

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Studio mediante NMR dell'interazione tra il dominio
OSCP dell'ATP sintasi e la proteina mitocondriale IF₁.**

Relatore: Prof. Massimo Bellanda
Dipartimento di Scienze chimiche

Controrelatore: Prof. Giorgio Arrigoni
Dipartimento di Scienze biomediche

Laureando: Marco Carrello

Anno Accademico 2022/2023

Indice

1. Introduzione.....	4
1.1 ATP sintasi.....	4
1.2 OSCP, <i>Oligomycin Sensitivity Conferral Protein</i>	10
1.2.1 Struttura di OSCP.....	10
1.2.2 Interazioni all'interno di ATP sintasi.....	12
1.2.3 Regolazione.....	13
1.3 L'inibitore IF ₁	16
1.4 Apoptosi e PTP.....	20
1.4.1 Regolazione.....	21
1.4.2 Ruolo di particolari residui di OSCP nella regolazione del PTP.....	23
2. Scopo del progetto di tesi.....	26
3. Materiali e metodi.....	27
3.1 Espressione di proteine per via ricombinante.....	27
3.1.1 L'ospite	27
3.1.2 Il plasmide.....	28
3.1.3 Trasformazione.....	30
3.2 Terreni di coltura.....	32
3.2.1 Espressione.....	33
3.3 Purificazione.....	35
3.3.1 Cromatografia FPLC.....	36
3.3.2 Cromatografia di affinità, IMAC.....	36
3.3.3 Cromatografia ad esclusione dimensionale, SEC.....	38
3.3.4 Cromatografia a scambio ionico.....	39
3.3.5 Cromatografia SEC analitica.....	42
3.4 Quantificazione mediante spettroscopia UV-Vis.....	43
3.5 Spettrometria di massa.....	45
3.5.1 Spettrometria di Massa nativa.....	47
3.6 Risonanza magnetica nucleare, NMR.....	49

3.6.1	Principi base di un esperimento NMR.....	49
3.6.2	Esperimenti NMR bidimensionali.....	53
4.	Risultati sperimentali e discussione.....	58
4.1	Espressione e purificazione di OSCP-N.....	58
4.2	Espressione e purificazione di IF ₁ 1-60.....	68
4.3	Studio di interazione tra OSCP-N e IF ₁ 1-60 mediante NMR.....	75
4.4	Analisi Sparky.....	81
4.5	Studio dell'interazione tra OSCP-N e IF ₁ 1-60 mediante spettrometria di massa in condizioni native.....	87
4.6	Discussione dello studio di interazione.....	93
5.	Conclusioni e prospettive future.....	94
6.	Abbreviazioni e acronimi.....	96
7.	Ringraziamenti.....	98
8.	Bibliografia.....	99

1. Introduzione

1.1 ATP sintasi

I mitocondri sono organuli presenti nelle cellule eucariote, responsabili della produzione di energia utilizzabile istantaneamente nel metabolismo e hanno la capacità di regolare differenti tipi di morte cellulare come l'apoptosi, ovvero il suicidio cellulare programmato. Sono deputati alla fosforilazione ossidativa, ovvero la sintesi di molecole di adenosin trifosfato (ATP) grazie all'enzima ATP sintasi. La produzione di ATP avviene a partire da una molecola di ADP e fosfato inorganico in condizioni aerobiche.

L'ATP sintasi è un complesso molecolare di circa 600 kDa presente nella membrana mitocondriale interna (IMM) (Antoniol et al., 2014). I mitocondri sono costituiti da due membrane, separate dallo spazio intermembrana, una interna che racchiude la matrice mitocondriale e una esterna verso il citoplasma.

La sintesi di ATP si basa sul gradiente protonico formato a livello della membrana interna, impermeabile ai protoni, durante la catena di trasporto degli elettroni (ETC). Essa costituisce il primo step della fosforilazione ossidativa, coinvolgendo quattro complessi disposti nella membrana mitocondriale e si conclude con la riduzione dell'ossigeno ad acqua, da parte del complesso IV.

Tre complessi della catena accoppiano il trasporto elettronico alla traslocazione di protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana, generando così un gradiente protonico. L'energia necessaria alla formazione di tale gradiente si viene a generare dall'ossidazione di substrati riducenti (NADH, FADH₂), derivanti dal catabolismo di acidi grassi, carboidrati e amminoacidi. Il gradiente protonico, detto *Proton Motive Force* (PMF), permette di accoppiare energeticamente il trasporto di protoni alla sintesi di ATP attraverso la mutua rotazione delle subunità dell'ATP sintasi (figura 1). Andando più nel dettaglio, il complesso I (*NADHdehydrogenase*), il complesso III (*cytochrome-c reductase*) e il complesso IV (*cytochrome-c oxidase*) pompano H⁺ dalla matrice allo spazio mitocondriale intermembrana (IMS) realizzando il PMF, il quale viene sfruttato dal complesso V per sintetizzare ATP attraverso la così detta catalisi rotazionale. Gli elettroni derivati dal processo di ossidazione sono guidati dalla catena di trasporto degli elettroni, all'accettore finale

O₂, il quale viene ridotto ad H₂O, evitando la formazione di radicali liberi e *Reactive Oxygen Species* (ROS).

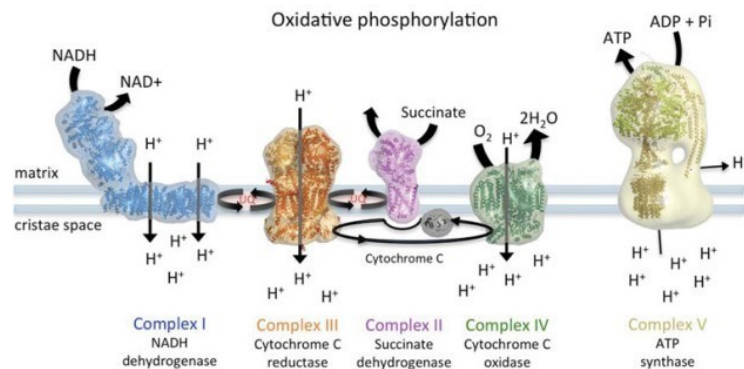


Figura 1: fosforilazione ossidativa nei mitocondri divisa in catena di trasporto elettronico, ad opera dei primi quattro complessi, e sintesi di ATP, ad opera dell'ATP sintasi o complesso V (giallo) (Davies & Daum, 2013).

L'ATP sintasi è un complesso molecolare conservato oltre che nei mitocondri, anche nei cloroplasti e nei batteri. Nonostante differenze nella complessità e nel numero di subunità coinvolte, la struttura generale e il funzionamento sono comuni tra le varie specie. L'ATP sintasi viene suddivisa in una porzione transmembrana F₀ e in una globulare F₁, collegate da due *stalk* (connettori): uno centrale CS e uno periferico PS. La porzione F₀ è il motore che converte il PMF in energia meccanica, la quale viene convertita in energia chimica dalla porzione F₁ attraverso la formazione del legame fosfo-anidridico durante la fosforilazione dell'ADP.

La porzione F₁ è costituita da un cilindro con un diametro di 100 Å in cui si alternano tre subunità α e tre β attorno allo CS, Quest'ultimo è composto dalle subunità γ, δ ed ε. La prima è lunga 30 Å collegando il dominio catalitico α₃β₃ (costituito da tre eterodimeri αβ alternati che formano il cilindro) e la porzione F₀, legata alle proteine δ ed ε. Il dominio α₃β₃ è mantenuto statico grazie al PS che connette il settore catalitico alla subunità α, perciò anche al rotore transmembrana. Ogni interfaccia αβ ospita un sito di legame per nucleotidi e per uno ione Mg²⁺, anche se il ruolo catalitico è delle subunità β.

La porzione F₀ è composta da una subunità ad anello, c, composta nei mammiferi da 8 doppie α-eliche transmembrana (nei batteri e cloroplasti da 10 a 15) e da una serie di subunità a, b, e, f e A6L (anche chiamata ATP8). Le ultime hanno la

particolarità di estendersi fuori membrana formando lo *stalk* periferico, PS, il quale interagisce con la porzione F₁ grazie alle subunità d, F6 e OSCP (Figura 2) (Walker, 2013).

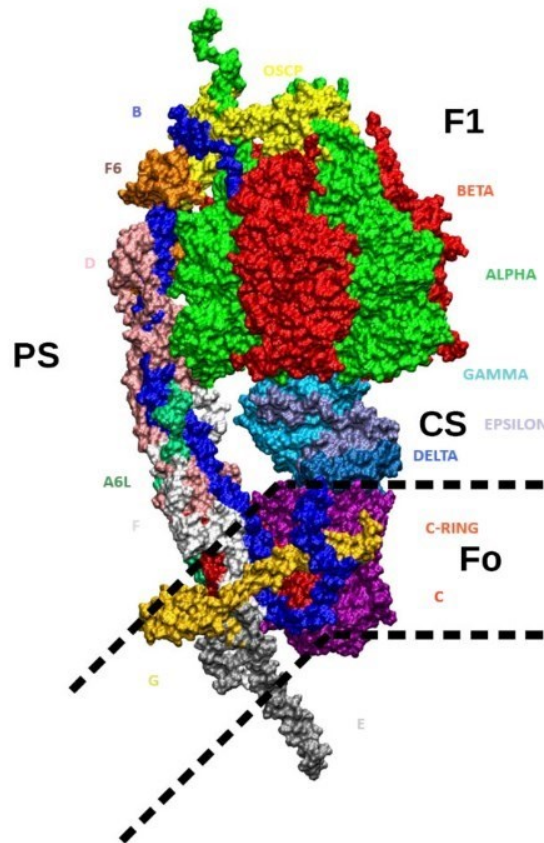


Figura 2: struttura molecolare dell'ATP sintasi. Dall'alto lungo lo PS a sinistra si vedono: OSCP (giallo), b (blu), F6 (arancione), d (rosa), A6L (verde smeraldo) e f (bianco). Procedendo all'interno della membrana con le subunità g (giallo), e (grigio) e c (viola). Lo CS è costituito dalle subunità γ (azzurro), δ (blu) e ϵ (grigioazzurro). Tornando verso la sommità c'è la porzione catalitica con le subunità α (verde) e β (rosso) (Giorgio et al., 2019).

L'attività catalitica del complesso proteico si basa sull'accoppiamento energetico generato tra la rotazione della subunità c e dello *stalk* centrale, i quali formano il rotore, spinta dal gradiente protonico e la sintesi di ATP. Tale meccanismo prende il nome di catalisi rotazionale dato che l'energia rotazionale viene convertita in energia chimica.

La subunità c è costituita da una serie di semi canali aventi un residuo di glutammato, E58c, a metà altezza esposto sulla circonferenza esterna del cilindro. I due canali adiacenti alla subunità c, siti all'interfaccia con la subunità a, risultano esposti uno verso la matrice e l'altro verso lo spazio intermembrana. Vi è un residuo di arginina conservato e carico positivamente, R159, presente sull' α -elica α -H5, la quale insieme all' α -elica α -H6, costituiscono la subunità a. Tale residuo di arginina è fondamentale per il corretto posizionamento e rotazione del cilindro, e per garantire che il residuo di glutammato, E58c, passi dal canale di uscita al canale di ingresso solo nella forma carica e deprotonata (Kühlbrandt & Davies, 2016).

Recenti studi di Cryo-EM sull'ATP sintasi bovina mostrano che il trasferimento protonico dai due semi-canali avviene grazie a un residuo polare (E203a nel semicanale interno e E145a in quello esterno) che mediano la protonazione e la deprotonazione del residuo di glutammato, E58c, grazie al loro gruppo carbossilico. In più la presenza di cinque molecole di acqua coinvolte in un forte legame idrogeno con diversi residui polari del semi-canale interno suggerisce che il trasferimento protonico avviene mediante il meccanismo di *Grotthuss* (Spikes et al., 2020).

I protoni presenti nello spazio intermembrana, più acido rispetto alla matrice mitocondriale, grazie al gradiente protonico generato dalla catena di trasporto elettronico, risalgono il semi canale all'interfaccia con la subunità a neutralizzando la carica negativa del gruppo carbossilico. In tale maniera il residuo si sposta in un ambiente idrofobico della membrana, avente un'affinità maggiore, facendo ruotare il cilindro della subunità c ed esponendo un altro residuo carico negativamente verso lo spazio intermembrana. Quasi al termine di una rotazione completa, il residuo iniziale raggiunge un secondo sito tra il cilindro e la subunità a, esposto verso la matrice. Il gruppo carbossilico si ionizza rilasciando il protone a causa dell'ambiente più basico, consentendo l'inizio di un nuovo ciclo catalitico (figura 3) (Walker, 2013).

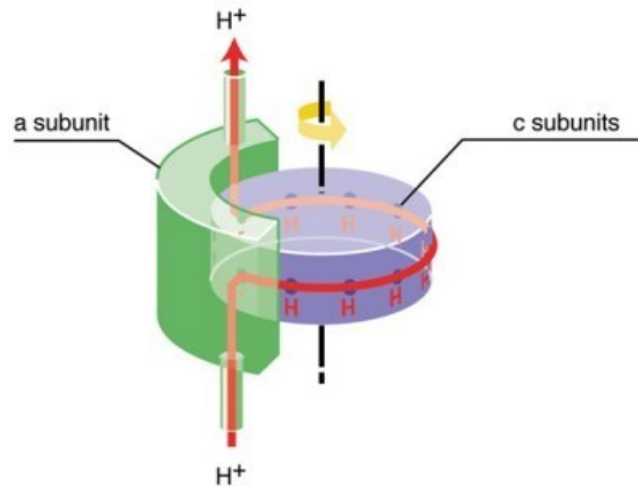


Figura 3: modello della rotazione sequenziale della subunità c (viola) rispetto alla subunità a (verde) grazie al trasferimento dei protoni dall'ambiente intermembrana (parte bassa) alla matrice (parte alta) (Walker, 2013).

Lo SC è legato saldamente al cilindro c e ruotando insieme ad esso, trasferisce l'energia immagazzinata alla porzione F₁. L'estremità della subunità γ , che si inserisce nella porzione catalitica $\alpha_3\beta_3$, è asimmetrica e ruotando con step di 120°, causa il passaggio delle subunità β attraverso tre diversi stati conformazionali, che a loro volta hanno diverse proprietà catalitiche e di affinità. I tre stati sono:

- β_{DP} adatto ad ospitare ADP, Mg^{2+} e P_i ;
- β_{TP} affine per Mg^{2+} -ATP;
- β_E , con struttura diversa dagli stati precedenti, che consente il rilascio del prodotto in quanto è poco affine sia per ATP che per ADP.

Ogni rotazione di 360° del rotore richiede un numero di protoni pari alle doppie eliche che compongono il cilindro e libera l'energia necessaria alla sintesi di tre molecole di Mg^{2+} -ATP.

Il PS, inoltre, collega le due porzioni e la sua rigidità aiuta la porzione catalitica $\alpha_3\beta_3$ a contrastare la torsione meccanica del rotore.

In condizioni anaerobiche non fisiologiche l'enzima ATP sintasi assume un'attività idrolitica, idrolizzando ATP in ADP e P_i . Tale evento è dovuto all'assenza di ossigeno, in quanto la catena di trasporto elettronico non può concludersi con la riduzione di O_2 ad acqua e quindi non può essere mantenuto il gradiente protonico

ai capi della membrana mitocondriale interna. Ciò determina che la subunità c ruota in senso inverso. Tale rotazione, propagandosi al dominio catalitico, causa l'alternarsi con ordine opposto degli stati $\alpha\beta_{DP}$, $\alpha\beta_{TP}$ e $\alpha\beta_E$. L'inibizione dell'attività catalitica avviene tramite svariati meccanismi, tra i quali quello con l'inibitore IF_1 (Walker, 2013).

Studi di tomografia crioelettronica (Davies et al., 2012) mostrano che lo stato fisiologico dell'ATP sintasi è parzialmente sottoforma di dimeri nei mitocondri di lieviti, mammiferi e piante. I dimeri interagiscono attraverso le porzioni F_0 , mantenendo gli *stalk* periferici lontani tra loro e assumendo una forma a V con un angolo di 86° (figura 4). Tali strutture producono ripiegamenti della membrana mitocondriale interna promuovendo la formazione delle *cristae*, tipiche dei mitocondri, le quali hanno la funzione di aumentare la superficie di membrana, consentendo di ospitare più complessi proteici. L'ATP sintasi, perciò, ha un duplice ruolo strutturale ed energetico per la cellula.

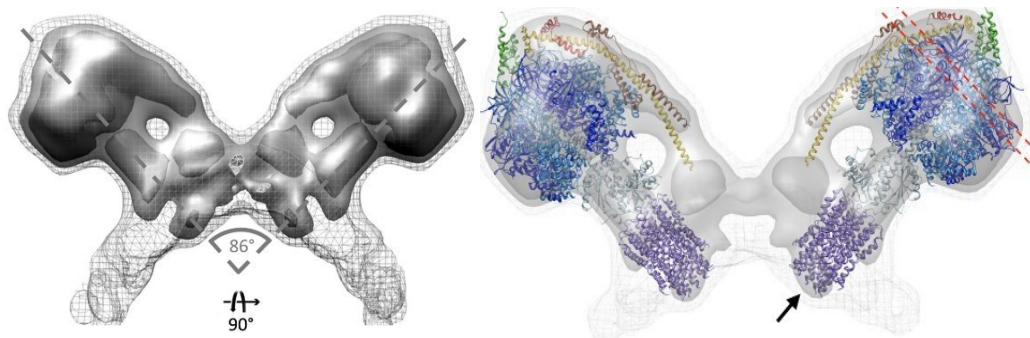


Figura 4: tomografia (sinistra) e modello atomico (destra) di un dimero di ATP sintasi da mitocondri di lievito (Davies et al., 2012).

1.2 OSCP, *Oligomycin Sensitivity Conferral Protein*

Il dominio OSCP, *Oligomycin Sensitivity Conferral Protein*, è una proteina basica di 190 residui, nella forma umana matura, situata nella porzione superiore dello *stalk* periferico, dove prende contatto con la porzione F_1 (Antoniell et al., 2014). Nella sua forma immatura la proteina è composta da 213 residui, in quanto vi è la presenza di un tratto in più di 23 residui per l'ingresso nel mitocondrio (MTS) (Rees et al., 2009). Il nome di tale dominio suggerisce che esso rende sensibile il complesso enzimatico all'antibiotico oligomicina, il quale causa una variazione

conformazionale in grado di disaccoppiare F_0 e F_1 , inibendo la sintesi di ATP (Antoniol et al., 2014). Il ruolo di OSCP è di assicurare il corretto posizionamento strutturale e funzionale delle due porzioni del complesso proteico, consentendo la conversione energetica necessaria per l'azione catalitica. OSCP viene codificata dal gene nucleare ATP5PO ed essa è coinvolta nell'assemblaggio delle subunità presenti nell'ATP sintasi, prevenendo la possibile formazione di intermedi che potrebbero causare la depolarizzazione della membrana o l'idrolisi di ATP (Rühle & Leister, 2015).

Tale dominio si trova conservato sia nei mammiferi sia nei batteri come *E. coli*, dove è analogo alla subunità δ .

OSCP è in grado di interagire con vari modulatori, che a loro volta regolano l'attività all'interno del complesso molecolare. Alcuni di questi modulatori sono responsabili della formazione del *Permeability Transition Pore* (PTP) causato da particolari variazioni conformazionali del complesso dell'ATP sintasi (Giorgio et al., 2013). Il PTP è una componente fondamentale nella apoptosi e la sua scorretta regolazione è associata a numerose patologie.

1.2.1 Struttura di OSCP

Il dominio OSCP è costituito da due domini: N-terminale e C-terminale, i quali sono collegati da una sequenza flessibile.

La porzione N-terminale è composta dai residui 1-113 (figura 5), è globulare e ben strutturato in sei α -eliche (H1-H6), con i primi dieci residui disordinati sia in soluzione che nel complesso V. Le eliche H1, H2, H5 e H6 formano due V (stabilizzate da interazioni idrofobiche) che si intersecano e costituiscono il core del dominio, mentre le restanti due, H3 e H4, circondano le altre verso l'esterno (Rees et al., 2009). Nel complesso V le eliche maggiormente esposte sono H2, H3, H4 e H6 con l'N-terminale dell'elica H1 che è accessibile in parte da una fessura stretta generata dalla stessa OSCP e l'esamero $\alpha_3\beta_3$, il resto di H1 e H5 è sepolto nel centro catalitico F_1 . Il dominio N-terminale è responsabile della maggior parte delle interazioni tra la subunità in esame e il complesso proteico. È disponibile la struttura NMR in soluzione sia del dominio isolato, di origine bovina, composto dai residui

1-120 (Carbajo et al., 2005), sia del complesso con un peptide di 25 amminoacidi derivato dalla subunità α dell'ATP sintasi (Carbajo et al., 2007).

La porzione C-terminale, residui 114-190, nelle iniziali strutture pubblicate dove si studiava il complesso intero dell'ATP sintasi (Rees et al., 2009) risulta prevalentemente disordinata, ad eccezione della struttura β -hairpin, che costituisce un punto di flessione dello PS, seguita da due α -eliche (H7 e H8) collegate tra di loro da una sequenza flessibile di circa 30 residui. Nei recenti studi sempre sul complesso intero dell'ATP sintasi (Gu et al., 2019; Pinke et al., 2020), la porzione C-terminale risulta maggiormente *foldata*. Hanno rilevato la presenza di un β -sheet costituito da quattro filamenti: due paralleli e due antiparalleli. In letteratura sono ancora assenti strutture per la porzione C-terminale isolata.

