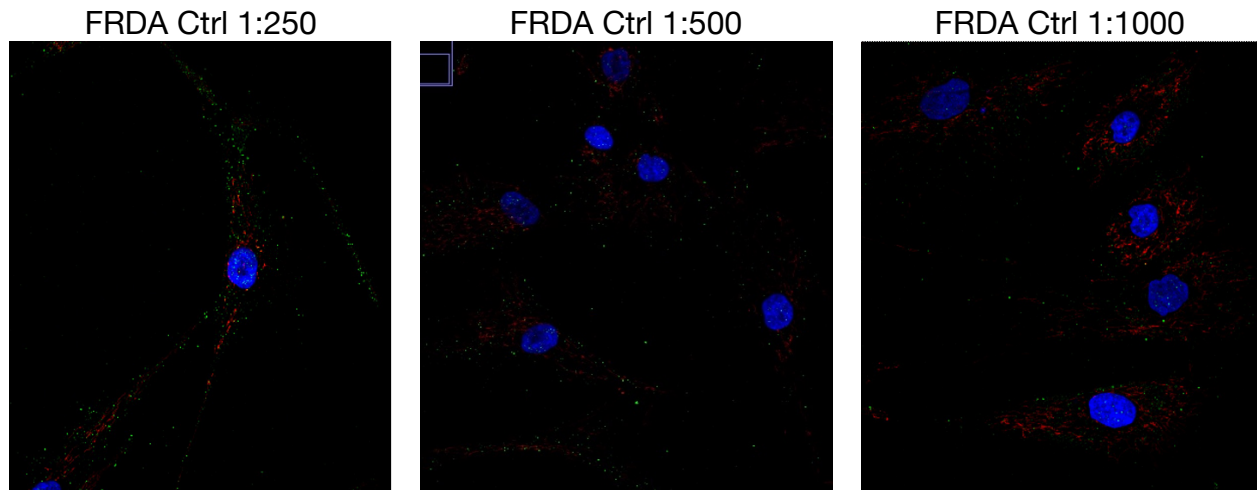
respiratorio, considerando l'elevata similarità di struttura con fratassina e di interazione con il complesso I della catena respiratoria mitocondriale. Tuttavia in nessuno dei campioni analizzati e a nessuna concentrazione di anticorpo primario testata è risultato un merge nel giallo dei segnali di fluorescenza relativi alla citrato sintasi (rosso) e alla Nqo15-flag (verde), come si vede nella figura 10.



**Figura 10.** Merge di immunofluorescenza su fibroblasti infettati con vettore lentivirale a concentrazione 2x (in alto) e 3x (in basso) e incubati a diverse concentrazioni di anticorpi primari anti-flag (*spots* verdi). Gli anticorpi primari anti-citrato sintasi (*spots* rossi) sono presenti a concentrazione costante.

Quindi non si è ottenuto un *pattern* di *spots* mitocondriale che suggerisca una localizzazione di Nqo15 all'interno del mitocondrio. Inoltre il segnale di fluorescenza verde, relativo alla proteina Nqo15-flag, è

visibile anche nei campioni di controllo non trasfettati con alcun vettore, come mostrato nella figura 11.

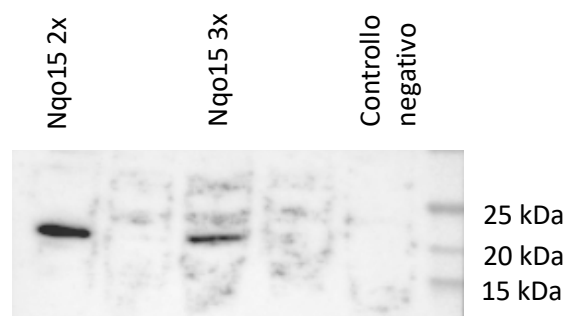


**Figura 11.** Merge di immunofluorescenza su fibroblasti FRDA incubati a diverse concentrazioni di anticorpi primari anti-flag (*spots verdi*). Gli anticorpi primari anti-citrato sintasi (*spots rossi*) sono presenti a concentrazione costante.

