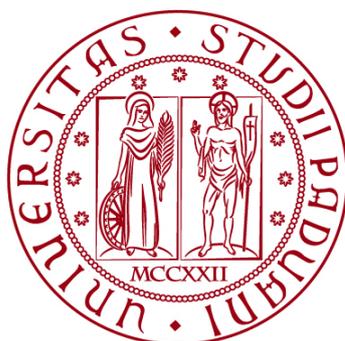


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Purificazione di Nqo15 per futuri studi funzionali: un possibile
avanzamento nella conoscenza dei meccanismi molecolari
dell'Atassia di Friedreich**

Tutor: Professoressa Paola Costantini
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Davide Doni

Laureanda: Francesca Piazzalonga

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

1. Abstract	3
2. Introduzione	4
2.1 Atassia di Friedreich	4
2.2 Struttura di fratassina	5
2.3 Fratassina e la catena respiratoria	6
2.4 Complesso I e Nqo15	7
3. Scopo dell'elaborato	10
4. Materiali e metodi	11
4.1 Trasformazione batterica	11
4.2 Induzione dell'espressione di Nqo15 nel ceppo BL21	12
4.3 Prove di espressione	12
4.4 Prove di solubilità	13
4.5 SDS-PAGE	13
4.6 Purificazione di Nqo15 FLAG	14
5. Risultati	16
5.1 Prove di espressione e solubilità di Nqo15	16
5.2 Cromatografia a scambio anionico	18
6. Conclusioni	20
7. Bibliografia	22
8. Sitografia	22

1 ABSTRACT

L'atassia di Friedreich (FRDA) è una patologia neurodegenerativa che colpisce primariamente il tessuto nervoso e cardiaco: provoca una grave atassia con perdita progressiva delle funzioni muscolari associata a cardiomiopatia ipertrofica. È causata da mutazioni nel gene *FXN* che codifica per fratassina, una piccola proteina localizzata prevalentemente nella matrice mitocondriale in associazione con la membrana mitocondriale interna, la cui funzione non è ancora del tutto nota. Nqo15 è una subunità del complesso I della catena respiratoria isolata dal batterio *Thermus thermophilus* la cui probabile funzione è quella di stabilizzare il complesso. Studi strutturali hanno evidenziato un'alta similarità tra Nqo15 e la fratassina umana, di conseguenza si punta ad indagarne anche possibili relazioni funzionali in vista di un futuro avanzamento nella conoscenza dei meccanismi molecolari alla base di FRDA, non ancora del tutto chiariti. Nel presente elaborato è stato descritto un protocollo di purificazione di Nqo15: è stata indotta in cellule di *Escherichia coli* l'espressione di Nqo15 in forma ricombinante e successivamente la proteina è stata purificata tramite cromatografia a scambio anionico. Lo scopo del lavoro è quello di rendere Nqo15 disponibile per futuri studi funzionali che verranno poi confrontati con gli studi funzionali su fratassina già condotti in laboratorio.

KEYWORDS:

Atassia di Friedreich, fratassina, Nqo15, cromatografia a scambio ionico

2 INTRODUZIONE

2.1 Atassia di Friedreich

L'atassia di Friedreich (FRDA) è una patologia neurodegenerativa ereditaria causata da mutazioni del gene *FXN* che codifica per fratassina, una piccola proteina di 23 KDa composta da 210 amminoacidi. La mutazione consiste, nel 96% dei pazienti, nell'espansione instabile della tripletta GAA presente nel primo introne del gene *FXN*, in omozigosi; in una piccola percentuale di pazienti, è presente una mutazione puntiforme in un allele, e l'espansione nell'altro. (ORPHA: 95). Entrambi i polimorfismi sono di notevole interesse clinico in quanto causano una drastica riduzione della quantità di trascritto finale presente nelle cellule.

La trasmissione è autosomica-recessiva e la prevalenza di FRDA nella popolazione caucasica è stimata essere di 1/50.000.

La variabilità clinica della FRDA è correlata alla dimensione della ripetizione espansa: forme più lievi della malattia (FRDA a esordio tardivo e FRDA con riflessi trattiene) sono associate a espansioni più brevi, specialmente con il più piccolo dei due alleli espansi.

Fratassina è una proteina prevalentemente mitocondriale, coinvolta nella biogenesi dei centri ferro zolfo (Fe-S): un suo deficit è responsabile del progressivo deterioramento del sistema nervoso centrale e periferico oltre che di una grave cardiomiopatia ipertrofica. Il quadro patologico esordisce durante l'infanzia o l'adolescenza e si manifesta con una goffaggine generale e con un'andatura atassica, spesso seguite da atassia degli arti superiori e disartria (incapacità di articolare le parole). L'interessamento cardiaco, che colpisce più del 90% dei pazienti, di solito è successivo ma, in rari casi, può precedere i segni neurologici (ORPHA:95).

Ad oggi non esiste ancora una cura risolutiva per la FRDA e la presa in carico è multidisciplinare: la fisioterapia e il ricorso ad ausili per la deambulazione contribuiscono a mantenere nel paziente uno stile di vita attivo.