I domini N e C terminale di OSCP sono indipendenti tra loro, ma vi è una piccola regione composta dai residui che vanno dal V111 al V116, che ha contatti con entrambi. Essa è fondamentale in quanto controlla la porzione relativa dei due domini influenzando la posizione del *stalk* periferico rispetto al resto del complesso molecolare (Giorgio et al., 2019).

MAAPAVSGLSRQVRCFSTSVVRPFAKLVRPPVQVYGIEGRYATALYSAAS
KQNKLEQVEKELLRVAQILKEPKVAASVLNPYVKRSIKVKSLNDITAKER
FSPLTTNLINLLAENGRLSNTQGVVSAFSTMMSVHRGEVPCTVTSASPLEE
ATLSELKTVLKSFLSQGVLEAKTDPSILGGMIVRIGEKYVDMSVKTKI
QKLGRAMREIV

Figura 5: Sequenza OSCP intera con i 23 amminoacidi prima della delezione, la cui regione corrisponde al MTS, essenziale per l'entrata nel mitocondrio (rosso). In verde il dominio N-terminale, mentre in blu il C-terminale (Uniprot: P48047).

1.2.2 Interazioni all'interno di ATP sintasi

Il dominio N-terminale di OSCP è coinvolto in tre interazioni principali con la porzione catalitica $\alpha_3\beta_3$ (Rees et al., 2009):

1. Le eliche H1 e H5, rispettivamente i residui 18-26 e 83-92 nella proteina bovina, prendono contatto con i residui 6-17 della subunità α_E instaurando legami di natura idrofobica. Inoltre, sono presenti anche interazioni elettrostatiche tra le

due proteine, in particolare tra i residui R15 di α_E e E91 di OSCP e tra E7 di α_E e R94 di OSCP (Figura 6.A);

2. Il dominio N-terminale di α_{TP} è costituito da un'elica la quale interagisce mediante il residuo 50 con le eliche H2, H3 e H4 di OSCP (Figura 6.B);
3. L'ultima interazione coinvolge il β -barrel del dominio N-terminale appartenente alla subunità β_{DP} e i residui 1-14 di OSCP (figura 6.C).

È presente un'ulteriore quarta interazione con la porzione catalitica $\alpha_3\beta_3$ attraverso il dominio C-terminale di OSCP, il quale contatta α_{DP} mediante il suo dominio Nterminale (Figura 6.D).

Le eliche H7 e H8 della porzione C-terminale, nell'enzima bovino, sono coinvolte in un fascio di cinque eliche con l' α -elica N-terminale della subunità F6 e un segmento della α -elica lunga presente nelle subunità b (Figura 6.E). Tramite tale contatto si instaura un'interfaccia estesa tra le diverse subunità, costituita prevalentemente da interazioni idrofobiche, le quali sono in grado di trasmettere le variazioni conformazionali indotte dai regolatori interagenti con la subunità OSCP. Il contatto tra la subunità b e OSCP è fondamentale per l'integrità dello statore; mentre il legame con F6 rende la struttura maggiormente rigida (Giorgio et al., 2019).

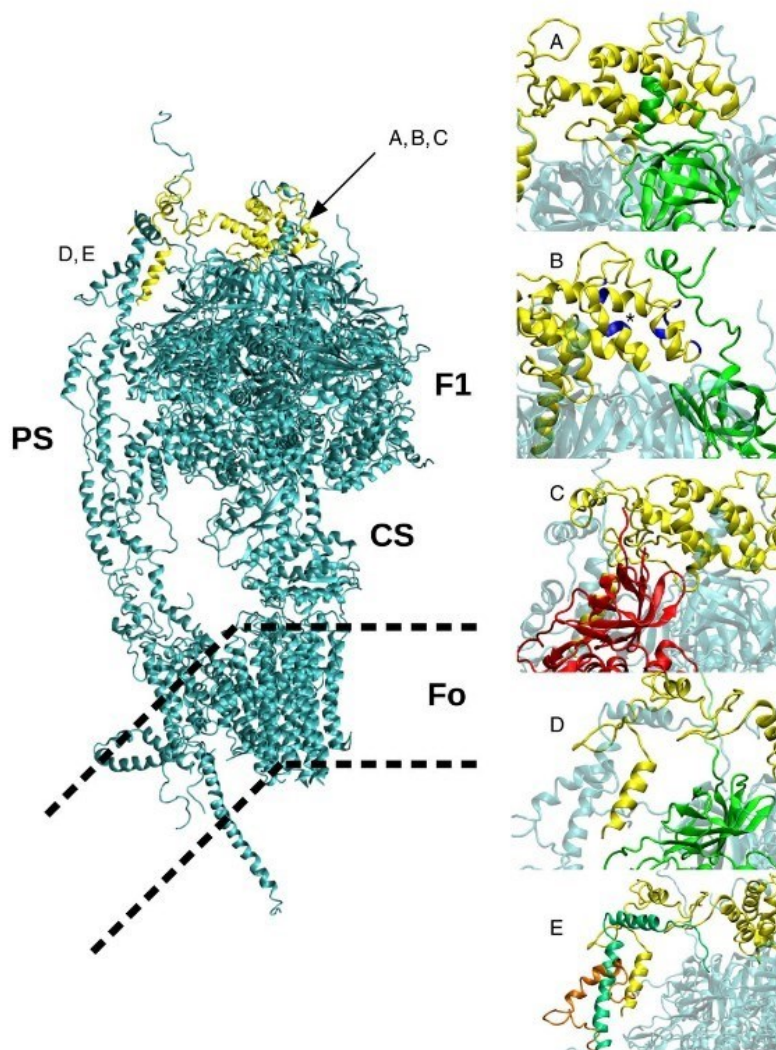


Figura 6: posizione di OSCP (giallo) rispetto all'enzima ATP sintasi (azzurro). A destra sono riportate le varie interazioni tra OSCP e α_E (A), α_{TP} (B), β_{DP} (C), α_{DP} (D) e le subunità b e F6 (E). La subunità α è in verde, la β in rosso, mentre F6 e b sono rispettivamente in arancione e in verde smeraldo (Giorgio et al., 2019).

1.2.3 Regolazione

Il dominio OSCP oltre a garantire il corretto accoppiamento tra le due porzioni F_0 e F_1 del complesso molecolare, è anche importante per la regolazione catalitica dato che interagisce con piccole molecole e altre proteine. Tali interazioni sono possibili grazie alla sua localizzazione sulla sommità dell'enzima ATP sintasi verso la matrice mitocondriale. Grazie al suo posizionamento tale dominio viene studiato come potenziale nuovo target farmaceutico, essendo coinvolta nel processo

biologico dell'apoptosi, pertanto in molte malattie come la distrofia muscolare o il cancro (Antoniell et al., 2014).

Il dominio OSCP rappresenta il sito di legame per il farmaco immunoregolatore benzodiazepina 423, si lega in prossimità della tasca costituita tra le eliche H3, H4 e H5 (*shoulder region*) che include i residui M51, L56, K75, K77 e N92. Mediante studi NMR si è dimostrato che l'interazione con il farmaco immunosoppressore causa una serie di piccole variazioni conformazionali in regioni proteiche non coinvolte direttamente nel *binding*. Tale evidenza ha portato a ritenere che OSCP sia una proteina molto plastica, incline a variazioni conformazionali indotte da ligandi. Le variazioni conformazionali si trasmettono al resto del complesso molecolare grazie alle interazioni dirette tra il dominio N-terminale di OSCP e il sito catalitico $\alpha_3\beta_3$ e quelle tra la regione V111-V116 e lo PS (Stelzer et al., 2010).

OSCP interagisce anche con la proteina p53, un tetramero di 53 kDa, composto da subunità identiche. Esso è un fattore di trascrizione che si attiva in risposta allo stress e regola centinaia di geni coinvolti nel ciclo cellulare, apoptosi, senescenza, metabolismo e riparazioni del DNA. Tale fattore di trascrizione aumenta il consumo di ossigeno e diminuisce la produzione di *Reactive Oxygen Species* (ROS) in assenza di stress acuto. Legandosi ad OSCP prende parte all'assemblamento e alla stabilizzazione del complesso F₁-F₀ maturo. È stato ipotizzato che p53 possa essere un importante regolatore della fisiologia mitocondriale, esercitando anche un possibile ruolo di soppressore tumorale (Bergeaud et al., 2013).

Un'ulteriore ligando di OSCP è la sirtuina mitocondriale, Sirt3, una deacetilasi NAD⁺-dipendente che gioca un ruolo fondamentale nella risposta cellulare allo stress e nell'omeostasi mitocondriale (Yang et al., 2016). Una volta avvenuta l'interazione, l'enzima deacetila il residuo di lisina K139 causando un incremento dell'attività catalitica dell'intero complesso enzimatico. L'assenza di Sirt3 causa una diminuzione della respirazione mitocondriale e una conseguente diminuzione della produzione di ATP. Grazie ad ulteriori studi è emerso che questo residuo di lisina viene acetilato come conseguenza di una modifica post-traduzionale, pertanto esso può essere considerato come un target per la regolazione enzimatica (Vassilopoulos et al., 2014). L'interazione è sensibile alle variazioni di pH, in quanto

viene coinvolta l'unica istidina del dominio OSCP, quindi quando il pH diminuisce, avviene in seguito alla perdita del potenziale di membrana, si assiste a una riduzione tra Sirt3 e OSCP, con conseguente inibizione dell'attività catalitica dell'ATP sintasi.

Infine, è stato proposto che anche la ciclofilina D (CypD) interagisca con il dominio OSCP e che proprio questa interazione sia responsabile dell'attivazione del PTP (paragrafo 1.4) implicata nei processi apoptotici.

1.3 L'inibitore IF₁

Nel momento in cui la cellula si trova in condizione di ipossia, ovvero insufficienza respiratoria, essendo che non può essere mantenuto il gradiente protonico, l'idrolisi di ATP viene impedita dall'inibitore endogeno IF₁, una proteina di 10 kDa. Tale molecola interagendo con l'ATP sintasi, impedisce la dissipazione di ATP cellulare, senza inibirne la sintesi (Faccenda et al., 2017).

Grazie a studi cristallografici mirati ad analizzare l'interazione tra le forme bovine di ATP sintasi e IF₁, si è osservato che l'inibitore interagisce con la porzione F₁, all'interfaccia tra le subunità α_{DP} e β_{DP} . Tale legame causa il blocco della catalisi rotazionale (figura 7) (Gledhill et al., 2007).

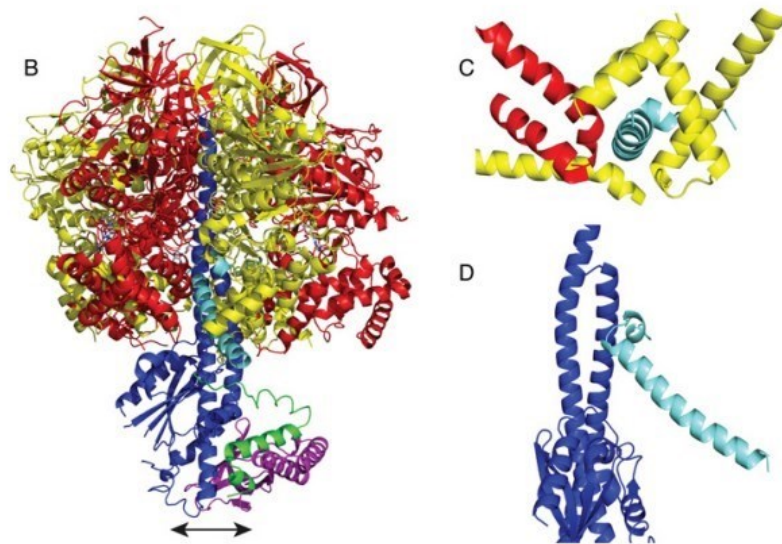


Figura 7: sito di interazione di ATP sintasi con IF₁ (azzurro) (A), particolare interazione con α_{DP} e β_{DP} (rosso e giallo) (B), interazione con lo stalk centrale (blu) (C) (Walker, 2013).

Il gene codificante IF₁ è l'ATPIF1 e nei tessuti umani è presente solamente la prima isoforma delle tre note, ovvero la più lunga e quella maggiormente caratterizzata. Le isoforme sono proteine di diversa lunghezza che si formano a partire dallo stesso gene grazie allo *splicing* alternativo, il quale causa un diverso arrangiamento delle porzioni di RNA codificanti per una determinata proteina, ovvero gli esoni (GarcíaBermúdez & Cuezva, 2016).

IF₁ è una proteina basica di 81 amminoacidi la cui lunghezza può variare a seconda della specie. IF₁ bovina (figura 8) è costituita da 84 residui ed è intrinsecamente disordinata (IDP), ad eccezione di un α -elica situata nella regione C-terminale. Durante l'interazione, la regione N-terminale disordinata si struttura progressivamente in un' α -elica adattandosi al sito di legame.

In vivo, IF₁ non è monomerica ma è coinvolta in un equilibrio tra due stati:

- 1) la forma attiva è costituita da un omodimero in cui le eliche C-terminali dei due monomeri, che coinvolgono i residui che vanno dal 49 al 81, formano un'elica super avvolta antiparallela. Una volta che il dimero è attivo, esso è in grado di interagire con due complessi alla volta.
- 2) L'effetto inibitorio dell'attività idrolitica dell'enzima si ha a valori di pH=6.5 e diminuisce in modo graduale mano a mano che aumenta il pH. A pH superiore a 8, l'inibitore si inattiva formando dimeri di dimeri o aggregati superiori che rendono inaccessibile la porzione inibitoria N-terminale dei monomeri. Si è ipotizzato che la sensibilità al pH e le variazioni che la rendono attiva o meno siano causate dalla protonazione e deprotonazione del residuo H49 (Cabezon et al., 2000).

GSESGDNVRSSAGAVRDAGGAFGKREQAEEERYFRARAKEQLAALKKH
HENEISHHAKEIERLQKEIERHKQSIKCLKQSEDDD

Figura 8: sequenza amminoacidica di IF₁. In rosso la sequenza studiata in questo lavoro di tesi, ovvero i residui 1-60 (Uniprot: P01096).

Le IDP grazie al *fold*ing riescono a adattarsi a siti di *binding* differenti e mediare diverse funzioni biologiche, ciò le rendono importanti fattori di regolazione cellulare. Questa categoria di proteine è ricca di residui polari e carichi e posseggono un basso contenuto di amminoacidi idrofobici. La fosforilazione come modifica post-traduzionale è una modifica che spesso regola i processi di *fold*ing di queste proteine. In particolare, la fosforilazione del residuo S14 di IF₁, da parte della proteina chinasi A (PKA), è una modifica che regola l'attività inibitoria di IF₁, impedendo il suo adattamento al sito di *binding* con il complesso molecolare di ATP sintasi (figura 9) (García-Bermúdez et al., 2015).

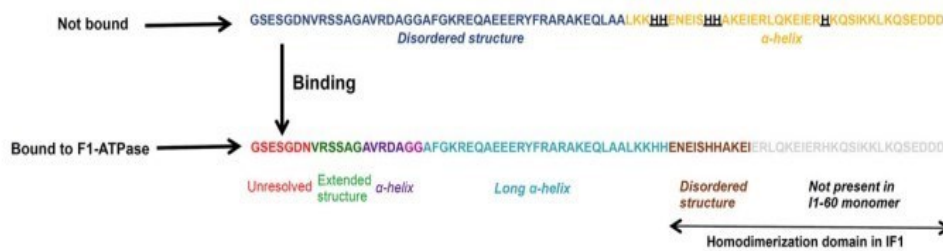


Figura 9: variazione conformazionale della struttura secondaria di IF₁ in seguito all'interazione con il complesso dell'ATP sintasi (García-Bermúdez & Cuezva, 2016).

IF₁ è sovraespressa nelle cellule tumorali del colon, polmoni, ovaie e seno (Sánchez-Aragó et al., 2013) e nei neuroni *in vivo* (Formentini et al., 2014). Le alte concentrazioni di IF₁ inibiscono l'ATP sintasi nella sintesi di ATP, modificando il processo di produzione di energia da parte della cellula. In particolare, viene inibita la fosforilazione ossidativa e avviene la glicolisi aerobica. La variazione del metabolismo energetico è una caratteristica delle cellule tumorali, in quanto riescono a ricavare tutti i metaboliti essenziali per la loro crescita e proliferazione. La sovraespressione di IF₁ è dunque presente nell'oncogenesi di alcune forme di tumore, ma ovviamente non è l'unico fattore in quanto è stata dimostrata l'attivazione della glicolisi aerobica anche in assenza di alti livelli di tale inibitore nei carcinomi di stomaco, reni ed endometrio. Tale effetto è dipendente dalla tipologia di tessuto, da altri fattori e meccanismi di regolazione (Sánchez-Aragó et al., 2013).

Studi recenti sul carcinoma epatico, mostrano che IF₁ promuove la proliferazione cellulare e la formazione di colonie *in vitro*, incrementando i livelli di STAT3 e inibendo l'espressione di *E-cadherin* (Galber et al., 2023).

L'inibizione della sintesi di ATP causa l'iperpolarizzazione di membrana, che porta alla produzione di radicale superossido: una specie reattiva dell'ossigeno (ROS). Quest'ultimo attiva meccanismi difensivi in grado di prevenire la morte cellulare. Infatti, le specie reattive dell'ossigeno sono responsabili dell'incremento dell'attività del fattore di trascrizione NFκB, noto regolatore della risposta immunitaria, dell'infiammazione, della proliferazione cellulare e dell'apoptosi. NFκB promuove la proliferazione cellulare e inibisce l'apoptosi attraverso

l'attivazione di Bcl-xL, una proteina transmembrana anti-apoptotica (Formentini et al., 2012).

Studi recenti suggeriscono che IF₁ si leghi all'ATP sintasi, quando l'enzima lavora in condizioni fisiologiche, e il suo ruolo nel prevenire l'idrolisi di ATP è osservato solo in condizioni di anoressia. In particolare nel gruppo di ricerca in cui è stata svolta questa tesi, è stato dimostrato, mediante studi di interazione tramite NMR, che una porzione di IF₁ N-Terminale, costituita dai primi 40 residui (G1-E40), interagisce con il dominio OSCP-NT (residui R6-G114). Grazie a tale studio si è notato che i segnali maggiormente perturbati sono clusterizzati in un piccolo frammento costituito da dieci amminoacidi, E29-R39, al C-terminale di IF₁-NT. Il gruppo di ricerca successivamente ha testato OSCP-NT marcata con IF₁ 1-40 non marcata, ed è emerso che gli *shift* maggiori si trovano in due regioni distinte della proteina: l'elica H1 e la "shoulder" regione (la stessa in cui si lega Bz423) comprendente le eliche H3, H4 e H5. In particolare i residui che subiscono le variazioni maggiori sono: A53, S54, N57, V60, R62, S63 e I64; i quali si trovano su un'area esposta alla superficie rendendo possibile il legame con IF₁ (figura 10) (Galber et al., 2023).

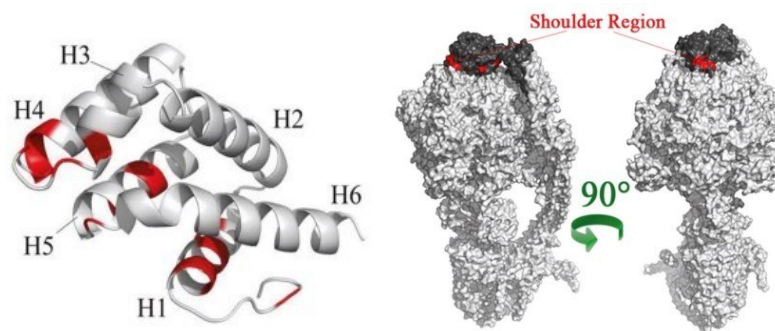


Figura 10: a sinistra vi è la rappresentazione di OSCP-NT dove in rosso sono mostrati i residui che subiscono variazioni di chemical shift maggiore. A destra vi è la rappresentazione della struttura ottenuta mediante cryo-EM di "SUS scrofa ATP synthase" (codice PDB: 6J5J), con due differenti orientazione. In nero è il dominio OSCP-NT, mentre i residui che interagiscono con IF₁-NT sono colorati in rosso (Galber et al., 2023).

1.4 Apoptosi e PTP

L'apoptosi rappresenta la morte cellula programma, ovvero l'ultimo stadio del ciclo cellulare e meccanismo di protezione cellulare nei confronti di errori o disfunzioni.

Alla fine del processo apoptotico la cellula va incontro a disgregazione formando dei corpi rivestiti da membrana, i quali verranno successivamente fagocitati dai macrofagi.

Una delle vie attraverso cui si giunge alla morte cellulare, la via intrinseca, vengono prodotti numerosi stimoli apoptotici di varia natura che causano la transizione di permeabilità mitocondriale, ovvero l'apertura di un poro della membrana mitocondriale interna, il *Permeability Transition Pore* (PTP). Tale apertura causa un aumento della permeabilità a ioni e soluti dissipando il gradiente protonico e impedendo diversi processi biochimici, come la sintesi di ATP. Il verificarsi del PTP per un breve periodo causa una depolarizzazione momentanea della membrana mitocondriale interna e costituisce uno stimolo fisiologico; invece, l'apertura per un lungo periodo causa una depolarizzazione permanente (Petronilli et al., 1999). Inoltre, l'apertura del poro causa un rigonfiamento della matrice fino alla rottura della membrana mitocondriale esterna. In seguito a tale evento vengono rilasciate molecole apoptotiche, compreso il citocromo c, che segnalano l'inizio dell'apoptosi.

La transizione di permeabilità mitocondriale deve dunque essere regolata in modo appropriato, in quanto una sua disfunzione può causare patologie che vanno dall'ischemia (Griffiths & Halestrap, 1993) ad alcune tipologie di distrofie muscolari (Palma et al., 2009) e a molte forme tumorali (Rasola et al., 2010).