Questo significa che probabilmente il segnale di fluorescenza verde è semplicemente un rumore di fondo o un segnale aspecifico, e non è dovuto alla presenza della proteina Nqo15-flag espressa a partire dal vettore virale.

Dato che la tecnica di immunofluorescenza non ha permesso di evidenziare la presenza e la localizzazione della proteina Nqo15, è stata effettuata l'analisi di western blot sui fibroblasti trasdotti per verificare l'effettiva espressione della proteina eterologa.

I risultati confermano che le cellule trasdotte sono in grado di esprimere Nqo15, come si vede nel western blot riportato nella figura 12.



**Figura 12.** Western blot per valutare l'espressione di Nqo15 in fibroblasti FRDA non trasfettati e trasfettati con vettore lentivirale in concentrazione 2x e 3x.

Sebbene secondo la letteratura la proteina Nqo15 abbia un peso di 15 kDa, in queste analisi di western blotting risulta una proteina di circa 20 kDa. Tuttavia tale aumento di peso potrebbe essere dovuto alla non rimozione della sequenza di *import* per i mitocondri, che è stata aggiunta nella sequenza del vettore di espressione per permettere la migrazione di Nqo15 all'interno del compartimento desiderato.

## 6. Discussione e conclusioni

L'ataxia di Friedreich è una malattia mitocondriale ereditaria caratterizzata dalla riduzione dell'espressione della proteina frataxina, dovuta, nella maggior parte dei casi, ad un'espansione della tripletta GAA nel primo introne del gene *FXN*. Tale malattia si manifesta con disturbi dell'andatura, difetti nel sistema nervoso, diabete e cardiomiopatie, conseguenze dell'alterazione del normale fenotipo respiratorio delle cellule colpite. Infatti frataxina è una proteina che concorre alla biogenesi dei centri Fe-S, importanti gruppi funzionali per i complessi della catena respiratoria mitocondriale, e dati preliminari ottenuti nel laboratorio dove ho svolto il tirocinio suggeriscono che questa proteina interagisca con i complessi della catena respiratoria contenenti centri Fe-S. Inoltre, la riduzione dell'espressione di frataxina comporta l'abbassamento dei livelli di alcune subunità respiratorie in linee di cellule linfoblastoidi di paziente, le quali sono state confermate anche in fibroblasti mediante analisi di western blotting nel presente lavoro.

Dai risultati ottenuti dal western blot, in particolare, si nota come siano alcune subunità del complesso I ad essere maggiormente influenzate dalla diminuzione di frataxina: NDUFS1 (subunità con tre centri Fe-S) e NDUFS8 (con due centri Fe-S) sono ridotte del 30% nei fibroblasti FRDA rispetto a quelli *wild-type* di controllo; mentre NDUFV1 (contenente un solo centro Fe-S) non risulta significativamente ridotta.

L'unica subunità che costituisce il complesso II, ossia SDHB contenente tre centri Fe-S, e il monomero del complesso Rieske (con un solo centro Fe-S) risultano pressoché immutati.

Questa analisi conferma lo stesso *trend* dei livelli di espressione proteica che è risultato in precedenza nei linfoblasti, consolidando un aspetto caratteristico della malattia e facendo dei fibroblasti un valido modello cellulare per lo studio dell'atassia di Friedreich. Inoltre è possibile notare come la riduzione delle subunità respiratorie analizzate non sia direttamente correlata alla quantità di centri Fe-S presenti in esse: SDHB del complesso II e NDUF51 del complesso I presentano entrambe tre centri Fe-S, ma delle due solo NDUF51 è significativamente ridotta nelle cellule malate. Questo potrebbe essere spiegato dall'interazione che fratassina compie con il complesso I volta a stabilizzare il complesso stesso o coinvolta nella sua sintesi. Per supportare questa ipotesi, è stato poi eseguito un tentativo di esprimere in fibroblasti FRDA la proteina eterologa Nqo15 del batterio *Thermus thermophilus*, una subunità del complesso I che ha la funzione di proteggere il complesso stesso da eventuali stress ossidativi che si verificano all'interno della cellula; questo approccio potrebbe infatti risultare efficiente nel ripristinare il fenotipo respiratorio alterato delle cellule FRDA, gettando le basi per una possibile terapia contro l'atassia di Friedreich.