Le cellule dei pazienti affetti da FRDA presentano delle specifiche caratteristiche biochimiche. La mancanza di fratassina causa, in primo luogo, un accumulo mitocondriale di ferro, ma anche l'interruzione della produzione del gruppo eme e dei centri ferro-zolfo che portano ad una progressiva perdita dell'omeostasi del ferro cellulare. L'accumulo mitocondriale di ferro devia il metallo verso altri compartimenti cellulari causando una distorta percezione di ferro nelle cellule che mancano di fratassina, le quali rispondono aumentandone l'importo intracellulare. Questo aumentato importo favorisce l'incremento delle problematiche associate alla reattività del ferro già presente nelle cellule: l'aumento della quantità di radicali ossidrilici (ROS) porta ad una graduale degenerazione della cellula fino alla sua totale perdita di vitalità (Bencze K. Z. et al., 2006).

2.2 Struttura di fratassina

Fratassina è una proteina acida altamente conservata in molti organismi, dai batteri fino ai mammiferi; la sua precisa funzione non è ancora stata definita con certezza ma negli anni sono stati proposti diversi ruoli basandosi essenzialmente sulle sue caratteristiche strutturali e funzionali.

È una proteina codificata da un gene nucleare che si caratterizza per la presenza all'N terminale di una sequenza di import che ne indica la localizzazione mitocondriale, sequenza che verrà poi rimossa durante la maturazione. Studi di immunocitofluorescenza e di microscopia immunoelettronica hanno dimostrato che fratassina è localizzata prevalentemente nei mitocondri di cellule ad elevato tasso metabolico (Bencze K. Z. et al., 2006).

La sua struttura tridimensionale vede un dominio globulare in cui un β -foglietto di 5-7 residui risulta "impacchettato" da due α -eliche. La conservazione tra le specie mostra quali residui siano essenziali per il folding e di conseguenza per la sua funzione. Sulla prima elica si trova una serie di residui acidi semi-conservati che conferiscono alla proteina una carica negativa e rendono possibile il legame con il ferro. Nella prima catena del β -foglietto sono inoltre localizzati un residuo di aspartato e un residuo di triptofano ben esposti e conservati. È interessante

notare che tutte le mutazioni missenso identificate in pazienti affetti eterozigoti composti colpiscono proprio questi residui conservati di fratassina (Pandolfo M. e Pastore A., 2009).



Figura 1. Fratassina umana. Modello tridimensionale di fratassina (fonte 1ekg.pdb). In giallo sono evidenziate le α -eliche, in verde i β -foglietti, in azzurro i random coil e in rosso i residui acidi semi-conservati che conferiscono alla proteina la carica negativa.

2.3 Fratassina e la catena respiratoria

Le funzioni ipotizzate per fratassina sono strettamente correlate al fenotipo mitocondriale: è ampiamente noto che la produzione di energia dipenda in gran parte dai centri Fe-S (complessi I, II e III) e dall'eme (complesso IV) che fungono da gruppi prostetici, in particolare nel trasferimento di elettroni durante la respirazione mitocondriale. La biogenesi dei centri Fe-S ha essa stessa luogo nel mitocondrio, sede dei meccanismi di assemblaggio di quest'ultimi; esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che fratassina interagisce con alcuni componenti di questo macchinario anche se il suo preciso ruolo a tale livello rimane ancora discusso.

I mitocondri sono organelli altamente dinamici che continuamente rimodellano le loro *cristae*, in cui si concentrano i complessi respiratori, in base a differenti richieste energetiche della cellula. La forma delle *cristae* e il loro rimodellamento

sono fondamentali per l'assemblaggio dei complessi respiratori in super complessi, strutture sovra molecolari che aumentano la stabilità dei singoli complessi e l'efficienza del trasferimento elettronico. Le cellule che compongono i tessuti ad elevato metabolismo sono particolarmente vulnerabili a disfunzioni mitocondriali e questo è dimostrato dal fatto che molte patologie neurodegenerative, come l'atassia di Friedreich, sono causate da mutazioni in geni coinvolti direttamente nella dinamica mitocondriale. Nelle cellule sane, la fratassina, pur essendo una proteina solubile priva di domini transmembrana, è quasi del tutto associata alle *cristae*, mentre nelle cellule FRDA la fratassina residua è ampiamente delocalizzata in matrice, perdendo verosimilmente la capacità di interazione funzionale con i complessi respiratori. I mitocondri delle cellule FRDA presentano *cristae* significativamente più ampie e corte e questo cambiamento morfologico potrebbe spiegare la parziale assenza di fratassina dalle *cristae* (Doni D et al., 2021).

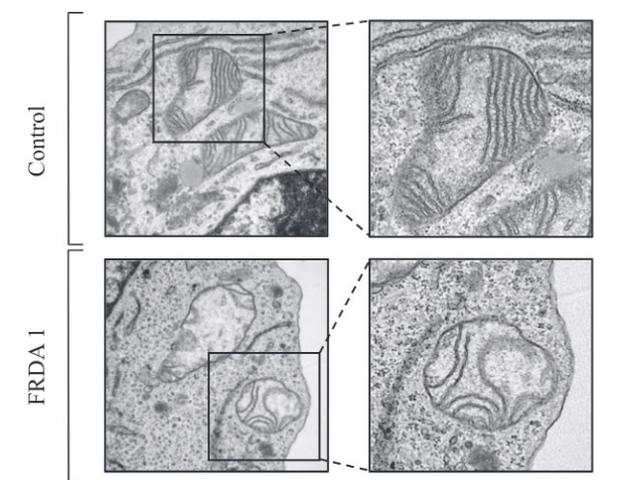


Figura 2. Alterata morfologia delle *cristae* mitocondriali. In alto il controllo (mitocondri di cellule sane), in basso mitocondri FRDA (Doni D et al., 2021)

2.4 Complesso I e Nqo15

Il primo complesso della catena respiratoria (NADH: Coq reduttasi) catalizza il trasferimento di due elettroni dal NADH all'ubiquinone e la concomitante traslocazione di quattro protoni attraverso la membrana mitocondriale;

comprende 46 subunità ed è il più grande complesso proteico di membrana finora conosciuto.