Ancora sono assenti informazioni riguardanti la struttura del PTP, ma si ipotizza che sia composto da più proteine transmembrana organizzate in un complesso molecolare di cui è stata studiata la sua regolazione (Zamzami & Kroemer, 2001).

Un'aumentata attività del PTP causa un danneggiamento dei neuroni ed è già stata verificata in diverse malattie neurodegenerative, tra le quali l'Alzheimer. Infine, è stato evidenziato che l'aumento di attività è alla base dei processi di deterioramento cellulare che caratterizzano il normale invecchiamento.

1.4.1 Regolazione

Il PTP è un canale ad alta conduttività modulato da una serie di effettori: la sua apertura viene attivata dal Ca^{2+} (fattore permissivo), dal fosfato inorganico P_i , dallo stress ossidativo e da acidi grassi; la sua apertura è inibita da Mg^{2+} e nucleotidi adeninici (figura 11).

Il pH è un altro fatto che regola l'attivazione del poro. Si ritiene che tale regolazione dipenda dai residui di istidina. Infine, il poro è modulato anche dal voltaggio in quanto a potenziale di membrana negativo, dunque fisiologico, è favorita la forma chiusa; mentre la depolarizzazione favorisce la forma aperta (Bernardi et al., 2006).

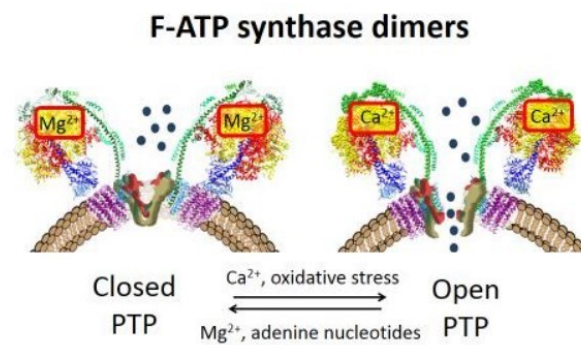


Figura 11: rappresentazione schematica dei principali regolatori della forma aperta e chiusa del PTP (Giorgio et al., 2018).

Sono state riscontrate numerose analogie tra il complesso dell'ATP sintasi e il PTP. *In vitro* è stato osservato che entrambi interagiscono con CyPD e Bz 423, a partire da dimeri di ATP sintasi in presenza di Ca^{2+} e Bz 423, la formazione di canali con correnti simili a quelle del PTP (Giorgio et al., 2013). Mutazioni sito specifiche di residui del dominio OSCP, inoltre, influenzano la formazione e il funzionamento del poro (Carraro et al., 2019). Dunque, è stato ipotizzato che la formazione del poro derivi da un riarrangiamento di dimeri di ATP sintasi, specificatamente nella porzione transmembrana $\text{F}_0\text{-F}_0$ mediata dal Ca^{2+} e favorito anche dall'interazione tra OSCP e CyPD o Bz 423. La ciclofilina D ha la particolarità di promuovere la formazione di PTP incrementandone l'attività, in quanto riduce la soglia di Ca^{2+} necessaria per l'apertura (Giorgio et al., 2013).

Lo stesso effetto è stato riscontrato in seguito alla somministrazione di Bz 423, evidenziando altre analogie tra la ciclofilina e il farmaco, entrambi inibitori

dell'ATP sintasi e induttori di PTP. L'interazione di questi due effettori con il dominio OSCP causa una serie di variazioni conformazionali del complesso molecolare che si trasmettono attraverso lo PS fino alla subunità F_0 , dove dovrebbe formarsi il poro. Infine, Bz 423 ha la peculiarità di incrementare la generazione di superossidi e specie reattive all'ossigeno, i quali sono segnali dell'inizio dell'apoptosi cellulare (Stelzer et al., 2010).

Studi recenti hanno ipotizzato che l'interazione tra OSCP e tali inibitori influenzi anche il *binding* di Ca^{2+} al sito catalitico, aumentando la probabilità di un'apertura del poro (Giorgio et al., 2013). Lo ione Ca^{2+} va a sostituire il Mg^{2+} , un catione presente durante la normale attività catalitica dell'ATP sintasi, e il raggio ionico maggiore del Ca^{2+} nel sito catalitico causa variazioni conformazionali. Tra queste vi è compresa un irrigidimento di F_1 che si trasmette alle eliche di OSCP, in particolare a H2 e H3 (residui 26-55) e al *loop* tra H4 e H5 (residui 74-80). L'energia trasmessa a OSCP verrà successivamente trasferita alla membrana interna attraverso lo *stalk* periferico fino a F_0 (Giorgio et al., 2017).

Un'altra proteina che interagisce e regola sia il PTP che l'ATP sintasi è p53. Non ha un ruolo chiave nella formazione del PTP, ma innesca la sua apertura attraverso l'interazione con CyPD. Si è scoperto che il complesso formato, p53-CyPD, è presente durante l'ischemia cerebrale e che, pretrattando con CsA, si previene la formazione del complesso proteggendo in questo modo il cervello (Vaseva et al., 2012). Come accennato precedentemente, la ciclosporina A interagisce con CyPD contrastandone così l'effetto, sia nei confronti dell'ATP sintasi che del PTP.

Alterazioni di OSCP e del suo ruolo nella formazione di PTP sono responsabili di molte malattie. In particolare l'interazione tra OSCP e la proteina β amiloide ($A\beta$) causa una perdita selettiva di OSCP, tipica dei malati di Alzheimer. La regione di *binding* corrisponde ai residui 107-122 di OSCP e influenza sull'abilità di legare nella maniera appropriata F_1 (Beck et al., 2016). Il legame OSCP- $A\beta$ promuove dunque, l'apertura di PTP causando danni alle sinapsi, nonostante i livelli di CyPD restano inalterati. È stato ipotizzato che in questi casi si instaura un legame anche tra CyPD e $A\beta$; infatti, una carenza di CyPD proteggerebbe i neuroni

dall'indebolimento sinaptico. Grazie a tali scoperte si stanno cercando farmaci che inibiscono la CyPD basati sul complesso cristallizzato CyPD-CsA (Du et al., 2008).

1.4.2 Ruolo di particolari residui di OSCP nella regolazione del PTP

Due residui del dominio OSCP sono importanti per la sua attività di promozione della formazione di PTP e corrispondono a una istidina e una cisteina, ovvero la His 112 e Cys 118.

La regione V111-V116 tra i domini N e C-terminale di OSCP contiene un unico residuo di istidina ben conservato, His 112. È stato proposto che tale residuo sia responsabile dell'effetto inibitorio del pH acido della matrice sul poro. Studi di dinamica molecolare hanno suggerito che la protonazione dell'istidina causa il rilascio di CyPD e uno *shift* di conformazione del poro da una forma aperta a una chiusa. Inoltre, si vengono a instaurare nuove interazioni polari all'interno di OSCP tra questa istidina e E115, e tra la regione HRGE 112-115 e quella 130-135 che a sua volta contatta la subunità b. Tali interazioni sono pH-dipendenti e causano variazioni conformazionali che si propagano sempre lungo lo *stalk* periferico fino alla porzione F₀ intermembrana, dove si ripercuotono sulla conformazione del PTP (Antoniell et al., 2018).

L'ossidazione e la formazione di *cross-link* tra i gruppi tiolici aumenta la probabilità di apertura del poro e costituisce un sistema di regolazione chiave in alcune condizioni patologiche (Petronilli et al., 1994). La regolazione redox coinvolge numerosi siti del complesso molecolare, uno dei quali situati sul dominio OSCP. Esso contiene un'unica cisteina ben conservata nei mammiferi, ovvero la Cys118 (figura 12). Trovandosi in prossimità del sito di legame con la ciclofilina D, si ipotizza che sia un target per l'ossidazione normalmente protetto dal legame con CyPD. Il meccanismo molecolare ancora non è stato risolto, ma l'ossidazione di tale cisteina porta alla formazione di un ponte disolfuro con la cisteina presente su un altro dominio di OSCP. È stata avanzata l'ipotesi che l'ossidazione di Cys118 è coinvolta in un meccanismo cooperativo assieme all'ossidazione di altri residui appartenenti a proteine che compongono il PTP. Per tale motivo tale modifica comporterebbe variazioni conformazionali in grado di indurre l'apertura del poro e l'inizio dell'apoptosi (Carraro et al., 2020).

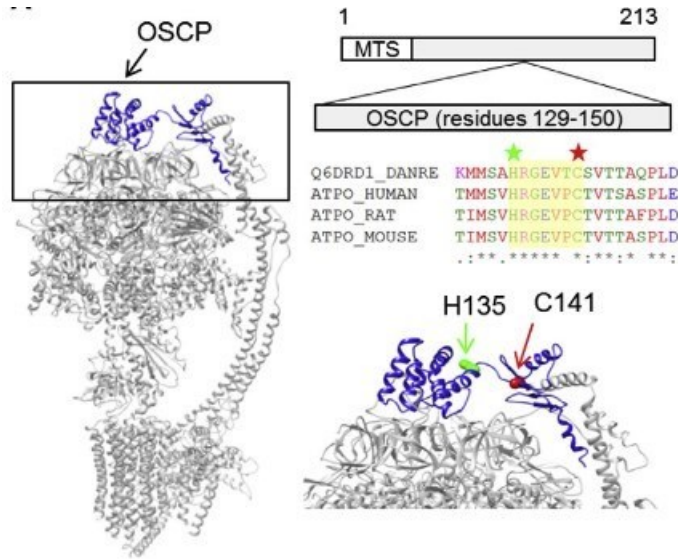


Figura 12: posizione dei residui His 112 e Cys 118 (His 135 e Cys141 considerando i 23 residui che compongono la sequenza MTS) rispetto alle sequenze nucleotidiche di diverse specie (uomo, ratto, topo e zebrafish) e rispetto al dominio OSCP (Carraro et al., 2020).

2 Scopo del progetto di tesi

Lo scopo del progetto di tesi è di confermare l'epitopo di legame tra il dominio OSCP-NT e la proteina mitocondriale IF₁, andando a prendere in considerazione i primi 60 residui all'estremità N-terminale di quest'ultima. Tale progetto ha l'obbiettivo di confermare l'interazione già precedentemente verificata con un costrutto più piccolo di IF₁ costituito dai primi 40 residui dell'estremità N-terminale (Galber et al., 2023).

In questo progetto si è proceduto ad ottimizzare la crescita dei batteri di *E. coli* BL21 (DE3) trasformati con un vettore pET SUMO contenente la sequenza nucleotidica delle proteine di interesse. La crescita è avvenuta in due differenti tipi di terreno, uno LB e uno M9. L'espressione in terreno minimo M9 ha permesso di marcare le proteine con l'isotopo ¹⁵N con scarsa abbondanza naturale (0.7%) ma necessario per poter generare spettri NMR bidimensionali utili per lo studio di interazione.

La fase successiva della crescita riguarda la purificazione di OSCP-NT e IF₁ 1-60 mediante tecniche cromatografiche in particolare cromatografia di affinità IMAC, *Desalting*, Scambio ionico (anionico e cationico) e cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC).

Le proteine purificate sono state utilizzate per studi di interazione mediante NMR.

Per confermare l'interazione tra OSCP-NT e IF₁ 1-60, è stata eseguita un'analisi mediante spettrometria di massa in condizioni native.

3. Materiali e metodi

3.1 Espressione di proteine per via ricombinante

La possibilità di esprimere le proteine per via ricombinante ha dato un impulso enorme alla ricerca, diventando il metodo principale per la produzione di proteine in quantità e purezza adeguate alla analisi biochimiche. In questo lavoro di tesi il

dominio N-terminale del dominio OSCP (residui 6-114) e il dominio N-terminale di IF₁ (residui 1-60) sono stati prodotti attraverso espressione ricombinante grazie a un plasmide, contenente la sequenza di DNA che codifica le proteine di interesse nei batteri. Il plasmide è stato precedentemente ottimizzato in modo tale che la proteina venga espressa garantendo rese proteiche massime e che siano pronte per i successivi processi di estrazione e purificazione.

3.1.1 L'ospite

L'ospite preso in considerazione per introdurre il vettore di espressione è il batterio Gram negativo *Escherichia coli*. Esso ha la peculiarità di avere un tempo di riproduzione di circa 20 minuti ottenendo così colture cellulari ad alta densità in breve tempo. Inoltre, i terreni di coltura ricchi di nutrienti sono mediamente poco costosi e facilmente reperibili. Infine, il processo di trasformazione con DNA esogeno è semplice e veloce.

Il ceppo batterico utilizzato è BL21(DE3), il quale contiene numerose mutazioni che lo rendono efficiente, tra le quali la delezione del gene per l'enzima Lon proteasi, responsabile della degradazione di proteine esogene. Un altro gene assente è quello codificante per la proteasi OmpT la quale degrada le proteine extracellulari. L'assenza delle due proteasi è fondamentale, in quanto evita la possibile degradazione delle proteine ricombinanti all'interno della cellula o successivamente la loro lisi. Tale linea batterica presenta una mutazione hsdSB, grazie alla quale il DNA non viene metilato e degradato, essenziale per prevenire la perdita del plasmide. Infine, BL21(DE3) è caratterizzata da una minore produzione di acetato, nonostante gli alti livelli di glucosio utilizzati per la sovrapproduzione (Rosano & Ceccarelli, 2014).

BL21(DE3) contiene inoltre il gene T7 RNAP codificante per la RNA polimerasi del fago T7, fondamentale per la regolazione dell'espressione della proteina ricombinante. Questa RNA polimerasi risulta essere più efficiente di quella batterica e viene impiegata solo nella trascrizione del gene codificante la proteina di interesse. Infatti, la sua espressione è controllata da geni repressori dell'operone lac e viene indotta dalla presenza dell'IPTG, isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside, un analogo non idrolizzabile del lattosio.

3.1.2 Il plasmide

Il vettore di espressione utilizzato in questo lavoro di tesi è un plasmide, ovvero un breve filamento di DNA di forma circolare, contenente, oltre al gene che codifica la proteina di interesse, una serie di elementi fondamentali per regolare la sovraespressione.

Il plasmide utilizzato è ChampionTM pET SUMO (ThermoFisher Scientific) (figura 13) il cui nome deriva dal gene che codifica la proteina di fusione SUMO, *Small Ubiquitin-related Modifier*. Quest'ultima è una proteina con un peso molecolare di 11 kDa, in particolare la proteina Smt3 di *Saccharomyces cerevisiae*, analoga della SUMO-1 presente nei mammiferi. Tale proteina possiede molteplici funzioni e partecipa al trasporto di molecole, all'apoptosi, all'attivazione e stabilizzazione di proteine, alla risposta allo stress e al ciclo cellulare (Young et al., 2012). SUMO viene utilizzata come partner di fusione nell'espressione di proteine ricombinanti, in quanto favorisce il *folding* e la stabilizzazione strutturale della proteina a cui è legata e ne aumenta la solubilità (Malakhov et al., 2004).

Il plasmide codifica anche per un target di affinità, ovvero l'His-tag, una sequenza di sei istidine legata alla proteina SUMO, a sua volta legata alla proteina di interesse. La funzione dell'His-tag è quella di permettere la purificazione facilitata della proteina dal lisato batterico in quanto, come approfondito in seguito, si lega alla fase stazionaria di particolari colonne cromatografiche, ovvero l'IMAC.

Per ottenere solamente la proteina di interesse è necessario separarla da SUMO, quindi anche dall'His-tag, pertanto è stato introdotto un sito di taglio riconosciuto da una specifica SUMO proteasi (Ulp1).



Figura 13: rappresentazione schematica delle componenti del plasmide Champion pET SUMO. Da pET System Manual (Life Technologies, 2010).

Come si nota dalla figura 13, il plasmide utilizzato presenta anche il replicone pBR322 ori, che regola e definisce il numero di copie prodotte e un gene per la resistenza all'antibiotico Kanamicina (marker di selezione) che viene aggiunto nel terreno di coltura durante la fase di espressione. Tale gene di resistenza all'antibiotico è fondamentale in quanto continueranno a replicarsi solamente i batteri in cui il processo di trasformazione, ovvero dell'introduzione del plasmide, sia avvenuto correttamente. I possibili contaminanti, privi del marker di selezione, non riusciranno a replicarsi all'interno della coltura.

L'aspetto principale della sequenza del plasmide scelto è il sistema di regolazione ed espressione della proteina eterologa. pET SUMO possiede il promotore del fago T7, *T7 promoter*, che viene riconosciuto e promuove l'utilizzo della più efficiente RNA polimerasi del fago, invece dell'analoga batterica, per trascrivere il gene della proteina. Per tale ragione nel genoma batterico è stato integrato il gene codificante l'enzima virale.

Prima dell'introduzione dell'induttore, IPTG, ovvero la fase di induzione, come per l'espressione del gene T7 RNAP inserito nel genoma batterico, l'espressione della proteina è impedita dalla proteina-repressore lacI, a sua volta codificata a partire del gene omonimo lacI presente nella sequenza del plasmide. La proteina si lega in corrispondenza del gene lacO chiamato anche operatore, che precede il T7 promoter regolando quindi la trascrizione della sequenza che codifica per la proteina.

L'induzione con IPTG ha un duplice effetto:

1. a livello del genoma batterico permette la trascrizione e quindi l'espressione dell'RNA polimerasi del fago T7;
2. a livello del plasmide permette l'accesso della polimerasi fagica al gene codificante la proteina di interesse (figura 14).

Il promotore è seguito dal gene della proteina e dal T7 term, che fa in modo che per il resto della replicazione si possa tornare ad usare l'RNA polimerasi del batterio.

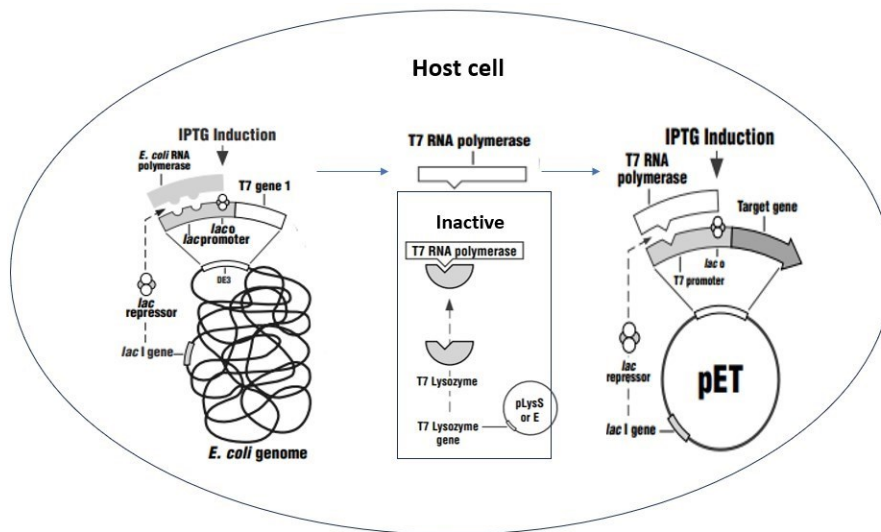


Figura 14: sistema di regolazione della proteina ricombinante ed effetto dell'induzione con IPTG nel genoma batterico (a sinistra) e nel plasmide (a destra) (EMD Biosciences, 1971).

3.1.3 Trasformazione

Una volta individuati ed ottimizzati sia il vettore di espressione sia l'ospite, il passaggio successivo per la produzione di proteine ricombinanti è la trasformazione, ovvero l'introduzione del vettore di trasformazione all'interno della cellula batterica. Tale passaggio viene svolto alternando temperature di 0 e 42°C in presenza di CaCl₂ in modo tale che l'ospite integri correttamente il plasmide. La cellula batterica è in grado di acquisire il vettore di espressione e prende il nome di cellula competente, in quanto si vengono a formare dei pori sulla parete cellulare, dovuto allo shock termico, che consentono l'entrata del plasmide. Quest'ultimo

viene ottenuto mediante *Polymerase Chain Reaction*, ovvero PCR, che consente di ottenere in tempi brevi copie di sequenze genetiche specifiche.

3.2 Terreni di coltura

Per la fase di espressione è essenziale che il terreno di coltura sia ottimale, esso può essere complesso o sintetico a seconda della tipologia e concentrazione di sostanze nutrienti introdotte. Il terreno complesso contiene sostanze come l'estratto di lievito o carne e peptoni, ovvero idrolisati derivanti dalla parziale digestione proteolitica, consentendo una crescita batterica ed espressione veloci. Il terreno sintetico, invece, ha una composizione nota di sali, vitamine, metalli pesanti e zuccheri necessari per la crescita dei batteri. Questa tipologia di terreno è quello maggiormente utilizzato quando si vogliono produrre proteine marcate isotopicamente, ad esempio per fare studi NMR, in quanto basta sostituire una delle sostanze con la corrispondente contenente l'isotopo di interesse.

In questo lavoro di tesi verrà utilizzato il terreno complesso LB, *Lysogen Broth*, per le proteine dei batteri che non presenteranno la marcatura; mentre per quelle che saranno marcate si utilizzerà il terreno sintetico M9.

La composizione del terreno LB per un litro è la seguente:

- 5 g di Estratto di lievito;
- 10 g di Triptone; - 10 g di NaCl.

Per quanto riguarda invece il terreno M9, sempre per un litro di coltura, la composizione è:

- Na_2HPO_4 : 6 g;
- KH_2PO_4 : 3 g;
- NaCl: 0.5 g;
- MgSO_4 : 1 mL 1 M;
- Glucosio ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$): 4 g;
- $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$: 1 g;
- Soluzione Q metalli pesanti: 2 mL; - Vitamine vit-mix: 2 mL.

3.2.1 Espressione

Successivamente al processo di trasformazione vi è un periodo di crescita batterica e solo dopo l'introduzione dell'induttore, IPTG, si ha l'espressione della proteina ricombinante.