I fibroblasti analizzati sono stati infettati con un vettore lentivirale per l'espressione di Nqo15 coniugato con il *flag*, ed è stata poi valutata l'espressione di tale proteina mediante saggi di immunofluorescenza.

Tuttavia tale analisi è risultata inconcludente in quanto non è stato possibile visualizzare il segnale di fluorescenza relativo a Nqo15-flag in nessuna condizione di concentrazione di anticorpi primari e di vettore lentivirale usato per l'espressione di Nqo15-flag stesso: il segnale di fluorescenza rosso relativo alla citrato sintasi, marcatore mitocondriale, non risulta mai sovrapposto a quello verde relativo a Nqo15-flag (nelle immagini non si vede alcun *merge* nel giallo); suggerendo che Nqo15-flag non si localizza a livello mitocondriale come invece ci si aspettava. Da analisi più attente si nota inoltre che il segnale di fluorescenza verde è visibile anche nei campioni di controllo, cioè cellule FRDA non trasdotte,

indicando che si tratta solamente di un segnale aspecifico o di rumore di fondo, e non dell'antigene desiderato.

Non essendo risultato alcun *pattern* di *spots* mitocondriale nei campioni analizzati in immunofluorescenza, è possibile che gli anticorpi primari non abbiano raggiunto correttamente il mitocondrio delle cellule: la soluzione potrebbe essere quella di ripetere l'analisi sui mitocondri dopo averli estratti dai fibroblasti FRDA trasdotti, per ridurre al minimo il rumore di fondo e la presenza di segnali aspecifici.

L'analisi di western blot condotta su fibroblasti FRDA trasdotti ha permesso invece di confermare l'espressione della proteina eterologa Nqo15. Dai risultati si può notare come il livello di espressione sembra essere lo stesso a prescindere dalla concentrazione di virus utilizzata per trasdurre le linee cellulari di fibroblasti (2x o 3x), considerando che per le analisi sono state utilizzate quantità uguali di tutti i campioni; inoltre, come atteso, nei fibroblasti FRDA non trasdotti con alcun vettore virale, usati come controlli negativi, non è possibile rilevare la presenza della proteina eterologa. Quindi, questa linea cellulare trasdotta potrà permettere di osservare una possibile complementazione del difetto respiratorio in cellule FRDA mediato da Nqo15, in quanto, come si ipotizza per fratassina, è in grado di interagire e stabilizzare il complesso I.



## 7. Bibliografia

- Cook A., Giunti P. - *Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management* - Br Med Bull. 2017 Dec 1;124(1):19-30. [doi:10.1093/bmb/idx034]
- Schmucker S., Argentini M., Carelle-Calmels N., Martelli A., Puccio H. - *The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin* - *Human Molecular Genetics*, Volume 17, Issue 22, 15 November 2008, Pages 3521–3531, [10.1093/hmg/ddn244]
- Krisztina Z. Bencze, Kalyan C. Kondapalli, Jeremy D. Cook, Stephen McMahon, Cesar Milla´n-Pacheco, Nina Pastor, Timothy L. Stemmler- *The Structure and Function of Frataxin* - *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 41, 2006, Pages 269-291, [DOI: 10.1080/10409230600846058]
- Doni D., Rigoni G., Palumbo E., Baschiera E., Peruzzo R., De Rosa E., Caicci F., Passerini L., Bettio D., Russo A., Szabò I., Soriano M.E., Salviati L., Costantini P. - *The displacement of frataxin from the mitochondrial cristae correlates with abnormal respiratory supercomplexes formation and bioenergetic defects in cells of Friedreich ataxia patients* - *FASEB J.* 2021 Mar;35(3):e21362. [doi: 10.1096/fj.202000524RR]
- Sazanov L.A., Hinchliffe P. - *Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus** - *Science*. 2006 Mar 10;311(5766):1430-6. [doi: 10.1126/science.1123809]