Lo stesso complesso I nei batteri contiene 14 subunità (le subunità del core), tutte caratterizzate dal fatto di essere omologhe alle subunità del complesso I mitocondriale; i due complessi, inoltre, condividono molte proprietà fisico-chimiche, come la presenza di legami non covalenti, i numerosi centri ferro-zolfo e la tipica forma a "L" (Hinchliffe P, Carrol J e Sazanov L, 2006).

In questo elaborato l'attenzione sarà focalizzata sul batterio *Thermus thermophilus* di cui è stata risolta la struttura cristallografica. Il dominio idrofilico del complesso I di *T. thermophilus* consiste di sette subunità note e di una che non era stata ancora identificata, considerata parte integrante del complesso e chiamata Nqo15. Questo dominio contiene tutti i centri redox e rappresenta più della metà del peso molecolare dell'intero complesso.

Nonostante la bassa omologia di sequenza primaria (in media del 12%), Nqo15 è strutturalmente sovrapponibile a fratassina e rappresenta il primo esempio di proteina simil-fratassina finora conosciuto in letteratura. Il meccanismo con cui fratassina interagisce funzionalmente con la catena respiratoria non è ancora del tutto chiarito, da questo ne deriva il grande interesse che il complesso I di *T. thermophilus* sta assumendo, in quanto potrebbe costituire un valido modello per studiare in modo accurato il funzionamento di fratassina. Lo ione metallico non è direttamente coordinato da residui di Nqo15 ma interagisce con His, Glu e Ser e questo posiziona il metallo ad una distanza di circa 10 Å dal cluster N1. Questo cluster ha un probabile ruolo di antiossidante e se il ferro si lega a questo livello può essere usato per rigenerare il cluster quando esso manca (Hinchliffe P, Carrol J, Sazanov L, 2006).

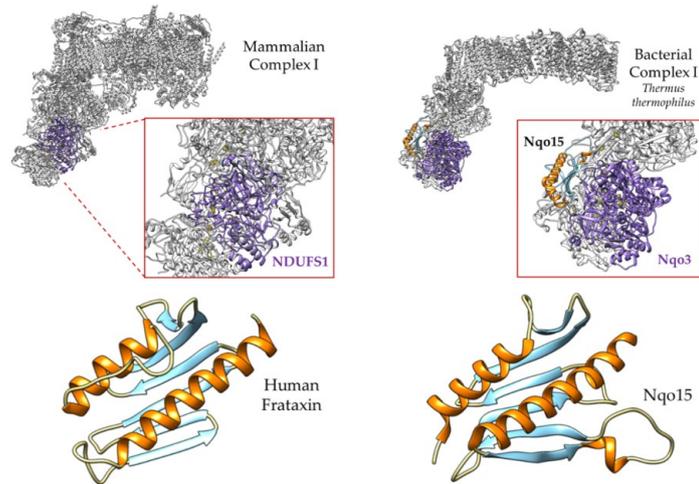


Figura 3. Confronto tra frataxina e Nqo15. A sinistra è rappresentata l'interazione tra frataxina e il complesso I della catena respiratoria umana: frataxina si inserisce nella tasca tra NSF1 e ISCU2. A destra è rappresentata l'interazione tra Nqo15 e il complesso I della catena respiratoria del batterio *T. thermophilus*. Le strutture tridimensionali delle due proteine e la posizione occupata nel complesso I risultano avere un'elevata omologia.

3 SCOPO DELL'ELABORATO

Questo elaborato si propone di indagare possibili relazioni funzionali tra fratassina e Nqo15: lo scopo ultimo del lavoro vede un possibile ampliamento delle conoscenze che stanno alla base dei meccanismi molecolari coinvolti nell'atassia di Friedreich, dal momento che Nqo15 ha una struttura sovrapponibile a quella di fratassina ed è parte integrante del complesso I del batterio *T. thermophilus*.

Studi funzionali condotti precedentemente in laboratorio hanno suggerito un'interazione fisica tra fratassina e complessi respiratori contenenti centri Fe-S in cellule di controllo. Pur essendo una proteina solubile, fratassina si accumula prevalentemente in corrispondenza delle *cristae*, sede dei complessi della catena respiratoria; al contrario, in cellule FRDA, quella residua risulta per lo più delocalizzata a livello della matrice e potrebbe così perdere la capacità di interagire con la catena respiratoria. Quale sia l'eventuale contributo di fratassina alla stabilità/funzionalità dei complessi respiratori non è stato ancora chiarito.