Inizialmente la crescita avviene *overnight* in un piccolo volume di terreno, chiamato preinoculo o precoltura, in una beuta da 500 mL contenente:

- 100 mL Terreno LB; -
100 μ L Kanamicina 50 mg/mL;
- Puntale sporco di batteri.

Il preinoculo viene posto ad agitare *over-night* a 37°C.

Successivamente si esegue il cambio scala effettuando la crescita in 1-2 litri di terreno, sempre sotto agitazione a 37°C, con l'aggiunta di 1 mL di Kanamicina 50 mg/mL, in ogni litro di coltura. Per ottimizzare la resa proteica, l'induzione avviene ad uno stadio opportuno della crescita batterica, la quale viene monitorata attraverso la misura della densità ottica alla lunghezza di 600 nm, OD₆₀₀, direttamente proporzionale alla concentrazione dei batteri nella coltura.

La densità ottica viene misurata grazie a uno spettrofotometro da banco impostato alla lunghezza d'onda di 600 nm in cui, una volta effettuata la misura del bianco, si inserisce un campione di coltura in una cuvetta di plastica. Lo strumento misura la torbidità del campione in quanto i batteri sospesi in soluzione, essendo di dimensioni comparabili alla lunghezza d'onda incidente, diffondono la luce della sorgente. La luce arriva parzialmente, per diffusione quindi e non per assorbimento, al rivelatore, il quale effettua una misura in assorbanza. Il valore ottenuto è lineare con la concentrazione di batteri solo fino a valori inferiori a 1.

Si possono individuare diverse fasi di crescita batterica (figura 15):

1. una prima fase di latenza (*lag phase*);
2. una fase di crescita esponenziale (*log or exponential phase*), durante la quale i batteri si riproducono velocemente per fissione binaria;

3. una fase stazionaria (*stationary or saturation phase*), in cui si instaura un equilibrio tra cellule morte e cellule riprodotte;
4. fase di declino in cui alla carenza di nutrienti causa una riduzione della popolazione batterica (*death phase*).

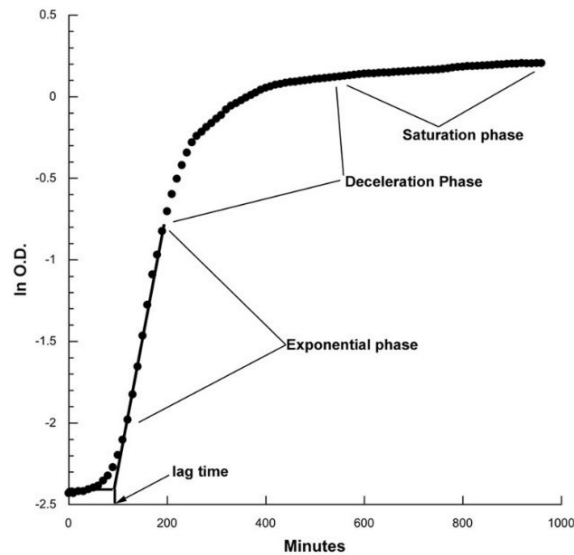


Figura 15: rappresentazione grafica di una tipica curva di crescita batterica, senza la fase di declino, in un terreno di coltura (Hall et al., 2014).

L'induzione avviene idealmente alla fine della fase esponenziale, generalmente ad OD₆₀₀ compresi tra 0.6 e 1 affinché la resa di proteina sia massima, in questo lavoro di tesi l'induzione viene effettuata a un valore di OD compreso tra 0.8 e 0.9. Se l'induzione avvenisse troppo presto, potrebbe rallentare la crescita batterica e portare a una resa inferiore. Una volta aggiunto l'IPTG 1 M, 250 µL per ogni beuta contenente 500 mL di coltura batterica, le colture vengono lasciate sempre overnight e sotto agitazione, ma abbassando la temperatura a 20°C; per avere un'eccellente espressione è necessario che la coltura batterica sia già a 20°C. L'abbassamento della temperatura è fondamentale, altrimenti le proteine ricombinanti vanno a finire nei corpi di inclusione rendendo la fase di purificazione più complicata.

La crescita batterica ovviamente è influenzata da diversi fattori: pH, concentrazione salina, temperatura, quantità di nutrienti e ossigeno; pertanto, risulta un processo soggetto a molte variabili che deve essere ottimizzato in ogni fase.

3.3 Purificazione

Circa 20 ore dopo l'induzione, l'espressione si considera conclusa e si procede con la purificazione, attraverso la quale si vuole ottenere solamente la proteina di interesse, separata dal partner di fusione e biomolecole prodotte da *E. coli*.

Innanzitutto si separa il pellet batterico dal terreno di coltura (surnatante), mediante centrifugazione a 5000/5500 rcf, per 20 minuti a 4°C.

Il pellet ottenuto viene sospeso nel buffer di lisi contenente NaCl, un tampone e vari additivi tra cui: inibitori di proteasi come il fenilmetilsolfonil fluoruro (PMSF), inibitore della serina proteasi, antiossidanti come β -mercaptoetanololo (β -ME), e DNasi, enzimi che idrolizzano il DNA. In questo lavoro di tesi il tampone di lisi, 15-20 mL, è costituito da:

- Buffer A IMAC;
- 2% Buffer B IMAC;
- Inibitore di proteasi; - DNasi.

La fase seguente prevede la lisi dei batteri attraverso sonicazione o, come effettuato in questo lavoro di tesi, tramite pressa. La *French press* è un sistema pneumatico composto da una camera di compressione in acciaio inox, chiusa da una valvola a spillo e un pistone. Dopo aver rimosso l'aria nella camera, viene azionato il pistone che applica pressioni molto elevate (fino a 1000 atm) al campione. Aprendo la valvola a spillo, i batteri subiscono una variazione di pressione tale da portare ad una rottura meccanica della parete cellulare. Si è ottenuto una soluzione costituita da due fasi, una insolubile data dai frammenti di parete cellulare e una fase solubile contenente proteine e componenti cellulari, tra cui la proteina di interesse. Essa è mantenuta in soluzione dal partner di fusione SUMO, il quale previene così che la proteina rimanga nei corpi di inclusione, rendendo quindi più complicata la purificazione.

Per separare le due fasi, la sospensione viene centrifugata a 10000 rcf, per 40 minuti, a 4°C.

La purificazione avviene mediante tecniche cromatografiche che permettono, come detto, di separare le componenti di una miscela sfruttando le differenze di dimensione, carica e affinità per un catione metallico e quindi la diversa ripartizione tra la fase mobile e stazionaria.

3.3.1 Cromatografia FPLC

La cromatografia FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*, è una cromatografia liquida utilizzata per separare miscele di biomolecole, in quanto lavora a pressioni inferiori (0.3-0.4 MPa) rispetto all'analoga HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*. Lo strumento è composto da:

- due pompe, essenziali per creare miscele di buffer con gradienti diversi;
- da un *loop* attraverso cui viene caricato e iniettato il campione;
- da una valvola che regola e mantiene costante il flusso;
- da uno spettrofotometro UV che funge da rivelatore e permette di monitorare l'uscita della biomolecola di interesse.

La tecnica ha lo scopo di isolare le diverse componenti di una miscela mediante l'utilizzo di colonne composte da una fase stazionaria attraverso cui vengono fatti fluire la miscela e l'eluente. A seconda della tipologia di fase stazionaria, si distinguono diverse colonne e relative tecniche cromatografiche.

Un protocollo di purificazione generalmente richiede più di una tecnica cromatografica per ottenere la proteina pura e senza partner di fusione. Di conseguenza a ogni passaggio si perde una determinata quantità di campione, abbassando quindi la resa finale. Per tale motivo, una buona purificazione deve prevedere il minor numero di step possibili per ottenere il grado di purezza desiderato.

3.3.2 Cromatografia IMAC

Il tag di affinità composto da sei istidine, l'His-tag, facilita il processo di purificazione in quanto permette di utilizzare una specifica cromatografia di affinità, ovvero la cromatografia IMAC, *Immobilised Metal Affinity Chromatography*. La tecnica prevede l'utilizzo di una colonna contenente una matrice di agarosio in microsferi su cui sono immobilizzati ioni metalli, in questo

caso Ni^{2+} , grazie l'utilizzo dell'agente chelante NTA, acido nitrilotriacetico (figura 16).

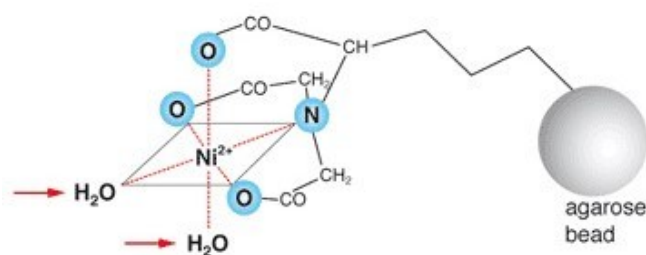


Figura 16: geometria di coordinazione dello ione Ni^{2+} immobilizzato tramite NTA alla microsfera di agarosio. Quando non sono presenti anelli imidazolici, lo ione si coordina a due molecole di acqua, come indicato dalle frecce rosse.

Durante il passaggio in colonna del lisato batterico, la proteina di interesse viene trattenuta tramite le sei istidine del tag che si coordinano ai due siti liberi dello ione della fase stazionaria. Le altre biomolecole prodotte dalla cellula ospite non vengono trattenute ed escono con il fronte della colonna. Per eluire, dunque staccare, la proteina si utilizza un buffer con alta concentrazione di imidazolo, il quale compete con l'His-tag e, ad alte concentrazioni, lo sostituisce completamente nel sito di coordinazione.

Per questa tecnica si utilizzano due buffer acquosi, denominati semplicemente buffer A e buffer B, entrambi contenenti un tampone, sale, additivi e, nel buffer B di eluizione, imidazolo ad una concentrazione di 500 mM. È fondamentale il pH basico per evitare di protonare i residui di istidina che altrimenti non potrebbero coordinarsi allo ione metallico della colonna.

La composizione dei buffer per OSCP-NT e per IF₁ 1-60 è la seguente:

- Buffer A: 50 mM Na_2HPO_4 ; 300 mM NaCl; pH 7.8; -
Buffer B: Buffer A + 500 mM Imidazolo, pH 7.8.

Prima di iniettare il campione in colonna è necessario equilibrare la colonna. Conviene utilizzare una piccola percentuale, di solito 2%, di buffer B anche nel caricamento, per evitare che altre proteine con bassa affinità, si possano legare allo ione Ni^{2+} magari attraverso istidine vicine per sequenza o per *folding*. La conducibilità alla fine della fase di equilibratura deve avere un valore pari a 35

mS/cm. Bisogna inoltre monitorare la pressione all'interno della colonna, la quale non deve superare i 0.3 MPa. Il flusso impostato è pari a 1 mL/min.

Una volta iniettato il campione in colonna, tramite *Super-Loop*, bisogna attendere che il segnale UV si stabilizzi e che la conducibilità torni al valore prestabilito. Arrivato a questo punto si può eluire la proteina di interesse con un gradiente lineare 2-50% di B in due minuti. Il protocollo di purificazione per la cromatografia IMAC è uguale sia per IF₁ 1-60 (vedi figura 29 capitolo 4.2) che per OSCP-NT (vedi figura 25, capitolo 4.1), mentre nelle successive purificazioni si utilizzeranno buffer con composizioni diversi e anche cromatografia diverse, come spiegato successivamente.

La cromatografia IMAC costituisce perciò il primo step di purificazione dopo la lisi batterica e permette di ottenere la proteina ricombinante con il suo partner di fusione in buffer B e priva della maggior parte delle biomolecole del lisato batterico. Lo stadio successivo prevede il taglio del partner di fusione attraverso Ulp1, la proteasi specifica per la rimozione di SUMO e di conseguenza anche dell'His-tag. Prima di procedere è importante rimuovere l'imidazolo in soluzione in quanto inibisce fortemente con la SUMO proteasi. La tecnica con cui viene rimosso l'imidazolo è analoga a una cromatografia ad esclusione dimensionale, SEC, e prende il nome di *Desalting*.

3.3.3 Cromatografia ad esclusione dimensionale, SEC

La *Size Exclusion Chromatography*, SEC, è una tecnica cromatografica che permette di dividere una miscela di composti sulla base della loro dimensione molecolare, PM. Tali colonne hanno la fase stazionaria costituita da microsfele di destrano, polimero ramificato di glucosio, con pori di uno stretto range di dimensioni in equilibrio con una fase mobile adatta agli analiti da separare. Una volta iniettato il campione, le molecole di dimensioni maggiori rispetto a quelle dei pori verranno escluse ed usciranno con il fronte della colonna dopo aver attraversato gli spazi interstiziali tra le microsfele della colonna. Le molecole più piccole, invece, compiranno un percorso più lungo all'interno della colonna passando anche attraverso i pori ed eluiranno dopo un certo volume di ritenzione dipendente quindi dalle dimensioni molecolari (Wilson and Walker, 2005).

Prima del taglio della proteina con la SUMO proteasi, come accennato in precedenza, il campione viene sottoposto a uno step di *Desalting*. La proteina viene eluita con il fronte della colonna perché di grandi dimensioni rispetto all'imidazolo, che invece viene eluito a un volume maggiore. Prima di iniettare il campione bisogna concentrarlo fino a un volume di 5 mL, in quanto nella *Desalting* non si utilizza il *Super-Loop* da 50 mL ma un *Loop* da 5 mL. Per concentrare i campioni si utilizzano dei concentratori NeoSpin aventi delle membrane con *cut-off* variabili. In questo lavoro sono stati utilizzati dei concentratori con un *cut-off* di 5 kDa per IF₁ 1-60; mentre per quanto riguarda OSCP-NT il *cut-off* è di 10 kDa per concentrare prima della *Desalting*, mentre successivamente sono stati utilizzati dei concentratori con un *cut-off* di 5 kDa.

Il buffer *Desalting* per OSCP-NT è uguale al buffer A dell'IMAC; mentre per quanto riguarda IF₁ 1-60, il suo buffer è costituito da:

- 20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 8.

La conducibilità per quanto riguarda OSCP-NT sarà uguale a quella dell'IMAC, ovvero circa 35 mS/cm. Mentre per quanto riguarda IF₁ 1-60 la sua conducibilità sarà pari a 18 mS/cm. Questa tipologia di colonna consente di andare a flussi relativamente alti in quanto il valore massimo di pressione che può raggiungere è 0.15 MPa. In questo lavoro di tesi abbiamo utilizzato un flusso di 3 mL/min. Sia IF₁ 1-60 che OSCP-NT (figura 30 del capitolo 4.2 e figura 26 capitolo 4.1 rispettivamente) escono intorno a un volume di 10 mL.

In seguito, il campione viene sottoposto a un periodo di taglio del partner di fusione, mediante aggiunta di 20 µL di Sumo proteasi 0.8 mg/mL, *overnight*.

Il protocollo di taglio è diverso per le due proteine, in particolare OSCP-NT viene posta a tagliare a 15°C, mentre IF₁ 1-60 a 4°C. Il giorno seguente si procede con le restanti due cromatografie, ovvero la scambio ionico e la SEC.

3.3.4 Scambio ionico

La cromatografia a scambio ionico si basa sulle interazioni elettrostatiche che la proteina instaura con la fase stazionaria della colonna. Tale tipologia di cromatografia si suddivide in cromatografia a scambio anionico, AEC, e cationico,

CEC, a seconda se la fase stazionaria è carica positivamente o negativamente rispettivamente.

È essenziale andare a regolare il pH a seconda del punto isoelettrico, pI, della proteina in esame. Nella cromatografia a scambio anionico il pH deve essere basico, in modo tale che le proteine acquisiscono una carica negativa e possono legarsi alla fase stazionaria. Viceversa, per quanto riguarda la cromatografia a scambio cationico, il pH deve essere acido in modo tale che le proteine acquisiscono una carica positiva e possono così legarsi alla fase stazionaria della colonna.

L'eluizione nelle cromatografie a scambio ionico viene effettuata alzando la forza ionica, in particolar modo la concentrazione di NaCl, in quanto aumentandola si indeboliscono le interazioni elettrostatiche e le proteine usciranno in base al punto isoelettrico.

Le proteine prese in esame in questo lavoro di tesi sono state sottoposte una allo scambio cationico (OSCP-NT) e una allo scambio anionico (IF₁ 1-60).

Scambio cationico

Prima di procedere alla purificazione tramite CEC di OSCP-NT è necessario diluire due volte il campione con 20 mM Na₂HPO₄, per abbassare ulteriormente la forza ionica in modo tale da consentire il legame della proteina alla fase stazionaria.

I buffer utilizzati per la CEC sono costituiti da:

- Buffer A: 50 mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl; pH 7; -
- Buffer B: 50 mM Na₂HPO₄; 1 M NaCl; pH 7.

La conducibilità al termine della fase di equilibratura della colonna è pari a 20/21 mS/cm. Mentre la pressione massima che si può raggiungere in questa colonna è pari a 0.30 MPa e si utilizzano dei flussi di 1 mL/min.

Una volta raggiunto il valore ottimale di conducibilità, viene iniettato il campione in colonna, viene scartato tutto ciò che non si lega e successivamente si passa all'eluizione di OSCP-NT con un gradiente lineare di buffer B fino al 50%. Successivamente si lava la colonna con il 100% di buffer B e si riequilibra mediante l'utilizzo di buffer A. Generalmente per un processo di purificazione con questa

tipologia di cromatografia si eseguono due caricamenti in quanto si utilizza un *loop* da 5 mL (figura 27 capitolo 4.1).

Una volta ottenuto il campione si esegue l'ultima cromatografia, ovvero una SEC analitica; perciò, si deve concentrare il campione fino a 1 mL.

Scambio anionico

Il giorno dopo il taglio con la SUMO proteasi il campione viene diluito di circa sei/sette volte utilizzando il buffer A della AEC, per abbassare, come con OSCPNT, la forza ionica del campione. Il pI di IF₁ 1-60 è 6.8.

I buffer utilizzati per la AEC sono costituiti da:

- Buffer A: 20 mM Tris; pH 8;
- Buffer B: 20 mM Tris; 500 mM NaCl; pH 8.

la conducibilità della colonna dopo averla equilibrata è pari a 1 mS/cm. Arrivato a questo valore si può iniettare IF₁ 1-60, mediante due caricamenti diversi, nel *SuperLoop* per poi passare in colonna. Anche in questa tipologia di cromatografia la pressione massima raggiungibile è pari a 0.30 MPa e si lavora a un flusso di 1 mL/min.

Per eluire la proteina si utilizza un gradiente a gradino al 15%, raggiungendo un valore di conducibilità pari a 8 mS/cm, alla quale IF₁ 1-60 si stacca. Successivamente si alza la conducibilità fino al 100% per consentire il distacco della proteina SUMO, la quale si stacca intorno al 20/25% di B. Dopo aver equilibrato nuovamente la colonna si effettua il secondo caricamento (figura 31 capitolo 4.2).

Viene rilevato un basso valore di assorbanza dovuto al basso coefficiente molare (ϵ) di IF₁ 1-60 pari a 1490 M⁻¹cm⁻¹.

Una volta raccolto entrambi i caricamenti si passa a concentrare le proteine per arrivare a un volume inferiore di 1 mL in quanto si caricherà successivamente nella SEC analitica.

3.3.5 SEC analitica

L'ultima cromatografia per entrambe le proteine prese in esame è una *Size Exclusion Chromatography* analitica, il cui funzionamento è uguale a quello descritto precedentemente. Tale tipologia di cromatografia consente di lavorare a pressioni maggiori rispetto alle precedenti, arrivando fino a 1.5 MPa. Il flusso però viene abbassato fino a un valore di 0.5 mL/min.

Il buffer utilizzato per OSCP-NT è composto da:

- 50 mM Na₂HPO₄; 300 mM NaCl; pH 7.8.

Il buffer di IF₁ 1-60 invece presenta una forza ionica inferiore ed è composta da:

- 20 mM Na₂HPO₄; 50 mM NaCl; pH 7.

Come accennato precedentemente, il campione deve essere concentrato fino a 0.5/1 mL in quanto si utilizza un *Loop* da 0.5/1 ml. La conducibilità deve essere:

- OSCP-NT: 35 mS/cm; - IF₁ 1-60: 8 mS/cm.

Una volta raggiunti tali valori di conducibilità le proteine possono essere iniettate nel *loop* e successivamente in colonna. Generalmente in questa tipologia di cromatografia si fraziona. Il cromatogramma di OSCP-N viene riportato in figura 29 capitolo 4.1, mentre quello di IF₁ 1-60 in figura 33 capitolo 4.2

Una volta recuperata le varie frazioni contenenti la proteina di interesse si passa a quantificarla mediante spettroscopia UV-Vis. Le proteine successivamente vengono congelate mediante l'utilizzo di azoto.

3.4 Quantificazione mediante spettroscopia UV-Vis

Il metodo maggiormente utilizzato per quantificare le proteine in soluzione è la spettroscopia UV-Vis, attraverso la misura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 280 nm. I residui aromatici di tirosina e triptofano presentano un massimo di assorbimento a questa lunghezza d'onda. L'assorbimento può essere dovuto anche all'eventuale presenza di cistine, ovvero residui di cisteina legati da ponti disolfuro. Le proteine da quantificare devono quindi contenere almeno residui di triptofano affinché il metodo sia efficace. Dalla misura di assorbanza si ricava la

concentrazione del campione attraverso la legge di Lambert-Beer (Eq.1), che lega l'assorbanza, ABS, al prodotto tra: il coefficiente di estinzione molare, ϵ , in $M^{-1}cm^{-1}$; il cammino ottico della cella, l , in cm; e la concentrazione molare del campione, C .

Eq. 1:
$$Abs_{280nm} = \epsilon_{280nm} l C$$

Il coefficiente di estinzione molare a 280 nm può essere stimato attraverso il metodo di Edelhoch (Edelhoch, 1967), una relazione (Eq. 2) basata sul numero di residui che contribuiscono all'assorbimento:

Eq. 2:
$$\epsilon_{280nm} = 5500 n^{\circ}_{Trp} + 1490 n^{\circ}_{Tyr} + 125 n^{\circ}_{Cistine}$$

Il coefficiente di estinzione molare a 280 nm per le proteine prese in esame in questo lavoro di tesi sono:

- 5960 $M^{-1}cm^{-1}$ per OSCP-NT; -
- 1490 $M^{-1}cm^{-1}$ per IF₁ 1-60.

Attraverso uno studio statistico su diversi campioni di proteine in soluzione acquose (Pace et al., 1995), si è dimostrata l'efficace della relazione nel fornire una buona stima del coefficiente ϵ_{280} , nonostante esso non consideri l'effetto di parametri come il pH e la temperatura e assuma i residui liberi. La deviazione media infatti è del $\pm 2.0\%$ rispetto ai valori presenti in letteratura.

Misurare l'assorbanza a 280 nm rappresenta il metodo maggiormente utilizzato, in quanto è una tecnica non distruttiva; quindi, una volta che si effettua la misurazione del campione esso può essere recuperato. Infine, tale tecnica ha il vantaggio di essere veloce, per cui può essere impegnata per monitorare in continuo l'eluizione di una cromatografia e la concentrazione di un campione.

3.5 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica attraverso la quale le molecole che compongono un campione vengono ionizzate e portate in fase gassosa prima di essere separate e quantificate in base al loro rapporto massa su carica (m/z). È una tecnica che consente di verificare l'identità e la purezza del campione e di avere informazioni sulla massa delle specie presenti in soluzione e ad esempio, nel caso delle proteine, sulla presenza di prodotti di proteolisi aspecifiche.

I componenti principali di uno spettrometro di massa sono: sistema per il vuoto, apparato di iniezione del campione comprendente solitamente un cromatografo, a fase liquida o gassosa, una camera di ionizzazione, sorgente di ioni per convertire le molecole in ioni in fase gassosa, analizzatore e rivelatore (*detector*).

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato uno spettrometro di massa ESI-TOF, caratterizzato dalla ionizzazione del campione attraverso *electrospray ionization* (ESI) e da un analizzatore a tempo di volo (TOF). La sorgente ESI prevede la nebulizzazione e ionizzazione del campione attraverso il passaggio dell'analita in un capillare a cui è applicato un elevato campo elettrico (circa 5 kV alla fine del capillare). In questo modo si formano piccole gocce cariche di analita ionizzato da cui viene successivamente rimosso il solvente, tipicamente 50:50 acqua e solvente organico, mediante evaporazione prima dell'ingresso nell'analizzatore (si applicano temperature che raggiungono anche 200/300 °C). In seguito all'evaporazione del solvente, la densità di carica aumenta fino al punto in cui le forze di Coulomb superano la tensione superficiale della goccia e causano la dispersione in gocce più piccole (figura 17).

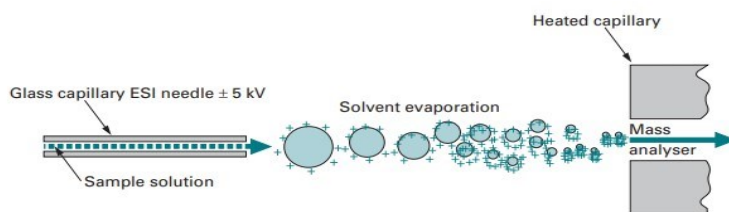


Figura 17: schema della ionizzazione con ESI. Il campione passa attraverso un capillare a cui viene applicato un campo elettrico, uscendo viene ionizzato e

nebulizzato fino alla separazione in gocce molto piccole per evaporazione del solvente (Wilson and Walker, 2005).

La ionizzazione ESI è soft, ovvero produce una scarsa frammentazione, preservando la struttura molecolare del campione e per questo si parla anche di ione molecolare. Nello specifico, da campioni contenenti macromolecole si possono formare ioni a carica singola $(M+H)^+$, ioni multicarica $(M+nH)^{n+}$ e addotti con il sodio $(M+Na)^+$. Per quanto riguarda gli spettri di massa di proteine, la carica massima che si osserva tra gli ioni che si formano da un campione è determinata dal numero di residui basici, in particolare le lisine e arginine, della proteina in esame.

Dopo il processo di ionizzazione, il campione viene indirizzato da un gradiente di campo elettrico verso l'analizzatore di massa, il quale separa gli ioni in base al loro rapporto massa su carica. L'analizzatore a tempo di volo è costituito da un tubo di volo attraverso cui gli ioni si muovono verso il detector. Gli ioni vengono accelerati con lo stesso potenziale e si separano quindi unicamente per il loro rapporto massa su carica: gli ioni più leggeri si muovono più velocemente rispetto a quelli con un peso molecolare maggiore. Il detector rileva la quantità di particelle separandole in base al tempo di volo, ovvero il tempo impiegato per percorrere il tubo analizzatore, e da esso si ricava il rapporto m/z .

I campioni per la massa sono stati preparati con i puntali per micropipette Zip Tip da 10 μ l funzionalizzati con una fase fissa composta da resina C_{18} . Quest'ultima è ideale per oligonucleotidi e proteine con massa molecolare inferiore a 50 kDa in soluzioni acquose. Presenta in superficie un gruppo idrocarburico a 18 atomi di carbonio che, quando il campione passa, forma interazioni idrofobiche con i residui idrofobici della proteina. In tal modo la proteina rimane legata alla fase stazionaria permettendo così la rimozione del buffer di partenza, compreso il sale disciolto. Successivamente, la proteina eluisce con una miscela di acetonitrile al 50% e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.1% in acqua.

Attraverso l'utilizzo delle Zip Tip il campione viene portato nel solvente appropriato in un'unica operazione e in modo riproducibile.

Gli spettri di massa delle proteine si distinguono per la presenza di una serie di picchi equidistanti distribuiti con andamento gaussiano. Ognuno è associato a uno

dei possibili ioni multicarica che si possono formare a partire dalla proteina di interesse e il rapporto m/z è dato da:

$$\text{Eq. 3: } \frac{m}{z} = \frac{MW+nH}{n}$$

In cui n è il numero di protoni acquisiti dallo ione.

Deconvulendo uno dei picchi protonici, si ottiene una seconda distribuzione di picchi gaussiani che differiscono uno dall'altro per una unità isotopica. Dalla sottrazione del rapporto m/z di due picchi consecutivi si ottiene il reciproco della carica dello ione, secondo la relazione:

$$\text{Eq. 4: } \frac{1}{n} = \frac{MW+nH+1}{n} - \frac{MW+nH}{n}$$

Una volta ottenuta la carica associata a uno degli ioni generati dalla proteina di interesse, si calcola la massa molecolare utilizzando l'equazione 3.

Il peso molecolare teorico delle proteine analizzate in questa tesi:

- 12042.97 Da per OSCP-NT; -
- 6832.026 Da per IF₁ 1-60.

3.5.1 Massa nativa

La spettrometria di massa nativa è una tecnica che permette la conservazione delle interazioni non covalenti e della struttura delle proteine quaternarie in fase gassosa. Rispetto alla classica spettrometria di massa, quella nativa utilizza tamponi acquosi volatili a pH quasi fisiologico, oltre che temperature e voltaggi più delicati. Queste accortezze garantiscono la conservazione delle strutture native o simil-native del complesso proteico studiato, consentendo di studiare possibili interazioni proteinaligando (Fiorentino et al., 2023)

In questa tipologia di analisi le proteine sono sospese in un buffer contenente ammonio acetato, il quale crea un ambiente “nativo” per gli analiti presi in esame, minimizzando la formazione di addotti e rimuovendo possibili sali presenti in soluzione; ottenendo così degli spettri più puliti (Tamara et al., 2022). La formazione di addotti di sali e ioni proteici provoca la distribuzione del segnale su

più specie causando una riduzione di sensibilità, aumento della complessità spettrale e difficoltà nel distinguere e identificare le possibili isoforme con piccole differenze di massa. Mediante l'utilizzo di acetato di ammonio, la conformazione proteica viene preservata durante il processo di ionizzazione, si usa generalmente una sorgente ESI, e durante la separazione degli ioni all'interno dell'analizzatore di massa. L'uso di questa tipologia di solvente è richiesto in quando l'ammonio acetato presenta un pH neutro (6,5-7). Durante il processo di ionizzazione il buffer viene rimosso mediante evaporazione in modo tale da evitare la possibile formazione di addotti (Van Schaick et al., 2022).

3.6 Risonanza magnetica nucleare, NMR

3.6.1 Principi base di un esperimento NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare o NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*, si basa sulle proprietà magnetiche di alcuni nuclei quando posti in un campo magnetico. È una tecnica che fornisce informazioni di tipo strutturale sia qualitative che quantitative e permette di studiare interazioni tra proteine.

In meccanica quantistica, ogni particella possiede un proprio momento angolare intrinseco chiamato spin, il cui valore dipende dal tipo di particella. Un nucleo con spin diverso da zero possiede un momento angolare \mathbf{J} e un momento di dipolo magnetico $\bar{\mu}$ legati dalle relazioni:

$$\text{Eq. 5: } |\mathbf{J}| = \hbar\sqrt{I(I+1)} \quad J_z = \hbar m$$

$$\text{Eq. 6: } \mu = \gamma J \quad \mu_z = \gamma \hbar m$$

I è il numero quantico di spin, caratteristico di ciascun tipo di nucleo, γ corrisponde al rapporto giromagnetico che assume un valore unico per ogni nucleo; $\hbar = h/2\pi$ dove h è la costante di Planck e m è il numero quantico magnetico, il quale può assumere i seguenti valori : $-I \leq m \leq +I$.

In presenza di un campo magnetico \mathbf{B}_0 , per convenzione viene considerato allineato all'asse z di un sistema d'assi cartesiani, il momento magnetico precessa attorno al campo con frequenza di rotazione che prende il nome di frequenza di Larmor ω_0 , caratteristica del nucleo a cui è associata e dipendente dal campo magnetico:

$$\text{Eq. 7 } \omega_0 = \gamma B_0$$

L'equazione che determina l'energia dell'interazione tra dipolo magnetico e campo magnetico è la seguente:

$$\text{Eq. 8: } E = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar m B_0 = -\hbar m \omega_0$$

A seconda del valore assunto dallo spin, viene rimossa la degenerazione energetica dei livelli energetici di spin nucleare, i quali in presenza di campo magnetico si separano in $2m+1$ livelli.

L'energia di ogni livello è proporzionale a $\hbar\omega_0$, ovvero la frequenza di Larmor, ed è espressa dall'equazione 8.

Nel caso del protone, il valore associato a I è $1/2$ quindi la degenerazione viene rimossa con la separazione in due livelli energetici:

- stato α a minore energia, e maggiormente popolato, associato a $m=+1/2$;
- stato β a energia maggiore associato a $m=-1/2$.

Quando la componente magnetica, indicata con B_1 , di una radiazione elettromagnetica interagisce con il sistema descritto, può causare una variazione della magnetizzazione all'equilibrio, ovvero la somma vettoriale dei momenti di dipolo associati a ogni spin del campione in presenza di un campo magnetico statico. In particolare, può essere assorbita dal campione e promuovere transizioni tra i due stati sopra descritti, se la frequenza della radiazione ν corrisponde alla frequenza di Larmor.

Per comprendere meglio un esperimento NMR si considera un modello vettoriale in cui osservare cosa accade al vettore magnetizzazione \vec{M} che rappresenta la somma vettoriale dei singoli momenti di spin (figura 18). All'equilibrio, ovvero in presenza del solo campo magnetico statico B_0 , il vettore \vec{M} è allineato alla direzione del campo, le componenti x e y sono quindi nulle, mentre la componente z , direzione verso cui è allineato il campo, è non nulla.

Applicando un impulso attraverso una radiofrequenza per un tempo appropriato t_p , in condizioni di risonanza, si ottiene lo spostamento della magnetizzazione dall'asse z di un angolo β . L'angolo di rotazione, per convenienza destrorsa, dipende dalla frequenza angolare del campo B_1 e dalla durata dell'impulso secondo la relazione $\beta = \omega_1 t_p$. Un impulso di durata adeguata può causare la rotazione del vettore \vec{M} di 90° e portarlo sul piano xy .

In tali condizioni il vettore \vec{M} inizia a precessare attorno al campo statico e a tornare all'equilibrio attraverso il processo di rilassamento. Il rilassamento è duplice:

- rilassamento trasversale o spin spin, caratterizzato dal tempo T_2 che comporta la perdita di coerenza sul piano trasversale delle singole componenti di spin che costituiscono la magnetizzazione;
- rilassamento longitudinale o spin-reticolo, caratterizzato dal tempo T_1 , che ripristina le popolazioni iniziali e quindi la magnetizzazione sull'asse z , dissipando l'energia assorbita.

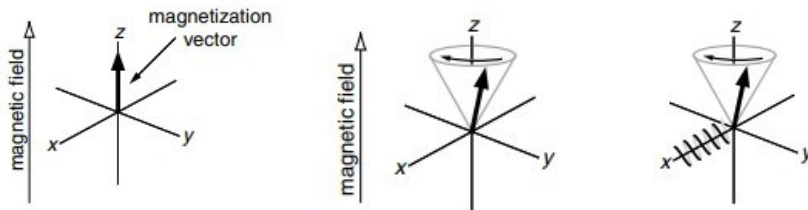


Figura 18: le tre fasi di un esperimento NMR secondo il modello vettoriale: all'equilibrio la magnetizzazione è allineata al campo magnetico esterno e quindi all'asse z (a sinistra), in seguito ad uno o più impulsi viene ruotato di un certo angolo e inizia a precessare attorno all'asse z (al centro), successivamente torna allo stato di equilibrio e l'evoluzione temporale della magnetizzazione lungo x viene rilevata come corrente oscillante ai capi di una bobina (a destra) (Keeler, 2010).

In un campione non tutti i protoni o i nuclei osservati hanno la stessa frequenza di Larmor, in quanto l'intorno chimico di ognuno induce un campo magnetico locale diversa da quello statico esterno. Per tale motivo gli esperimenti più utilizzati sono ad impulsi di radiofrequenza attraverso l'NMR in trasformata di Fourier: anziché eseguire una scansione a radiofrequenze, si invia un unico impulso ad elevato contenuto in frequenze (contenuto spettrale) in grado di eccitare contemporaneamente tutti i nuclei del campione.

Durante un esperimento NMR monodimensionale si rivela l'evoluzione temporale delle componenti x o y della magnetizzazione netta, dopo che è stata perturbata dalle sue condizioni di equilibrio, attraverso una bobina che genera un campo oscillante B_1 perpendicolare al B_0 poste sul piano. A causa della precessione, il segnale che si ottiene è sinusoidale e per via del rilassamento, decade esponenzialmente nel tempo.

Il segnale ottenuto da un esperimento FT-NMR, è il FID (*Free Induction Decay*), il quale non decade secondo una sola frequenza ma è dato dall'interferenza dell'evoluzione di ogni nucleo nel suo intorno chimico. Grazie alla trasformata di Fourier si può ottenere lo spettro NMR convenzionale che riporta una serie di picchi in funzione della frequenza di risonanza dei diversi nuclei (figura 19). In ascissa vengono riportati i valori di *chemical shift* δ in ppm, proporzionali alla frequenza di risonanza ν_0 attraverso la relazione:

$$\text{Eq. 9: } \delta = \left(\frac{\nu_0 - \nu_{\text{rif}}}{\nu_{\text{rif}}} \right) 10^6$$

In cui ν_{rif} è la frequenza di un composto di riferimento, generalmente tetrametilsilano (TMS) nelle soluzioni organiche e 2,2-Dimetil-s-silapentan-5solfonato (DSS) in quelle acquose.

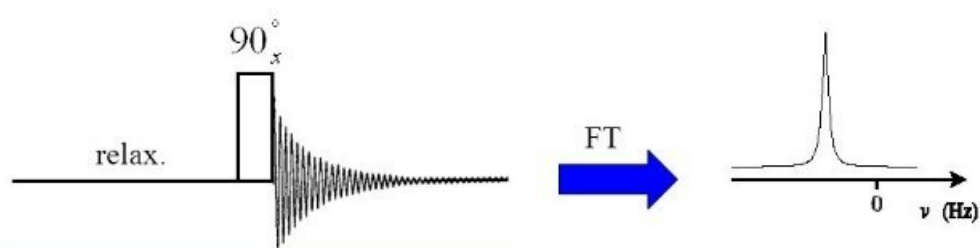


Figura 19: esempio di esperimento monodimensionale: l'impulso causa una variazione della magnetizzazione dallo stato di equilibrio, magnetizzazione la cui evoluzione della componente x o y nel tempo costituisce il FID. Dalla trasformata di Fourier (FT) del FID si ottiene lo spettro in funzione delle frequenze.

Per migliorare il rapporto segnale/rumore, vengono eseguite più scansioni, ovvero la sequenza viene ripetuta più volte; bisogna attendere che la magnetizzazione ritorni completamente all'equilibrio tra una e l'altra. Questa procedura aumenta la durata degli esperimenti, soprattutto quelli bi e tridimensionali.

Gli spin presenti nel campione interagiscono reciprocamente in due modi: attraverso lo spazio con interazioni dipolari e attraverso i legami covalenti che separano i due spin con interazioni scalari. L'interazione dipolare è anisotropa, ovvero dipende dalla mutua orientazione tra i nuclei interagenti; perciò, a causa del moto rotazionale delle molecole in soluzione, non è osservabile durante gli esperimenti più comuni.

L'interazione scalare è l'influenza di un nucleo su un altro separato da non più di tre legami covalenti, si propaga attraverso gli elettroni e decade velocemente all'aumentare del numero di legami. È un'interazione indipendente dall'entità del campo statico ed è caratterizzata dalla costante di accoppiamento scalare nJ , con n numero di legami che separano i due nuclei. L'accoppiamento scalare rimuove la degenerazione tra transizioni energetiche e si manifesta nello spettro attraverso lo *splitting* del picco di un nucleo. Un nucleo vicino ad un altro genera un doppietto di segnali centrati alla frequenza di risonanza di quel nucleo e separati dal valore J in frequenza. In generale, quando un nucleo è accoppiato scalarmente con n nuclei chimicamente equivalenti, il segnale viene diviso in $2nI+1$ righe.

3.6.2 Esperimenti NMR bidimensionali

Da uno spettro monodimensionale si possono ottenere informazioni strutturali dai *chemical shift* e dalla forma dei multipletti, ma nel caso di molecole di medie o grandi dimensioni come le proteine, i segnali si sovrappongono eccessivamente. Risultata impossibile assegnare lo spettro monodimensionale di una proteina, ovvero andare ad attribuire ogni segnale dello spettro ad un nucleo specifico.

Per tale motivo si effettuano esperimenti bidimensionali, in cui le risonanze vengono disperse su un piano anziché su una linea e vengono ridotte le sovrapposizioni. Gli spettri monodimensionali riportano le frequenze in ascissa e l'intensità relativa a ogni segnale in ordinata (a.u.); invece, negli spettri bidimensionali entrambi gli assi sono in frequenza. L'intensità del segnale viene rappresentato in due dimensioni attraverso curve di livello e ogni picco è caratterizzato da due valori di frequenza, F_1 e F_2 .

Come indicato in figura 20, un esperimento bidimensionale è composto da quattro periodi distinti:

1. la preparazione (*preparation*), durante la quale la magnetizzazione raggiunge lo stato di equilibrio e successivamente viene perturbata da uno o più impulsi;
2. l'evoluzione (t_1 , *evolution*), in cui la magnetizzazione evolve;
3. il periodo di mescolamento (*mixing time*), che serve a trasferire la magnetizzazione ad un altro nucleo;

4. registrazione del segnale durante il t_2 (*detection*).

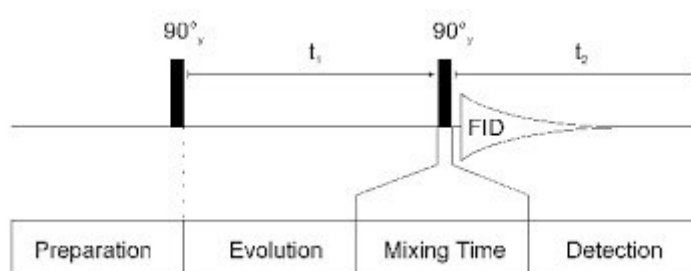


Figura 20: schema generale dei periodi che compongono un esperimento bidimensionale: preparazione (*preparation*), evoluzione della magnetizzazione (*evolution*), mescolamento con trasferimento della magnetizzazione (*mixing*) e raccolta del segnale (*detection*).

La sequenza di trasferimento di magnetizzazione caratterizza i diversi esperimenti bidimensionali; il trasferimento può avvenire attraverso accoppiamento scalare o dipolare e tra nuclei dello stesso tipo, negli esperimenti omonucleari, o nuclei diversi, negli esperimenti eteronucleari, che coinvolgono di solito nuclei di ^{13}C e ^{15}N .

Un esperimento bidimensionale viene acquisito ripetendo una sequenza per un elevato numero di volte incrementando sistematicamente il tempo t_1 . Come riportato in figura 21, dopo una prima trasformata di Fourier, si ottiene una serie di spettri con una variazione sinusoidale dell'intensità dei segnali che decadono come il FID ma in funzione di t_1 invece di t_2 . Lo spettro bidimensionale si ottiene facendo una prima trasformata di Fourier sul FID ottenuto in funzione di t_2 che fornirà il dominio delle frequenze F_2 e, successivamente, sulla variazione del segnale in funzione dell'incremento di t_1 che fornirà il secondo dominio F_1 .