Nqo15 è strutturalmente molto simile a fratassina e potrebbe costituire un valido modello per studiare più a fondo la proteina umana di interesse clinico. In vista della sua purificazione, necessaria per successive analisi strutturali e funzionali, sono state condotte in laboratorio alcune prove con lo scopo di ricavare le condizioni migliori di espressione e solubilità, mettendo a confronto Nqo15 e Nqo15 FLAG. Nqo15 FLAG vede l'aggiunta di un piccolo tag utile per identificare la proteina durante la purificazione mediante western blot con anticorpo anti-FLAG. Una volta ottenuti i livelli ottimali di proteina solubile, questa è stata purificata mediante cromatografia a scambio ionico.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Trasformazione batterica

Batteri usati:

Per esprimere Nqo15 ricombinante, la trasformazione è stata effettuata nel ceppo batterico di *E. coli* - **BL21(DE3)**: genotipo F-, *ompT gal dcm lon hsdS_B* (R_B-m_B-) λ, (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]).

Plasmide:

Il plasmide utilizzato per la trasformazione è pET-9b (Novagen). Tale plasmide porta una resistenza alla kanamicina (KanR) e contiene il promotore e il terminatore della RNA polimerasi del fago T7, polimerasi responsabile dell'espressione di geni esogeni che si trovano sotto il controllo del promotore T7.

In questo lavoro sono stati utilizzati due plasmidi: uno contenente la sequenza codificante Nqo15 e l'altro codificante Nqo15 con il tag FLAG al C-terminale. Il peptide FLAG (sequenza: DYKDDDDK) è un piccolo tag che può essere incorporato con minimi rischi di ingombro sterico o di effetti negativi sulla solubilità delle proteine e per questo è stato selezionato tra i vari tag disponibili.

Terreno:

La coltura batterica è stata fatta crescere nel terreno di coltura Luria-Bertani (LB) solido o liquido, che contiene tutti i nutrienti necessari per la crescita dei batteri: Bacto Triptone 1%, Estratto di lievito 1%, NaCl 0,5%. Inoltre, nelle piastre per colture cellulari di terreno solido è stato aggiunto Agar 1%.

Procedura:

Prima della trasformazione, i batteri sono stati resi chemiocompetenti mediante un trattamento con CaCl₂, al fine di modificarne la parete e promuovere l'internalizzazione del DNA plasmidico. Per provocare lo shock termico, necessario a rendere le cellule permeabili al DNA, è stata aggiunta la soluzione contenente il plasmide (circa 5 ng) ad un'aliquota di batteri conservati a 4°C.

Questa è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti, poi per 1 minuto a 42°C, e infine trasferita di nuovo in ghiaccio. Sono stati poi aggiunti 400 µL di LB e la coltura batterica trasformata è stata incubata per un'ora a 37°C, in agitazione (150 rpm). I batteri sono stati infine piastrati su terreno solido selettivo (LB addizionato di antibiotico kanamicina in concentrazione 50 µg/mL) e fatti crescere per tutta la notte a 37°C.

4.2 Induzione dell'espressione di Nqo15 nel ceppo BL21

L'induzione dell'espressione genica di Nqo15 è stata condotta nel ceppo di *E. coli* BL21 precedentemente trasformato con il vettore plasmidico.

In primo luogo, è stato preparato un preinoculo, ovvero è stata inoculata una colonia batterica in terreno LB completo e selettivo con l'aggiunta di kanamicina in concentrazione 50 µg/mL, che è stata lasciato crescere a saturazione a 37°C in agitazione (150 rpm) overnight. Successivamente è stato preparato l'inoculo mediante l'aggiunta di parte del preinoculo in diluizione 1:50 a 300 mL di terreno LB e la coltura incubata sempre in agitazione (150 rpm) a 37°C.

Al raggiungimento di una densità ottica (OD_{600nm}) compresa tra 0.4 e 0.6, momento in cui i batteri si trovano nella loro fase di crescita esponenziale, si è proceduto con l'induzione. È stata quindi indotta l'espressione genica di Nqo15 tramite l'aggiunta di IPTG (isopropil β D-1-tiogalattopiranoside) in concentrazione 1mM.

4.3 Prove di espressione

Sono state eseguite alcune prove di espressione per valutare le condizioni ottimali di crescita dei batteri con lo scopo di massimizzare la quantità finale di proteina prodotta. Le condizioni di crescita messe a punto hanno visto tre differenti temperature e tempi di incubazione: 20°C overnight, 30°C overnight e 37°C per tre ore, in agitazione (150 rpm). Per testare le seguenti condizioni, dopo induzione con IPTG, la coltura è stata splittata in tre sotto-culture da 100 mL ciascuna, anch'esse incubate nelle condizioni di cui sopra. Successivamente, è stato misurato l'OD a 600 nm e ciascuna coltura centrifugata a 5000 x g, a 4°C

per 15 minuti. Pellet e surnatante sono stati separati e il pellet è stato conservato.

4.3 Prove di solubilità

Sono state poi condotte alcune prove di solubilità per determinare le condizioni alle quali la proteina risulti maggiormente solubile. A questo scopo è stato testato uno stesso buffer di lisi a due diversi pH: Hepes 25 mM a pH 6.4 e a pH 7.5. Il pellet è stato risospeso nel buffer di lisi e diluito 1:50/1:100; sono stati poi aggiunti i seguenti inibitori delle proteasi: PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) in concentrazione 0.1 mM; Pepstatina A 1µg/mL; Leupeptina 1 µg/mL e Antipaina 1 µg/mL. Una volta risospeso, il pellet è stato lisato tramite l'uso del sonicatore. Il sonicatore è uno strumento che consente di disgregare le pareti e le membrane batteriche tramite l'emissione di ultrasuoni a una frequenza di 20 KHz. In questo lavoro sono stati eseguiti nove cicli di sonicazione da 30 secondi e un ciclo finale da 1 minuto, intervallati da 1 minuto di pausa tra un ciclo e l'altro. Infine, il lisato è stato centrifugato alla massima velocità a 4°C per 15 minuti al fine di separare la frazione solubile da quella insolubile. Le condizioni di crescita ottimali e il grado di solubilità sono stati valutati tramite SDS-PAGE, come descritto nel paragrafo successivo.

4.4 SDS-PAGE

I campioni da caricare sul gel per la prova di espressione sono stati risospesi in sample buffer SB 1X (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 2%, glicerolo 10%, β-mercaptoetanololo 5%, blu di bromofenolo 0.1%, pH 6.8) in quantità pari a 100 µL per ogni unità di OD600nm. I campioni derivanti dalla lisi cellulare, surnatante e pellet, sono stati trattati con SB in concentrazione 2X. Prima di farli correre, inoltre, i campioni sono stati scaldati per 10 minuti a 95°C al fine di conferire una ulteriore denaturazione.

I campioni sono stati separati tramite corsa elettroforetica in SDS-PAGE su gel di poliacrilamide 4-20%. La corsa è stata condotta ad una potenza di 100 Volt, utilizzando come running buffer il Tris-MOPS-SDS. Al termine della corsa il gel è

stato immerso in instant Coomassie e successivamente in Coomassie overnight; in seguito, è stato decolorato con una soluzione contenente acido acetico 7.5% v/v e metanolo 10% v/v. I pesi molecolari delle proteine sono stati stimati utilizzando il marker proteico PM2610.

4.5 Purificazione di Nqo15 FLAG

Di seguito sarà descritta la messa a punto del protocollo di purificazione di Nqo15 FLAG.

Step 1: coltura batterica

La coltura batterica è stata preparata come descritto sopra e, a seguito dell'induzione dell'espressione genica, è stata incubata sulla base delle prove di espressione e solubilità condotte in precedenza. La condizione migliore è risultata essere 30°C overnight, in agitazione (150 rpm).

Step 2: centrifugazione e lisi

Le colture sono state centrifugate a 5000 x *g*, a 4°C per 15 minuti e i pellet lisati; come buffer di lisi è stato utilizzato l'HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) in concentrazione 25 mM e a pH 7.5. In seguito, i pellet sono stati risospesi in 5 mL di buffer di lisi e addizionati degli inibitori delle proteasi menzionati sopra. I batteri sono stati lisati al sonificatore e il lisato centrifugato alla massima velocità per 15 minuti a 4°C. Alla frazione solubile è stato aggiunto EDTA (10 mM) e il tutto è stato incubato in lieve agitazione a 4°C per circa un'ora.

Step 3: cromatografia a scambio anionico di Nqo15 FLAG

La purificazione di Nqo15 FLAG è stata condotta tramite FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), tecnica cromatografica che prevede l'utilizzo di un'opportuna colonna per la separazione delle proteine. L'isolamento della molecola può avvenire in base al suo peso molecolare, in base alla sua carica, o in base alla presenza di particolari "tag" inseriti ad una sua estremità.

Per eluire la proteina è stato utilizzato un gradiente salino di KCl da 0 a 40% e il volume di frazionamento è stato settato a 1 mL. Le frazioni ottenute sono state poste in ghiaccio e successivamente analizzate tramite elettroforesi su gel (SDS-PAGE) e Coomassie come descritto in precedenza.

5 RISULTATI

5.1 Prove di espressione e solubilità di Nqo15

Le prove di espressione e solubilità eseguite per valutare le condizioni ottimali di crescita dei batteri in modo tale che Nqo15 risulti maggiormente espressa e solubile hanno dato i seguenti risultati: a pH 6.4 la migliore condizione per Nqo15 FLAG e senza FLAG è 30°C overnight; a pH 7.5 la miglior condizione rimane 30°C overnight ma la proteina dotata di FLAG è più solubile (condizione desiderata). L'alzamento del pH a 7.5 potrebbe essere una scelta vincente poiché la proteina si carica negativamente e la si può quindi purificare utilizzando una resina cationica.