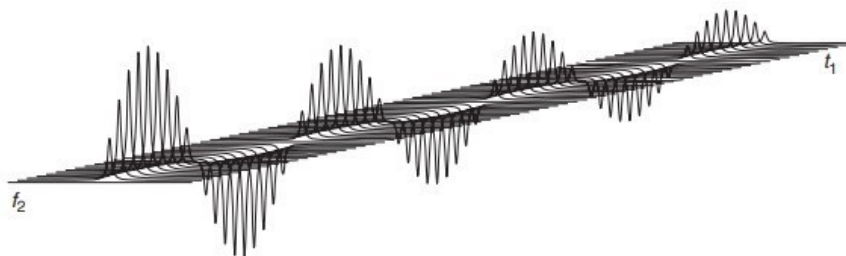


Figura 21: andamento dell'intensità di un segnale in funzione dell'aumento del tempo di evoluzione t_1 . A valori di t_1 crescenti, l'intensità del segnale diminuisce a causa del rilassamento (Claridge, 2016).

^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC

La tecnica di NMR bidimensionale utilizzata in questo lavoro di tesi è la ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC (*band-Selective Optimized-Flip-Angle Short-Transient Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) per caratterizzare la proteina OSCP-NT e per studiare la possibile interazione con IF₁ 1-60 attraverso le variazioni di *chemical shift*.

L'esperimento è eteronucleare in quanto rivela i segnali dei protoni in una dimensione e quelli dei nuclei di azoto nella seconda dimensione: i segnali sono relativi alle coppie ^1H - ^{15}N accoppiati scalarmente per mezzo di $^1J_{\text{N-H}}$. Questa tipologia di esperimento permette di rimuovere molte delle sovrapposizioni presenti negli spettri delle macromolecole in quanto la dimensione dei ^{15}N ammidici è più ampia, 30 ppm, rispetto a quella protonica, 10 ppm. Inoltre, la sequenza prevede il disaccoppiamento tra i due nuclei e quindi il collasso di eventuali multipletti che affollerebbero lo spettro in un singoletto. Il disaccoppiamento è possibile, perché dato che le frequenze di risonanza dei due eteronuclei sono diverse, si possono applicare impulsi selettivi per uno solo dei due nuclei.

Per condurre esperimenti che coinvolgono eteronuclei bisogna esprimere le proteine marcandola isotopicamente con ^{15}N (effettuato in questo lavoro di tesi) o ^{13}C per aumentare l'abbondanza, in quanto in natura è scarsa, degli isotopi coinvolti nella sequenza.

La sequenza di un esperimento HMQC, riportato in figura 22, prevede la perturbazione della magnetizzazione protonica dall'equilibrio con un primo impulso di 90° e il successivo trasferimento di magnetizzazione ai nuclei di ^{15}N con il secondo impulso di 90° sull'eteronucleo. Dopo il periodo di evoluzione t_1 , durante il quale viene rimosso l'accoppiamento scalare con il protone, la magnetizzazione viene nuovamente trasferita al protone per la raccolta del segnale. Attraverso il doppio trasferimento della magnetizzazione si ha un aumento della sensibilità, la

quale dipende dai rapporti giromagnetici dei nuclei eccitato e acquisito, e quello protonico è maggiore di quello dell'azoto. Quando in un esperimento di eterocorrelazione viene acquisito il protone e non l'eteronucleo si parla di acquisizione inversa.

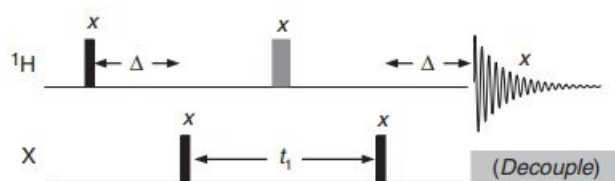


Figura 22: sequenza di impulsi di un esperimento HMQC (Claridge, 2016).

L'esperimento ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC rappresenta una variante dell'HMQC sviluppata per consentire la riduzione della durata totale dell'esperimento grazie alla riduzione del tempo di attesa tra due scansioni. Il rilassamento della magnetizzazione dei protoni è reso più veloce dall'impiego di impulsi selettivi che eccitano i soli protoni ammidici. In tal modo, i protoni non eccitati contribuiscono, attraverso accoppiamenti dipolari, al rilassamento della magnetizzazione dei protoni ammidici. Inoltre, l'impulso che perturba inizialmente la magnetizzazione protonica non è di 90° ma di 120° : la magnetizzazione non è così completamente sul piano xy e il tempo di rilassamento trasversale risulta quindi minore (Schanda et al., 2005).

Gli spettri di eterocorrelazione ^1H - ^{15}N di proteine costituiscono una sorta di impronta digitale e sono generalmente la prima tipologia di spettro acquisita. Ogni segnale rappresenta un residuo amminoacidico. Le uniche eccezioni sono costituite dalle proline, che non avendo protoni ammidici non daranno segnali, e dai residui di asparagine, glutammina e triptofano per i quali saranno visibili anche i segnali relative alle catene laterali.

Esperimenti di questo tipo permettono di ottimizzare le condizioni prima di effettuare esperimenti a tripla risonanza con proteine doppiamente marcate e quindi molto costose. Consentono inoltre di studiare l'eventuale variazione di *chemical shift* dovuta alla presenza di interazione con una molecola o un'altra proteina. Un evento di interazione causa variazioni strutturali della frazione legata di proteina recettore, le quali si ripercuotono in una variazione dell'intorno chimico dei nuclei

responsabili del segnale NMR. di conseguenza, alcuni segnali di una miscela di due partner di interazione avranno diversi valori di *chemical shift* rispetto a quelli del campione contenente solo il recettore.

L'effetto dell'interazione sullo spettro sarà diverso a seconda del valore della costante di dissociazione e quindi dell'affinità di interazione. In condizioni di legame forte (k_D nell'ordine di nM) e quindi scambio lento, con l'aumentare della concentrazione di legante si assiste alla progressiva scomparsa dei segnali relativi al solo recettore (P) e alla comparsa dei segnali relativi alla proteina legata (PL). In condizioni di legame debole (k_D nell'ordine di mM- μ M) e quindi scambio veloce, con l'aumentare della concentrazione di legante si assiste allo spostamento dei segnali relativi al solo recettore (P) verso i *chemical shift* che caratterizzano i segnali della proteina legata (PL). Il segnale NMR in questo caso è singolo e la posizione dei picchi è riconducibile alla media ponderata sulle popolazioni P e PL. Infine, in regioni di scambio intermedio si assiste alla coalescenza dei segnali relativi al recettore libero e a quello legato, con l'esito di un unico segnale allargato di bassa intensità.

Un fattore necessario per la buona riuscita di spettri per lo studio della variazione di *chemical shift* è il controllo del pH: valori diversi tra i due campioni comporterebbero variazioni dei segnali complicando il confronto.

4. Risultati sperimentali e discussione

4.1 Espressione e purificazione di OSCP-N

Per studiare il dominio N-terminale della subunità OSCP (OSCP-NT) è stato utilizzato un costrutto costituito dalla sequenza R6-R114 del gene umano codificante tale porzione (figura 23). Il costrutto contiene solo la sequenza del dominio N-terminale di OSCP, senza la sequenza MTS e il dominio Cterminale. Tale proteina presenta un punto isoelettrico (pI) teorico di 10, un coefficiente di estinzione molare (ϵ) di $5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e un peso molecolare (PM) di 12042.97 Da.

MAAPAVSGLSRQVRCFSTSVVRPFAKLVRPPVQVYGIEGRYATALYS
AASKQNKLEQVEKELLRVAQILKEPKVAASVLNPYVKRSIKVKSLNDI
TAKERFSPLTTNLLINLLAENGRLSNTQGVVSAFSTMMSVHRGVEVPCTV
TSASPLEEATLSELKTVLKSFLSQGVVKLEAKTDPSILGGMIVRIGEK
YVDMSVKTKIQKLGRAMREIV

Figura 23: sequenza amminoacidica di OSCP. La proteina matura non presenta la sequenza MTS (rosso). La sequenza del dominio N-terminale di OSCP è la porzione in verde; il costrutto è composto a partire dal residuo R6 e termina con il residuo R114 (evidenziati in azzurro). La sequenza in blu corrisponde a quella del dominio C-terminale.

Espressione per via ricombinante

L'espressione per via ricombinante del dominio OSCP-N incomincia con una prima fase di "risveglio" dei batteri trasformati, ovvero un preinoculo, dato che sono conservati in *stock* di glicerolati a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Tale preinoculo viene svolto in una beuta da 500 mL, contenente:

- 100 mL di terreno di coltura LB;
- 100 μL di Kanamicina ad una concentrazione di 50 mg/mL, utilizzata come marker di selezione, in quanto il plasmide contiene il gene per la resistenza a tale antibiotico;
- Puntale sporco di batteri.

Il preinoculo viene posto a crescere *overnight* (O/N), a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e sotto agitazione. Per la crescita dei batteri è necessario un determinato rapporto tra volume occupato dal

terreno di coltura e volume occupato dall'aria, in modo tale da consentire la corretta ossigenazione dei batteri, e quindi la loro crescita. In questo lavoro di tesi il rapporto ottimale è pari a 1/5.

Il giorno seguente si procede ad un cambio scala 1:200 in terreno M9 o LB, a seconda che sia necessario produrre la proteina marcata o meno rispettivamente. Nella crescita in M9 si aggiunge la soluzione di additivi contenente l'isotopo 15 dell'azoto, ^{15}N . Tale soluzione contiene tutti i composti necessari alla crescita della coltura, tra cui: Glucosio, Vitamine, Soluzione Q metalli pesanti, MgSO_4 e $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Per quanto riguarda la crescita della proteina non marcata tale soluzione non è richiesta in quanto il terreno LB contiene tutti i componenti essenziali per la crescita batterica.

In questo lavoro di tesi la crescita batterica viene svolta in 1.5 L di terreno, utilizzando beute da 2.5 L, in cui viene aggiunto un volume massimo di 0.5 L. Ciascuna beuta conterrà oltre al terreno di crescita, anche 0.5 mL di Kanamicina 50 mg/mL, e 2.5 mL di preinoculo. Successivamente le colture batteriche vengono poste a crescere a 37 °C, sotto agitazione.

La crescita viene monitorata attraverso la misura dell' OD_{600} , in modo tale da andare a indurre quando le colture batteriche presentano un valore compreso tra 0.8 e 0.9. Una volta raggiunto tale range di OD_{600} , vengono aggiunti 250 μL di IPTG 1 M, l'induttore, a ciascuna beuta contenente 500 mL di coltura.

Prima della fase di induzione è necessario porre le beute a 20 °C, per condizionare il terreno prima della espressione, in quanto è stato riscontrato che la resa proteica risulta maggiore. Successivamente la crescita procede per 22 ore, a 20 °C e sotto agitazione.

Appena terminato questo arco di tempo l'espressione si può ritenere conclusa e si passa alla fase di purificazione. Si procede separando i batteri dal terreno di coltura, ovvero il pellet dal surnatante. Per farlo si pone la coltura batterica a centrifugare (Beckman Coulter) a 5500 RCF, 20 minuti a 4°C. Una volta separato il pellet si può congelare a -80°C, o si può procedere con le fasi successive, ovvero la lisi cellulare e la purificazione.

Curva di crescita batterica

Per individuare l'OD ottimale per effettuare l'induzione con IPTG, la coltura batterica è stata monitorata durante tutto il processo di crescita, sia per la coltura in terreno LB che in M9. Indurre all'OD ottimale è cruciale per avere una resa proteica migliore. Infatti, l'aggiunta di IPTG dovrebbe avvenire tra la fase esponenziale e quella stazionaria affinché la crescita sia massima e non sia iniziata la fase di declino o morte cellulare.

La curva di crescita di crescita batterica sia per un terreno LB che per M9 di OSCPN è riportata in figura 24. Costruendo un grafico in funzione logaritmica dei valori di OD ottenuti in funzione del tempo, si riesce a stabilire quando avviene la fine della fase esponenziale e l'inizio di una fase stazionaria. Il passaggio non avviene in maniera repentina in questo caso, ma attraversa una fase di crescita più lenta che inizia al valore di OD₆₀₀ di circa 0.6. L'intervallo ottimale per avere rese proteiche elevate è tra 0.8 e 0.9.

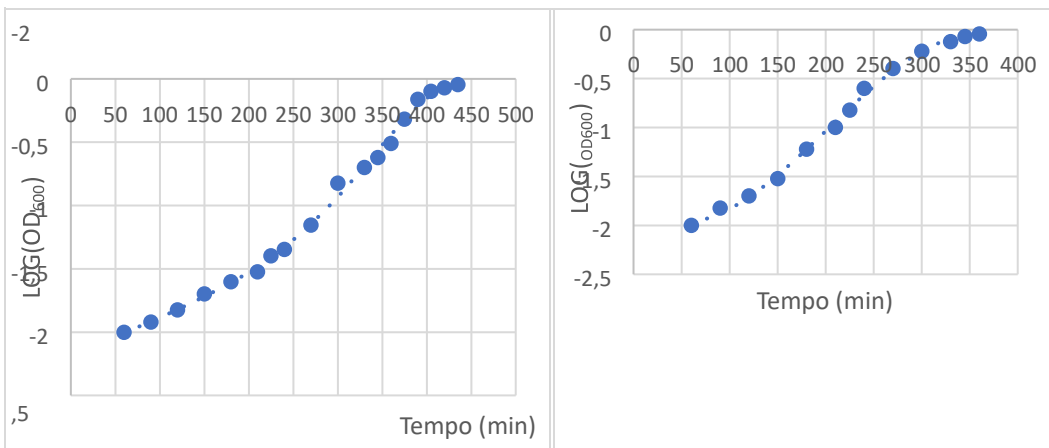


Figura 24: curve di crescita dei batteri trasformati per esprimere le proteine di interesse monitorando l'OD per circa 7 ore, espressa come logaritmo dell'OD₆₀₀ in funzione del tempo (espresso in minuti). A sinistra vi è la crescita in terreno M9 per produrre la proteina marcata con ¹⁵N, mentre a destra vi è la crescita in terreno LB per produrla non marcata. Come si può notare il tempo per arrivare al valore di OD ottimale nella crescita in terreno M9 è maggiore di 1-2 ore rispetto a quella in LB.

Protocollo di purificazione

La purificazione rappresenta una delle fasi cruciali per la riuscita del progetto, in quanto consente di ottenere solamente la proteina OSCP-N in soluzione. Per tale motivo la scelta dei buffer e la loro composizione deve essere ottimale.

In questo lavoro di tesi per purificare OSCP-N sono stati utilizzati i buffer riportati nella tabella 1 seguente:

Buffer	
Lisi	Buffer A IMAC, 2% Buffer B IMAC, 1 pastiglia inibitore di proteasi, DNasi, MgCl ₂
IMAC A	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, pH 7.8
IMAC B	Buffer A IMAC, 500 mM Imidazolo
<i>Desalting</i>	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, pH 7.8
Scambio cationico A	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7
Scambio cationico B	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 M NaCl, pH 7
SEC	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, pH 7.8

Tabella 1: composizione dei buffer utilizzati per purificare OSCP-N.

La fase seguente alla separazione del pellet (dove è presente la proteina di interesse) dal surnatante è la purificazione. Essa inizia sospendendo i batteri in 15 mL di buffer di lisi, composto dal buffer A della cromatografia di affinità IMAC, in modo tale che il campione sia già pronto per la prima fase di purificazione. Tale buffer, come riportato nella tabella sovrastante, contiene inoltre: inibitore di proteasi, in modo tale che le possibili proteasi prodotte da *E. coli* non degradino la proteina; DNasi e MgCl₂, l'enzima va a degradare il DNA e per la sua attività catalitica ha bisogno di ioni Mg²⁺.

La sospensione dei batteri viene svolta in ghiaccio e rappresenta una prima lisi fisica. Successivamente i batteri vengono lisati per pressione con due cicli di *French Press*, a 1000 atm.

Il campione viene in seguito sottoposto a uno step di centrifugazione a 10000 RCF, 40 minuti a 4 °C, in modo tale da ottenere il surnatante in cui è sospesa OSCP-N e il pellet, costituito da proteine e altri residui delle pareti cellulari di *E. coli*. Prima

di caricare il campione in colonna è necessario filtrare il surnatante ottenuto per eliminare possibili residui batterici sospesi nella soluzione. Per farlo sono stati utilizzati filtri per siringhe in PES da 0.45 e 0.2 μm (Filtropur S, Sarstedt).

La purificazione della proteina OSCP-N dal lisato batterico avviene mediante diverse tecniche cromatografiche FPLC (ÄKTA™ purifier). La prima di questa è una cromatografia di affinità, IMAC, mediante una colonna HisTrapl® HP, 1 mLGE). Questa purificazione sfrutta gli ioni Ni^{2+} della fase stazionaria per legarsi all'His-Tag della proteina di interesse. Il flusso impostato è di 1 mL/min, la pressione massima è di 0.30 MPa. Inizialmente si applica un gradiente il 2% di buffer B per evitare il legame di eventuali aspecifici e una volta che la conducibilità si è stabilizzata a circa 35 mS/cm, si carica il campione in un *SUPER-Loop* da 50 mL.

Come si nota dalla figura 25, una volta iniettato il campione il segnale UV aumenta esponenzialmente dovuto dalla elevata concentrazione di biomolecole prodotte da *E. coli*. Appena l'assorbanza torna stabile, così come la conducibilità, viene effettuato un gradiente lineare fino al 50% di buffer B in 2 minuti, in modo tale che la concentrazione maggiore di Imidazolo possa staccare l'His-tag (quindi la proteina) dalla fase stazionaria. Successivamente la percentuale di buffer B viene portata al 100% per rimuovere eventuali proteine ancora legata alla colonna.

Chromatogram

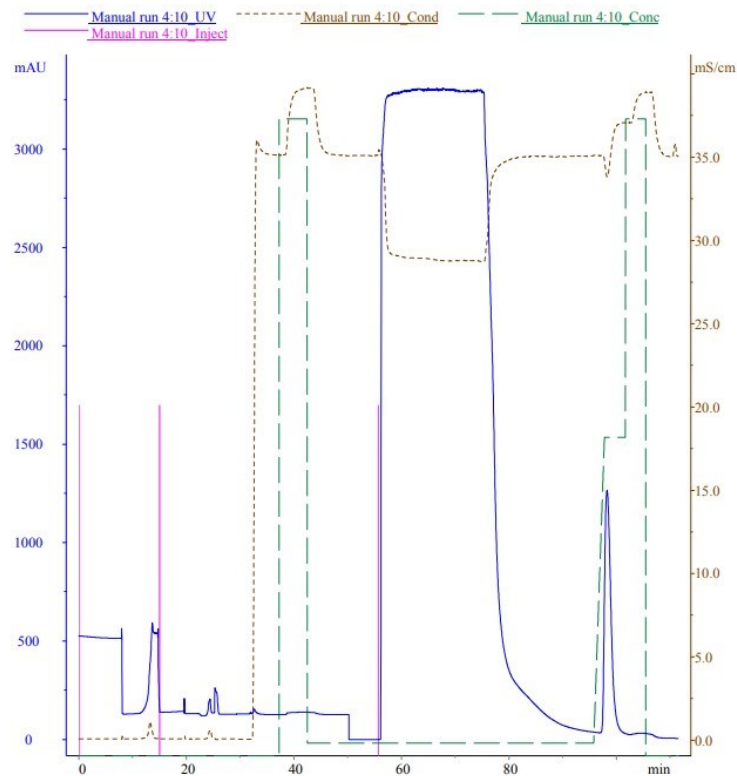


Figura 25: cromatogramma purificazione OSCP-N con cromatografia IMAC. In blu è riportato il valore di assorbanza a 280 nm, in verde il gradiente utilizzato mentre in marrone la conducibilità.

La purificazione seguente è una SEC-Desalting (colonna Hi-Prep®-GE). Tale purificazione ha lo scopo di eliminare l'imidazolo presente in soluzione, il quale inibisce la SUMO proteasi. La proteina viene caricata in un *Loop* da 5 mL, quando la conducibilità ha un valore pari a 35 mS/cm. Il flusso è pari a 3 mL/min e la pressione massima della colonna è di 0.15 MPa. La proteina esce immediatamente dalla colonna, dopo circa 8 mL, dato che non viene trattenuta. l'imidazolo invece presenta un tempo di ritenzione maggiore ed esce dopo un volume colonna (cromatogramma in figura 26).