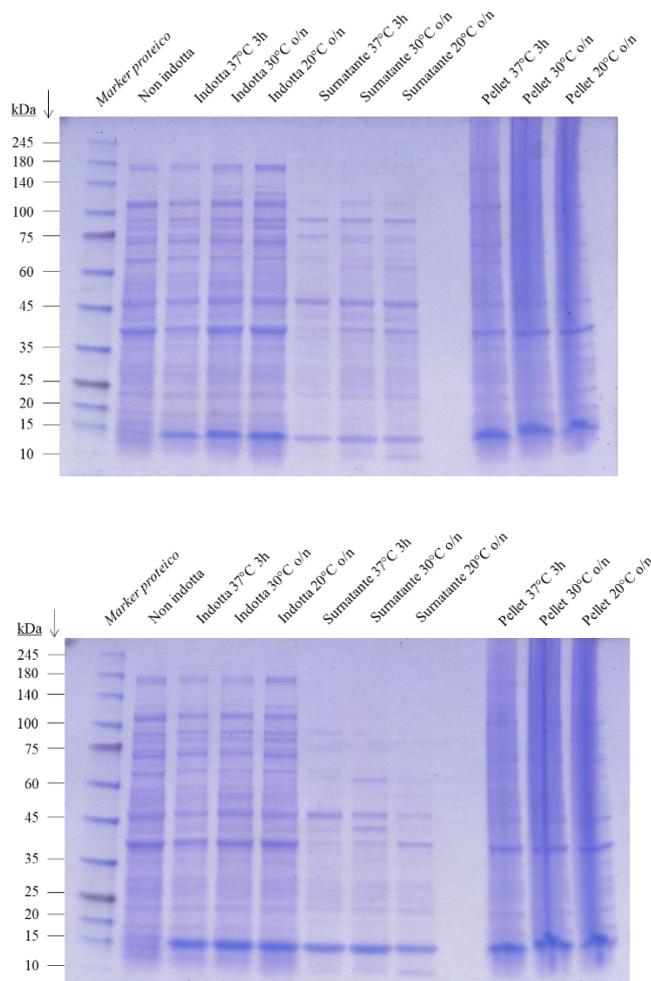


Figura 4. Prova di espressione con buffer di lisi Hepes 25 mM, pH 6.4. Campioni di ciascuno step delle prove di espressione sono stati analizzati tramite SDS-PAGE. In alto: gel relativo all'espressione di Nqo15. In basso: gel relativo all'espressione di Nqo15 FLAG

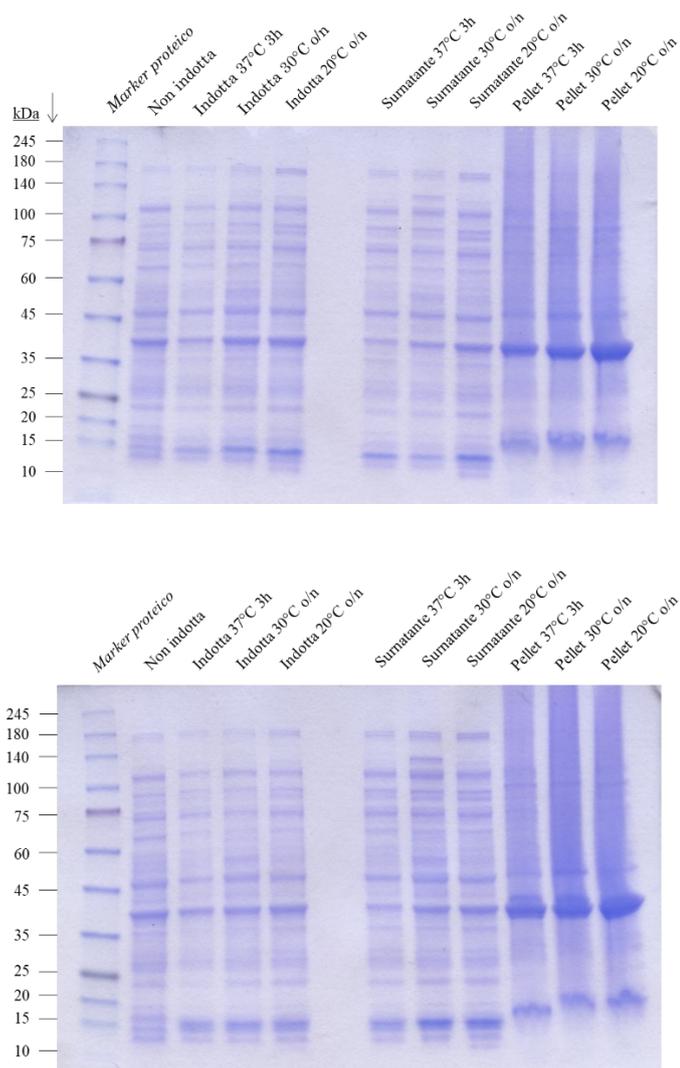


Figura 5. Prova di espressione con buffer di lisi Hepes 25 mM, pH 7.5. Campioni di ciascuno step delle prove di espressione sono stati analizzati tramite SDS-PAGE. In alto: gel relativo all'espressione di Nqo15. In basso: gel relativo all'espressione di Nqo15 FLAG

La problematica che ne deriva riguarda la scelta della resina per la cromatografia: Nqo15 FLAG ha il punto isoelettrico (P.I.) a pH 6.21, questo significa che per la purificazione si può utilizzare una resina cationica in quanto il P.I. è più basso del pH del buffer. Contrariamente, Nqo15 senza FLAG ha il punto isoelettrico a pH 8.04, non è quindi possibile utilizzare la stessa resina poiché in questo caso il P.I. risulta più alto del pH del buffer. La scelta del buffer è un passaggio critico in quanto esso deve favorire l'interazione tra proteina e resina nelle fasi iniziali che sia né troppo forte né troppo debole; di conseguenza si deve scegliere un buffer

con la più alta forza ionica che permetta il legame, ma che al tempo stesso non eluisca la proteina di interesse.

5.2 Cromatografia a scambio anionico

La cromatografia a scambio anionico è stata condotta tramite FPLC, questa tecnica cromatografica si basa sull'utilizzo di una colonna a scambio anionico. Lo strumento è costituito da un loop che deve essere adeguato alla quantità di soluzione inserita, da due pompe: *inject* per lo svuotamento della proteina in colonna e *outlet* per eliminare il *flow through* o per raccogliere le frazioni, manualmente o con il collettore automatico. Inoltre, è presente un monitor UV con rivelatore di assorbanza a 280 nm e un monitor pH/C con rivelatore combinato per la misurazione di pH e conducibilità; infine, un restringitore di flusso serve ad alzare la pressione in colonna.

È molto importante garantire l'assenza di bolle d'aria nella colonna poiché la loro presenza potrebbe far cambiare i percorsi possibili delle proteine in soluzione, inficiando così una buona separazione e quindi la riuscita dell'esperimento.

La macchina restituisce un grafico su cui sono stati plottati: gli ml eluiti sull'asse delle ascisse, e l'assorbanza sull'asse delle ordinate. Dal grafico sono comparsi due picchi: uno nel *flow through* e uno tra le frazioni 11-16, picco che potrebbe rappresentare la nostra proteina di interesse (vedi fig.6).

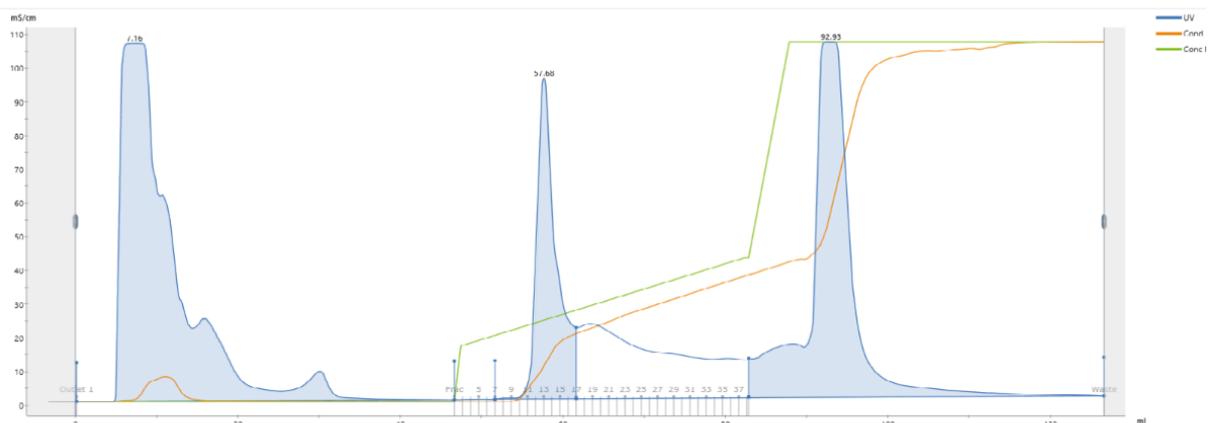


Figura 6. Cromatogramma. La linea blu rappresenta l'assorbanza, la linea arancione la conducibilità e la linea verde il gradiente.

Per verificare se il picco corrisponde a Nqo15 è stata eseguita una corsa elettroforetica (SDS-PAGE) su gel di poliacrilamide 4-20%. Il gel è stato caricato nel seguente ordine: ladder, *flow through*, lavaggio, frazione 6, frazioni 11-16, frazione 18, frazione 21, frazione 23, frazione 31 e coda.

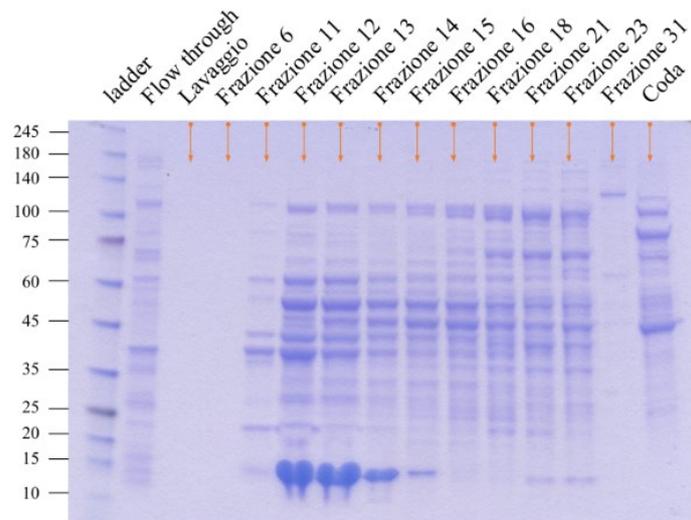


Figura 7. Gel elettroforesi. Le frazioni caricate mostrano la presenza di numerose bande che probabilmente rappresentano proteine endogene di *E.coli*. Le bande più consistenti si trovano nelle frazioni 12 e 13.

Il gel mostra la presenza di una grossa banda nelle frazioni 12 e 13, in corrispondenza del peso molecolare di Nqo15 (circa 14,78 Da): è quindi molto probabile che la nostra proteina si trovi in quelle frazioni.

Tuttavia, come si può notare dal gel, la proteina non risulta del tutto pura ma, al contrario, sono presenti delle contaminazioni dovute a proteine endogene di *E. coli*. Per ottenere una buona purificazione, sarà quindi necessario procedere con un'ulteriore tecnica cromatografica: la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC). Questa tecnica si differenzia dalla precedente in quanto prevede come fase stazionaria l'utilizzo di una resina caratterizzata da microsferi porose le quali, fungendo da setaccio molecolare, permettono di separare le proteine sulla base della loro dimensione.