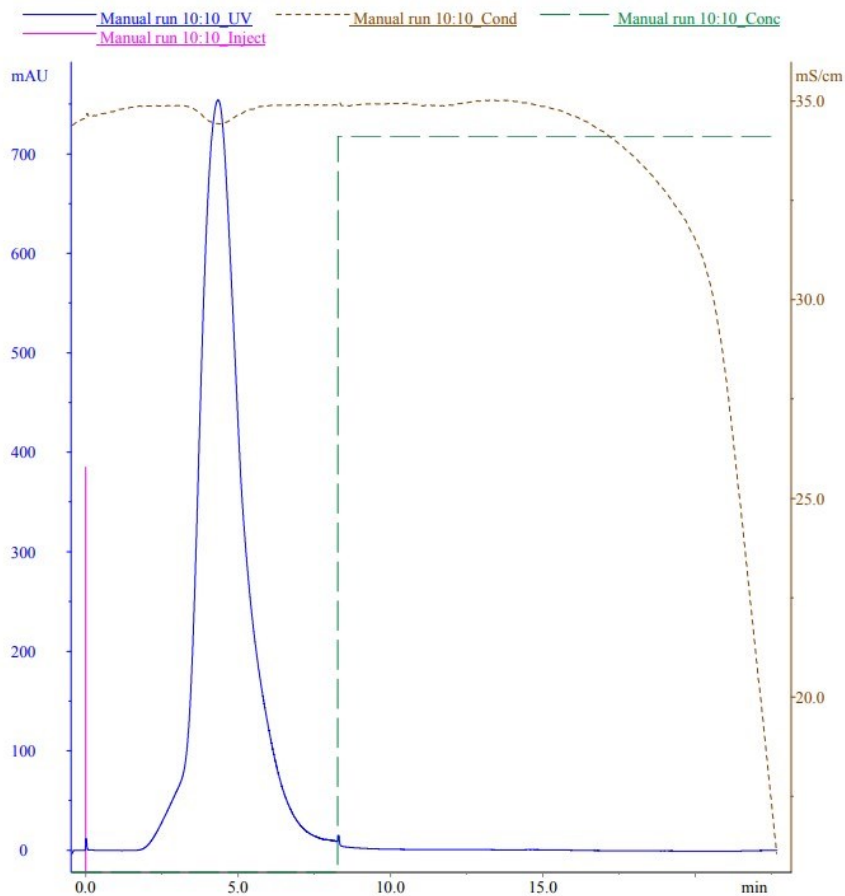


Figura 26: cromatogramma Desalting OSCP-N, dove in blu è riportato il valore di assorbanza, in verde il gradiente e in marrone la conducibilità.

La proteina OSCP-N viene posta a tagliare con Ulp1, la SUMO-Proteasi, a 15°C *overnight*, per separarla dalla proteina SUMO e dall'His-Tag. Dopo il taglio si purifica la proteina di interesse mediante scambio cationico (colonna HiTrap™ SP HP 1 mL).

La soluzione prima di essere caricata nel *Loop* da 5 mL, viene diluita con un buffer contenente 20 mM Na₂HPO₄, per abbassare la forza ionica. Successivamente viene caricata in colonna con un flusso di 1 mL/min, a una conducibilità di 20 mS/cm, pressione massima 0.30 MPa. Come si nota nel cromatogramma in figura 27, solo OSCP-N si lega alla colonna, la quale viene successivamente eluita con un gradiente lineare fino al 50% di B in 2 minuti. La colonna viene successivamente lavata con 100% di buffer B e si effettua il secondo caricamento.

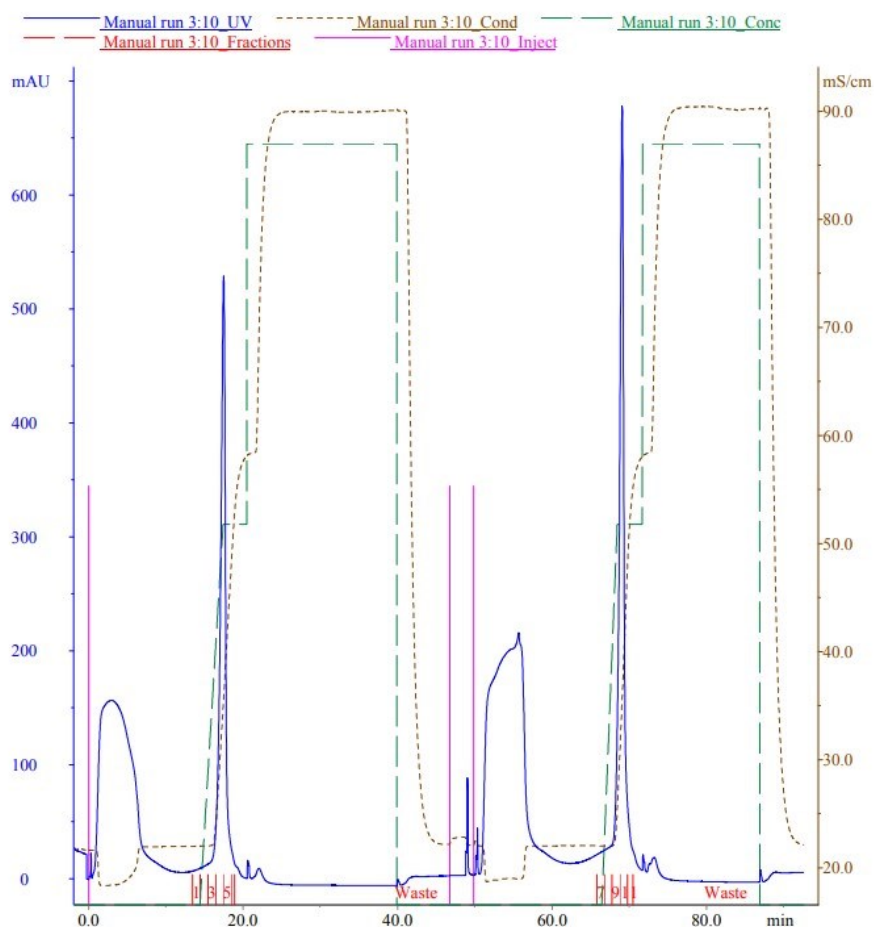


Figura 27: cromatogramma scambio cationico OSCP-N. Sono riportati i due caricamenti effettuati. In blu è riportato il valore di assorbanza, in verde il gradiente utilizzato (come si nota al 50% di buffer B OSCP-N si stacca), mentre in marrone la conducibilità. Il primo picco che si nota rappresenta la proteina SUMO, la quale non si lega alla colonna e dunque esce con il fronte.

La purificazione di OSCP-N termina con una cromatografia SEC analitica (colonna SuperdexTM 75 10/300 GL) per ottenere la proteina con un elevato grado di purezza e separandola da eventuali aggregati e precipitati. La proteina deve essere concentrata fino a un volume finale di 1 mL, per essere iniettata nel *Loop* da 1 mL. Il caricamento in colonna avviene con un flusso di 0.5 mL/min, a una pressione massima di 1.5 MPa e a una conducibilità di 35 mS/cm. OSCP-N viene raccolta frazionando ed esce dopo un volume di 14 mL già nel buffer ideale per i futuri studi di NMR. Come si vede nel cromatogramma in figura 28 OSCP-N esce con un picco ben risolto e simmetrico.

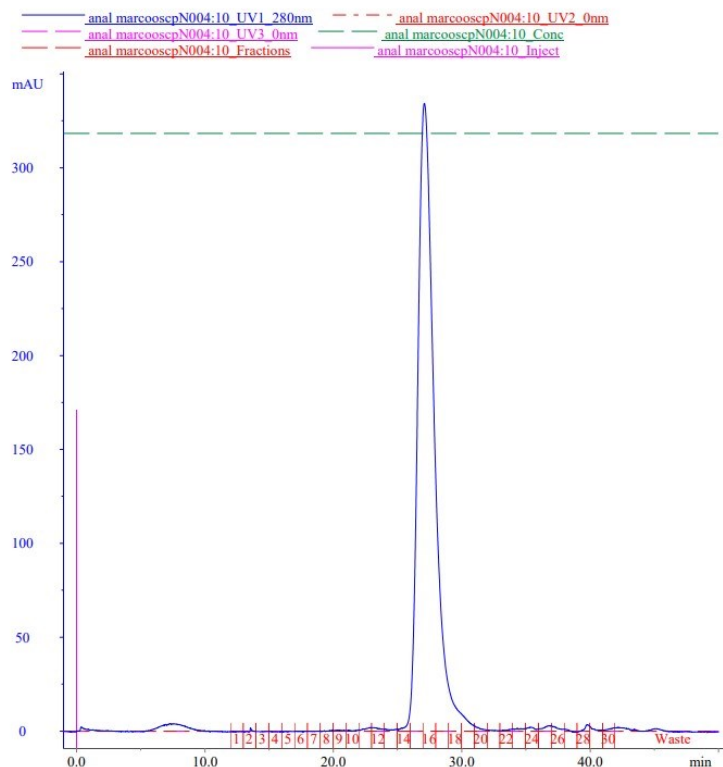


Figura 28: cromatogramma SEC analitica OSCP-N. In blu è riportato il valore di assorbanza e come si può notare non vi è la presenza di aggregati o altre biomolecole nella soluzione, dato che c'è solo un picco corrispondente ad OSCP-N.

Quantificazione mediante spettroscopia UV-Vis

Terminata la fase di purificazione si fa una misura quantitativa della proteina mediante spettroscopia UV-Vis (Shimadzu™ UV-2501PC), per ottenere la resa proteica finale e una stima della concentrazione. Con questa misura si possono rilevare la presenza di eventuali aggregati in quanto causano eventi di scattering che portano a una deviazione della baseline a lunghezza d'onda superiori a 300 nm. L'assorbanza viene misurata ponendo 100 µL di soluzione in una cuvetta.

Generalmente la resa proteica finale da una coltura di 1.5 L di LB e M9 sono rispettivamente di:

- LB: la misura di assorbanza a 280 nm è 0.067 (in 1,5 mL), che equivale a una concentrazione 11 µM.
- M9: 58 µM (2 mL).

Tali quantità non sono sufficienti per poter eseguire un esperimento di NMR. per tale motivo si devono effettuare più cicli di espressione e purificazione. Le proteine, dunque, vengono congelate con azoto liquido e conservate a -80°C .

4.2 Espressione e purificazione di IF₁ 1-60

Il costrutto utilizzato per l'espressione della proteina IF₁ comprende i residui 1-60, G1-I60, dell'estremità N-terminale della proteina matura (figura 29), senza il target mitocondriale MTS. La proteina ricombinante presenta un coefficiente di estinzione molare (ϵ) di 1490 M⁻¹ cm⁻¹, un pI di 6.08 e un peso molecolare di 6832.026 Da.

**GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHH
EEEIVHHKKEIERLQKEIERHKQKIKMLKHDD**

Figura 29: in rosso è evidenziata la sequenza amminoacidica utilizzata per il costrutto, a partire dal G1 fino al I60, evidenziati in azzurro.

Espressione per via ricombinante

L'espressione per via ricombinante della proteina IF₁ è analoga a quella di OSCP_N. Si inizia con una precoltura o preinoculo in una beuta da 500 mL, contenente 100 mL di terreno LB, 100 μ l di kanamicina 50 mg/mL e puntale sporco di batteri trasformati con il plasmide contenete la sequenza di IF₁. Il preinoculo viene fatto crescere a 37°C, *overnight* sotto agitazione.

Il giorno seguente si esegue il cambio scala 1:200 in 1.5 L di terreno (suddivisi in 3 beute da 2.5L, 500 mL di terreno a beuta) sia per la crescita della proteina non marcata, in terreno LB, sia per quella marcata, in terreno M9. In quest'ultimo viene aggiunta una soluzione di additivi, 20 mL, contenete Mg₂SO₄, Mix vitamine, Soluzione Q metalli pesanti, glucosio e l'¹⁵NH₄Cl per la marcatura delle proteine. Per ogni litro di coltura viene aggiunto 1 mL di Kanamicina 50 mg/mL come marker di selezione. Le colture successivamente vengono posto ad incubare a 37°C sotto agitazione.

La crescita della coltura batterica viene monitorata mediante misurazioni OD₆₀₀, in modo tale da scegliere il momento di crescita ottimale per l'induzione. Quest'ultima è compresa in un range tra 0.8 e 0.9, in cui vengono aggiunti 250 μ L di IPTG per beuta. Anche per IF₁ 1-60 l'induzione avviene quando le colture batteriche sono già a 20°C per ottimizzare la resa proteica, come per OSCP-N, e si lasciano crescere a questa temperatura per 20 ore, sotto agitazione. Anche in questo caso si nota una

crescita rallentata dei batteri trasformati per esprimere IF₁ 1-60 nel terreno M9 rispetto a quella in LB, di circa 1-2 ore (figura 24).

Appena le 20 ore sono passate, l'espressione viene considerata conclusa e si procede alla separazione del pellet, contenente i batteri e la proteina di interesse, dal surnatante, costituito da terreno di coltura prevalentemente. IL pellet batterico viene precipitato mediante centrifugazione a 5500 RCF, 20 minuti, 4°C, per poi essere conservato a -80°C o purificato.

Protocollo di purificazione

Per ottenere la proteina IF₁ 1-60 con il grado di purezza richiesto, si eseguono quattro diverse cromatografie, come per OSCP-N. I buffer utilizzati sono elencati nella tabella 2 sottostante:

Buffer	
Lisi	Buffer A IMAC, 2% Buffer B IMAC, 1 pastiglia di inibitore di proteasi, DNasi, MgCl ₂
IMAC A	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, pH 7.8
IMAC B	Buffer A + 500 mM Imidazolo, pH 7.8
<i>Desalting</i>	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8
Scambio anionico A	20 mM Tris, pH 8
Scambio anionico B	20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8
SEC analitica	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 50 mM NaCl, pH 7

Tabella 2: buffer utilizzati per la purificazione di IF₁ 1-60.

Il protocollo inizia con la sospensione del pellet in 15 mL di buffer di lisi, seguita dalla lisi mediante *French Press*. Successivamente la soluzione viene posta a centrifugare a 12000 RPM, 40 minuti, 4°C. Il surnatante ottenuto contenente la proteina di interesse viene filtrato con filtri per siringa da 0.45 e 0.2 µm.

La prima cromatografia è un'IMAC, si sfrutta l'His-Tag del costrutto IF₁ 1-60 per legarsi agli ioni Ni²⁺ della fase stazionaria. Mentre tutte le altre proteine e biomolecole prodotte da *E. coli* escono con il fronte. Il lisato batterico viene caricato in un *SUPER-Loop* da 50 mL e successivamente in colonna quando la conducibilità è pari a 35 mS/cm. Si carica anche in questo caso con un 2% di buffer B per evitare

il legame di possibili aspecifici. Il flusso applicato è di 1 mL/min a una pressione massima di 0.3 MPa. L'eluizione avviene con un gradiente lineare al 50% di buffer B in 2 minuti e una volta che la proteina si stacca, sale al 100% di B per rimuovere possibili aspecifici che si sono legati alla colonna (cromatogramma figura 30).

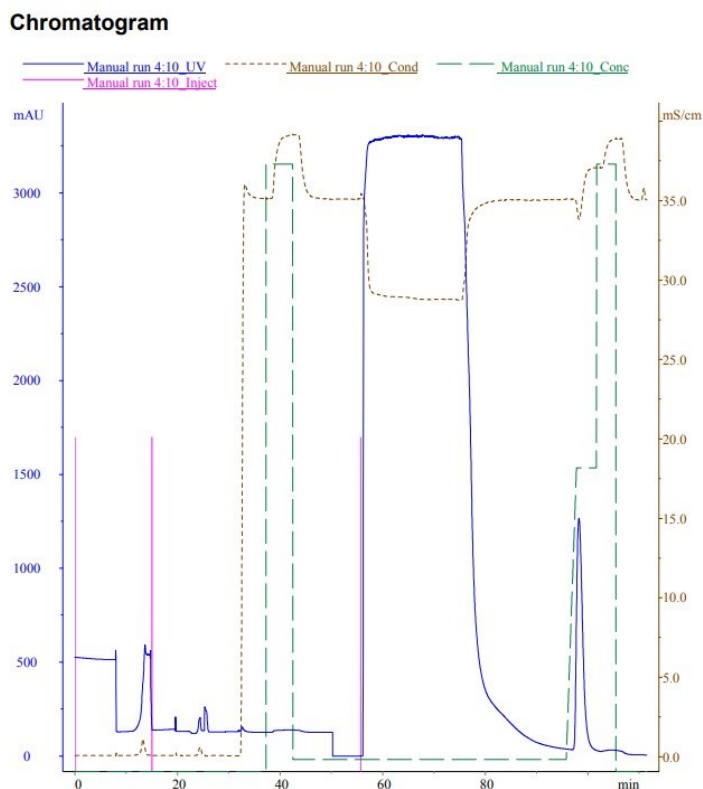


Figura 30: cromatogramma IMAC IF₁ 1-60. In blu è riportato il valore di assorbanza misurato, in verde il gradiente utilizzato, mentre in marrone la conducibilità. Come si può notare dopo l'introduzione del campione in colonna si rileva un elevato valore di assorbanza dovuto alle numerose biomolecole prodotte da *E. coli*. Successivamente quando si dà un gradiente di buffer B al 50% avviene l'eluizione di IF₁ 1-60.

La proteina di interesse con il partner di fusione viene sottoposta a una cromatografia *Desalting* (cromatogramma figura 31) per andare a rimuovere l'imidazolo presente in soluzione che inibisce la SUMO proteasi Ulp1, la quale ha il compito di separare IF₁ da SUMO e l'His-Tag. Viene caricata in un *Loop* da 5 mL e successivamente iniettata in colonna a un flusso di 3 mL/min, a una pressione massima di 0.15 MPa e quando si raggiunge un valore di conducibilità pari a 18 mS/cm.

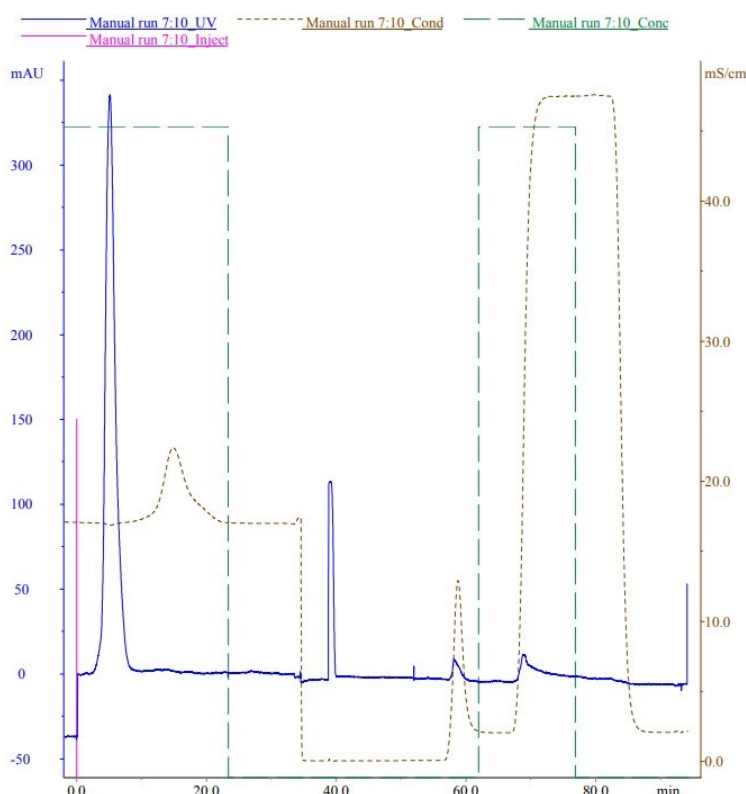


Figura 31: cromatogramma Desalting IF₁ 1-60. In blu è riportato il valore di assorbanza misurato. Il primo picco rappresenta IF₁ 1-60, mentre l'innalzamento della conducibilità (in marrone) intorno ai 18 min è dovuta all'uscita dalla colonna di Imidazolo.

Una volta ottenuto IF₁ senza Imidazolo viene aggiunta 20 µL di SUMO proteasi per separarla dal partner di fusione. Il campione si pone a tagliare a 4°C per tutta la notte.

Il giorno seguente si procede con una cromatografia a scambio ionico, ma a differenza dal protocollo di OSCP-N, per IF₁ si effettua uno scambio anionico con una colonna HiTrapTM CactoTM Q 1 mL. La proteina viene prima diluita di sette volte con il buffer A, in modo tale da abbassare la forza ionica e per consentire il legame della proteina di interesse alla fase stazionaria. Il campione viene purificato in due step diversi, iniettandolo in un *SUPER-Loop* da 50 mL, a un flusso di 1 mL/min, pressione massima di 0.30 MPa, a una conducibilità di 1 mS/cm. L'eluizione avviene con un gradino al 20% di buffer B per staccare IF₁ 1-60, mentre

SUMO si stacca a una percentuale di buffer B del 50%. Come si può notare dal grafico nella figura 32, la proteina di interesse presenta una bassa assorbanza, dovuto a un coefficiente di estinzione molare di valore basso (ϵ), $1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

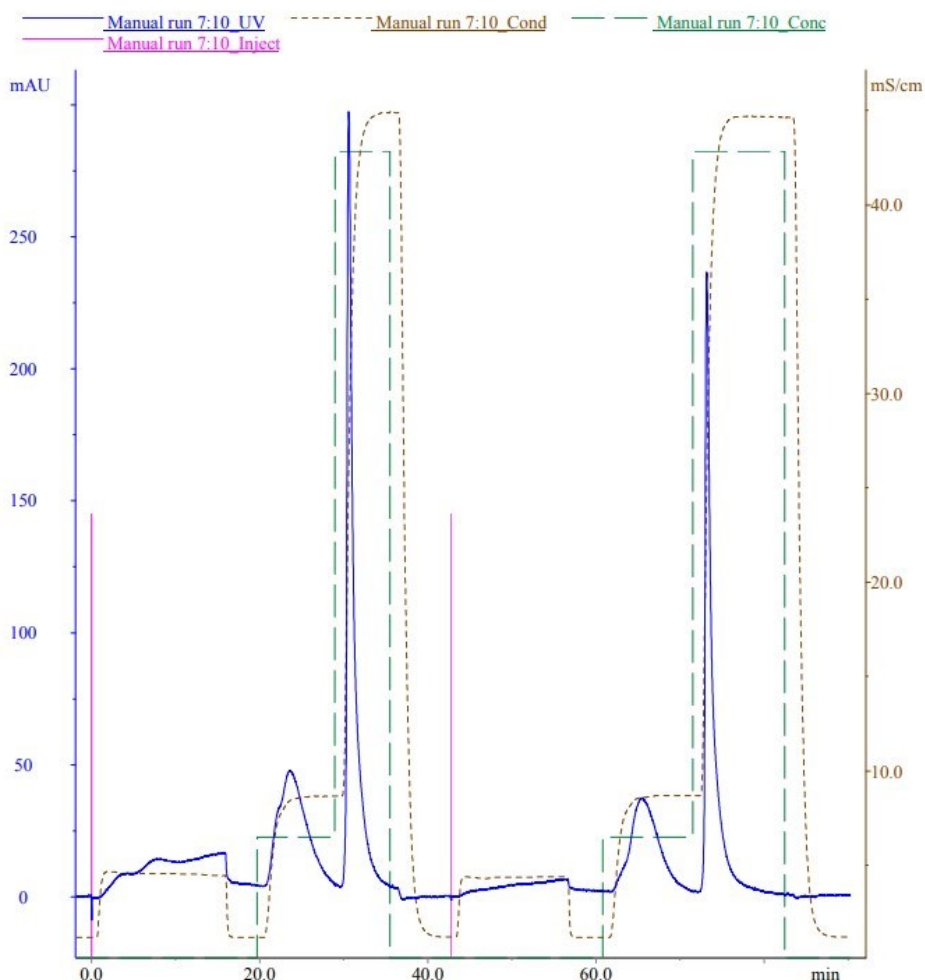


Figura 32: cromatogramma scambio anionico IF₁ 1-60. In blu è riportato il valore di assorbanza misurato, in verde il gradiente di buffer B e in marrone la conducibilità. Come si può notare IF₁ 1-60 eluisce a un gradiente di buffer B del 20%, mentre la proteina SUMO eluisce al 50% di buffer B

L'ultima cromatografia utilizzata per IF₁ 1-60 è una SEC analitica (Superdex™ 75 10/300 GL), per ottenere la proteina da sola priva di eventuali aggregati. Il buffer SEC utilizzato presenta una forza ionica minore rispetto quello di OSCP-N, quest'ultima a tale forza ionica tende ad aggregare, mentre IF₁ essendo un'IDP non presenta una struttura ordinata, per tale motivo sta bene sia a bassa che ad alta forza ionica. La proteina viene concentrata per essere caricata nel *Loop* da 1 mL. Il flusso

utilizzato è di 0.5 mL/min, a una pressione massima di 1.5 MPa e a una conducibilità di 8 mS/cm. Si procede frazionando. Come si nota nel programma in figura 33 IF₁ 1-60 esce a un volume di, circa a 13 mL, inferiore a quello che previsto per una proteina di quelle dimensioni. Questo è dovuto al fatto che essendo disordinata presenta un volume idrodinamico maggiore rispetto ad una proteina globulare delle stesse dimensioni.