6 CONCLUSIONI

L'ataxia di Friedreich è una grave patologia neurodegenerativa che provoca numerose disfunzioni a livello sistemico, in particolare coinvolge il sistema nervoso e l'apparato cardiovascolare. È causata da una drastica riduzione di frataxina, piccola proteina mitocondriale, dovuta ad una mutazione del gene *FXN*. La mutazione consiste in una espansione instabile della tripletta GAA presente nel primo introne del gene. Il ruolo di frataxina è ancora discusso ma il suo coinvolgimento nella biogenesi dei centri ferro-zolfo è generalmente accettato. Esperimenti condotti recentemente nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio suggeriscono inoltre che frataxina interagisca con i complessi della catena respiratoria contenenti centri Fe-S come cofattori redox e che questa interazione sia particolarmente rilevante per il complesso I (dati non pubblicati). Nqo15 è una subunità del complesso I della catena respiratoria del batterio *Thermus thermophilus* che, nonostante la bassa omologia con la sequenza primaria, strutturalmente è molto simile a frataxina.

Date queste premesse, lo scopo del lavoro era quello di esprimere Nqo15 in forma ricombinante in cellule di *E. coli* e purificare la proteina in modo da renderla disponibile per futuri studi funzionali, al fine di evidenziare eventuali altre somiglianze con frataxina.

Le prove di espressione e di solubilità hanno evidenziato le condizioni migliori alle quali Nqo15 risulti maggiormente espressa: la condizione scelta per una crescita ottimale della colonia batterica e per la successiva purificazione di Nqo15 è stata 30°C overnight. L'induzione dell'espressione di Nqo15 tramite IPTG ha dato buoni risultati: la proteina è stata indotta durante la fase di crescita esponenziale dei batteri e questo ha fatto sì che una consistente quantità di proteina sia stata rilevata dallo spettrofotometro durante la cromatografia anionica.

Per ottenere una buona percentuale di proteina solubile è stato aggiunto un FLAG a Nqo15, un piccolo peptide che può essere incorporato con minimi rischi

di ingombro sterico o di effetti negativi sulla solubilità delle proteine. Inoltre, Nqo15 FLAG ha reso possibile una buona separazione poiché il suo punto isoelettrico è di 6.21, minore del pH del buffer (7.5); perciò, è stato possibile utilizzare una resina cationica che, grazie alle cariche positive è in grado di legarsi alla proteina, carica invece negativamente. Il tampone usato per creare il gradiente di eluizione è stato composto in modo tale che legasse la fase stazionaria con maggiore affinità competendo quindi con la proteina di interesse.

È importante sottolineare che questa prova è stata effettuata con solo 200 mL di coltura batterica (su 800 mL totali) poiché si puntava ad ottenere una prima serie di dati che fornisse un'idea iniziale sulla buona riuscita o meno della sovra espressione di Nqo15 in cellule di *E. coli*.

Successivamente verrà ripetuto lo stesso protocollo di preparazione del campione e dei tamponi utilizzando i restanti 600 mL di coltura, con l'obiettivo di ottenere una notevole quantità di proteina purificata per poter procedere in seguito con la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC).

Per concludere, è possibile affermare che i risultati ottenuti in questo elaborato sono soddisfacenti ma che rappresentano solo un punto di partenza per successivi studi più approfonditi. Il passo successivo sarà quello di ottimizzare il protocollo per purificare Nqo15 senza FLAG in modo da poter confrontare i due cromatogrammi e verificare che non ci siano differenze significative in termini di purezza e di quantità di proteina purificata. Inoltre, il FLAG potrebbe influire sulla funzione di Nqo15 dando dei risultati non corrispondenti alla realtà. Successivamente sarà possibile proseguire con studi funzionali per indagare il ruolo di Nqo15 e confrontare i dati ottenuti con gli studi condotti precedentemente su fratassina. L'obiettivo è quello di chiarire definitivamente il/i ruolo/i di fratassina ampliando così le conoscenze sui meccanismi molecolari alla base dell'ataxia di Friedreich, con l'idea di sviluppare approcci terapeutici più mirati ed eventualmente utilizzare Nqo15 come peptide sostitutivo di fratassina.

7 BIBLIOGRAFIA

- Bencze K.Z., Kondapalli K.C., Cook J.D., McMahon S., Millan-Pacheco C., Pastor N., Stemmler T.L. - *The structure and function of frataxin* - Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 41:269–291, 2006
- Gonzalez-Cabo P., Palau F. - *Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia* - Journal of Neurochemistry, 126 (Suppl. 1):53–64, 2013
- Pandolfo M., Pastore A. - *The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin* – Journal of Neurochemistry, 256:9–17, 2009
- 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
- Hinchliffe P., Carrol J., Sazanov L. A. - *Identification of a novel subunit of respiratory complex I from Thermus thermophilus* – Biochemistry, 2006 Apr 11;45(14):4413-20

8 SITOGRAFIA

- https://www.orpha.net/consor/cgibin/OC_Exp.php?Lng=IT&Expert=95
- [https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q16595/entry#names and taxonomy](https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q16595/entry#names_and_taxonomy)