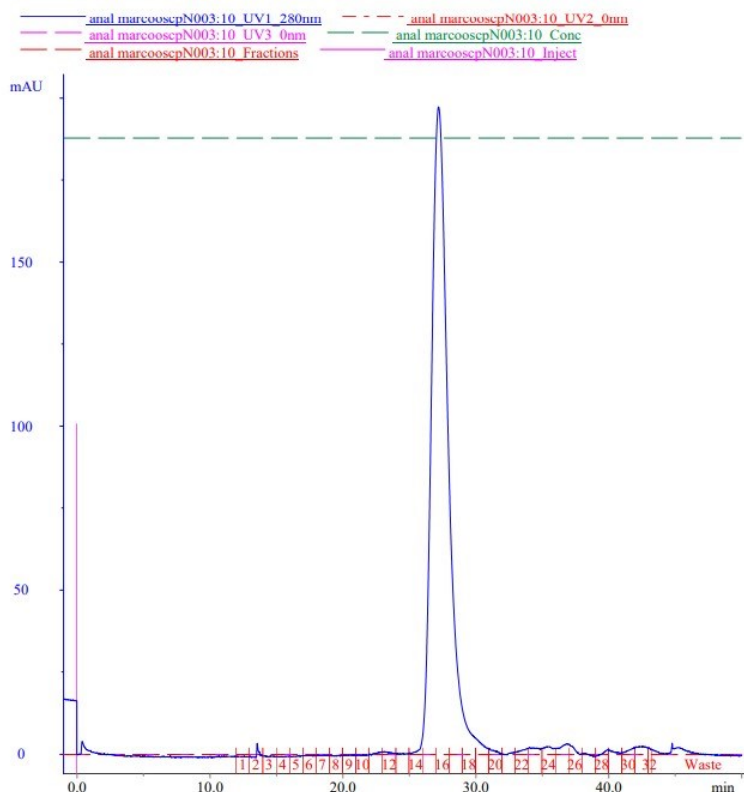


Figura 33: cromatogramma SEC analitica. Come si nota in soluzione è presente solamente IF₁ 1-60 in quanto viene rilevato un solo picco di assorbanza (in blu). La proteina eluisce dopo circa 13 mL in quanto è un'IDP e perciò presenta un volume idrodinamico maggiore di una normale proteina foldata di 6 kDa. Il basso valore di assorbanza registrato è dovuto al basso coefficiente di estinzione molare (ϵ) $1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Quantificazione mediante spettroscopia UV-vis

Al termine della purificazione si esegue una quantificazione per misurare la resa proteica e il quantitativo di proteina ottenuto. Anche per IF₁ per misurare il valore

di assorbanza si utilizzano 100 μ L di campione. Generalmente per una coltura con terreno LB e M9 si ottiene una quantità di proteina pari a:

- LB: 41 μ M (2.5 mL di campione);
- M9: 134 μ M (2 mL di campione).

Tali valori non erano sufficienti per ottenere un quantitativo ideale per le analisi NMR. Per tale motivo la preparativa è stata ripetuta più volte e le proteine venivano congelate mediante azoto liquido e conservate a -80°C .

4.3 Studio di interazione tra OSCP-N e IF₁ 1-60 mediante NMR

OSCP-N marcata

La proteina OSCP-N, così come IF₁ 1-60, è stata studiata mediante spettroscopia NMR bidimensionale di correlazione eteronucleare ¹⁵N-SOFAST-HMQC (600 MHz NMR Spectrometer Bruker), riportata in figura 34. Lo spettro mostra zone di sovrapposizione, soprattutto nella zona attorno 8 ppm della dimensione del protone, ma i segnali sono comunque ben distinguibili. La proteina, inoltre, risulta essere ben *foldata* e dallo spettro si può evidenziare come essa sia correttamente esprimibile e purificabile, mediante il protocollo utilizzato in questo lavoro di tesi.

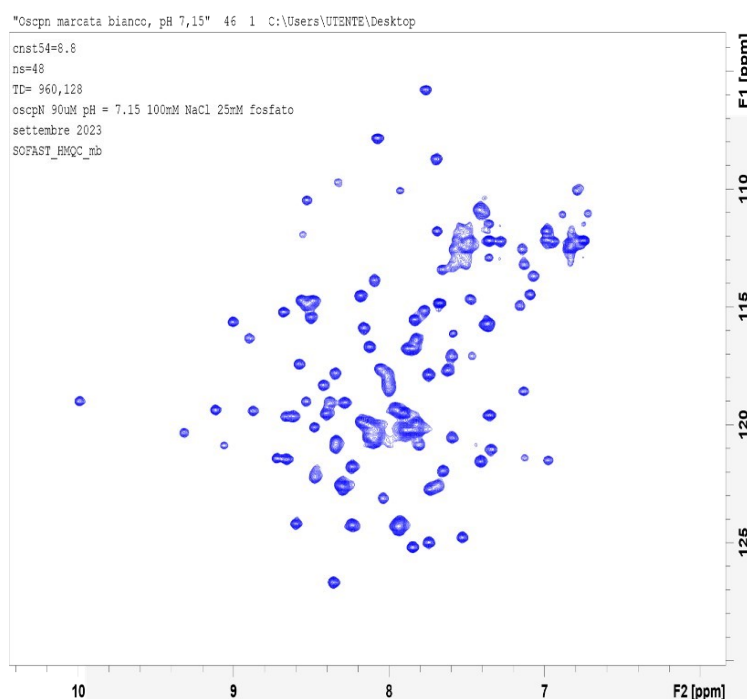


Figura 34: spettro NMR bidimensionale di OSCP-N da sola, bianco. Il tubo è costituito da: 66 μ L OSCP-N 480 μ M + 204 μ L buffer SEC OSCP-N + 10 μ L D₂O, pH 7.15, 283K.

Per lo studio dell'interazione tra OSCP-N e IF₁ 1-60 mediante NMR è necessario raggiungere la concentrazione ottimale delle proteine per ottenere degli spettri NMR con i segnali puliti e per monitorare le possibili variazioni di *chemical shift* da parte dei residui delle proteine. Sono stati acquistati degli spettri NMR bidimensionali di correlazione eteronucleare ¹H¹⁵N SOFAST-HMQC, della proteina OSCP-N marcata isotopicamente con ¹⁵N e della stessa presenza di IF₁ 160

non marcata (altrimenti non si saprebbe a quale proteina appartengono i segnali). Il tubo Shigemi (280 μL) è composto da:

- Bianco: 66 μL OSCP-N 480 μM + 204 μL buffer SEC OSCP-N + 10 μL D_2O , pH 7.15;
- Mix: 66 μL OSCP-N 480 μM + 195 μL IF_1 1-60 2.8 mM + 10 μL D_2O + 9 μL buffer SEC OSCP-N, pH 7.13.

Come si nota dalla composizione dei tubi, nel tubo mix, costituito da entrambe le proteine analizzate in questo lavoro di tesi, la concentrazione di IF_1 1-60 è circa 20 volte maggiore rispetto a OSCP-N. Tale rapporto è stato scelto per monitorare le variazioni di *chemical shift* nello spettro NMR, in quanto l'interazione che tali proteine instaurano sono deboli, di natura elettrostatica; dunque a un rapporto inferiore non è possibile monitorare variazioni di *chemical shift* significative nello spettro bidimensionale NMR (figura 35).

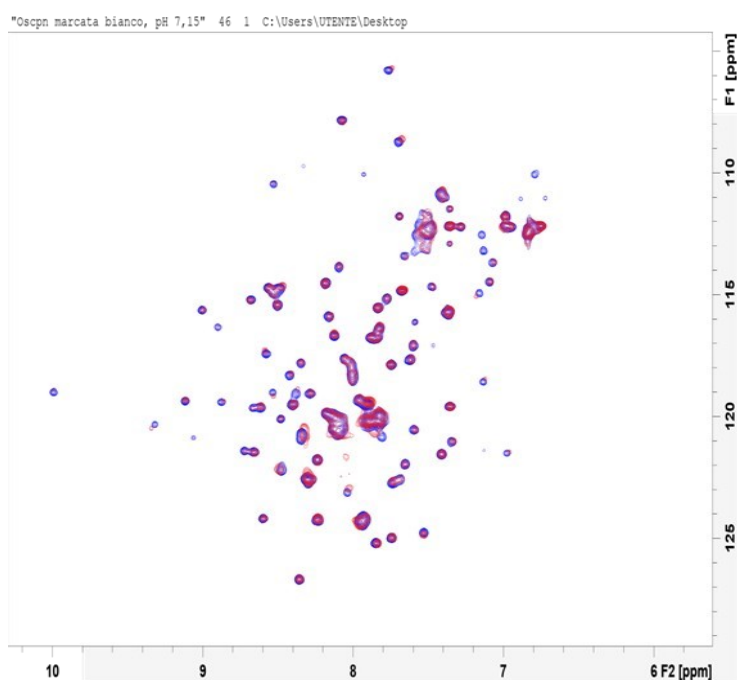


Figura 35: spettro NMR bidimensionale di confronto tra il tubo del bianco, in blu, e il tubo di mix, in rosso. Quest'ultimo presentava la seguente composizione: 66 μL OSCP-N 480 μM + 195 μL IF_1 1-60 2.8 mM + 10 μL D_2O + 9 μL buffer SEC OSCP-N, pH 7.13, 283K. Sono riscontrabili piccole variazioni di *chemical shift*.

Come si nota in figura 35 ci sono delle variazioni di *chemical shift* di diversi residui, che confermano l'avvenuta interazione tra OSCP-N e IF₁ 1-60. Tali residui verranno successivamente analizzati, come spiegato in seguito, mediante analisi con il tool Sparky e analisi dati Excel, per evidenziare quali sono quelli che subiscono le variazioni maggiori. Da una prima analisi qualitativa si è riscontrato che le variazioni di *chemical shift* dei residui ottenute con questo esperimento NMR bidimensionale sono molto simili a quelle ottenute in precedenza dal nostro gruppo di ricerca analizzando un costrutto di IF₁ più corto, composto dai primi 40 residui (Galber et al. 2023).

Due settimane dopo la prima acquisizione degli spettri, è stato eseguito un ulteriore esperimento (figura 36), sugli stessi campioni, per monitorare come varia la degradazione di OSCP-N quando si trova da sola, rispetto a quando è in presenza di IF₁ 1-60. Tale analisi viene condotta per monitorare se la formazione del complesso rallenti la degradazione, stabilizzando la proteina.

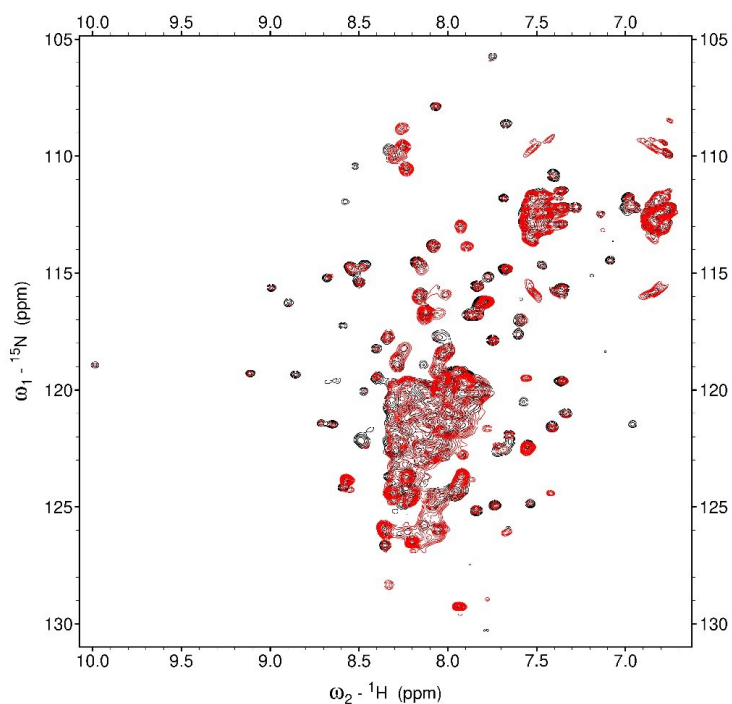


Figura 36: spettro NMR bidimensionale di OSCP-N acquisito due settimane dopo la prima acquisizione. In rosso viene riportato lo spettro bianco, mentre in nero lo spettro della proteina con IF₁ 1-60. Come si nota in quest'ultimo i segnali dei picchi sono ancora intensi e ben visibili, mentre nel bianco i segnali dei picchi non sono più ben risolti e l'intensità dei segnali diminuisce.

IF₁ 1-60 marcata

La stessa tipologia di esperimento è stata eseguita per studiare la proteina mitocondriale IF₁ 1-60 marcata isotopicamente con ¹⁵N. È stato condotto anche in questo caso un esperimento NMR bidimensionale di correlazione eteronucleare 15N-SOFAST-HMQC (600 MHz NMR Spectrometer Bruker), riportato in figura 37. Come si nota, IF₁ è una IDP, ovvero non possiede una determinata struttura ma è disordinata. Questa sua caratteristica fa sì che tutti i segnali che si vengono a generare da uno spettro NMR bidimensionale si trovino relativamente poco dispersi, tutti intorno a 8 ppm nella dimensione protonica, ma i segnali sono comunque ben distinguibili.

Dallo spettro ottenuto si evidenzia che la proteina è presente in soluzione e non aggregata alle concentrazioni relativamente alte richieste dalla metodica, indicativo del fatto che IF₁ 1-60 è correttamente esprimibile e purificabile mediante il protocollo eseguito in questo lavoro di tesi.

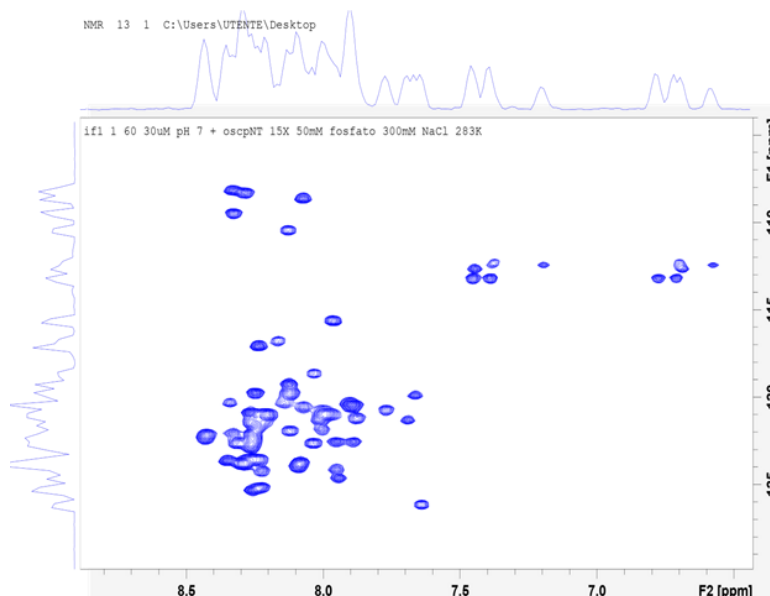


Figura 37: spettro NMR bidimensionale di IF₁ 1-60 da ola, bianco. Tale tubo è costituito da: 12 μ L IF₁ 1-60 697 μ M + 250 μ M buffer OSCP-N SEC analitica + 10 μ L D₂O, pH 7.12, 283K.

Una volta raggiunta la concentrazione e il volume adeguato di proteine mediante vari processi di espressione e purificazione, si può procedere all'analisi mediante NMR. È stato effettuato uno spettro NMR bidimensionale di

correlazione eteronucleare $^1\text{H}^{15}\text{N}$ SOFAST-HMQC di IF₁ 1-60 marcata in presenza di OSCP-N non marcata.

I tubi Shigemi (280 μL) sono composti da:

- Bianco: 12 μL IF₁ 1-60 697 μM + 250 μM buffer OSCP-N SEC analitica + 10 μL D₂O, pH 7.12
- Mix: 12 μL IF₁ 1-60 697 μM + 230 μL OSCP-N 516 μM + 10 μL D₂O + 28 μL buffer OSCP-N SEC analitica, pH 7.11.

Come si nota dalla composizione dei tubi, il buffer utilizzato per portare a un volume totale di 280 μL è il buffer della SEC analitica di OSCP-N. Viene scelto in quanto OSCP-N tende ad aggregare a bassa forza ionica; quindi, il buffer SEC analitica di IF₁ non può essere utilizzato.

Anche in questo è stato utilizzato una concentrazione maggiore della proteina non marcata (rapporto 1:20), in quanto l'interazione che instaurano è debole; dunque, si evidenziano poche variazioni di *chemical shift*, come si nota nello spettro in figura 38.

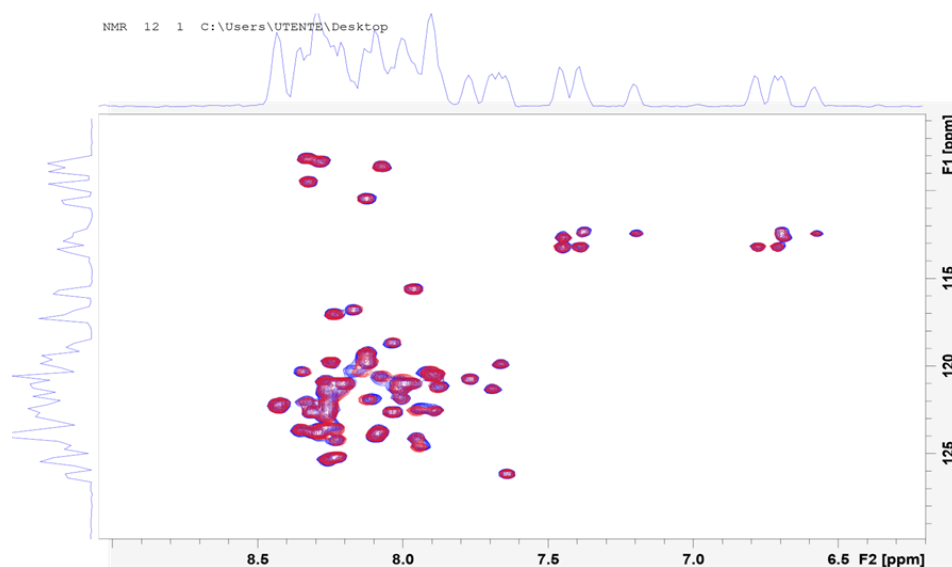


Figura 38: spettro NMR bidimensionale di confronto tra il tubo bianco, in blu, e il tubo mix, rosso. La composizione del tubo mix è la seguente: 12 μL IF₁ 160 697 μM + 230 μL OSCP-N 516 μM + 10 μL D₂O + 28 μL buffer OSCP-N SEC analitica, pH 7.11, 283K. Sono evidenziabili piccole variazioni di *chemical shift*.

Gli spettri ottenuti sono stati successivamente analizzati mediante il tool Sparky, per monitorare quali sono i residui proteici di IF₁ 1-60 che subiscono le variazioni di *chemical shift* maggiori.

Per monitorare come varia la degradazione di IF₁ 1-60 nel corso del tempo, viene eseguita un'ulteriore analisi due settimane dopo la prima scansione.

Gli spettri riportati in figura 39, il legame tra IF₁ 1-60 e OSCP-N stabilizzano la struttura di IF₁ in quanto la degradazione della proteina mitocondriale è minore, rispetto a quando è da sola.

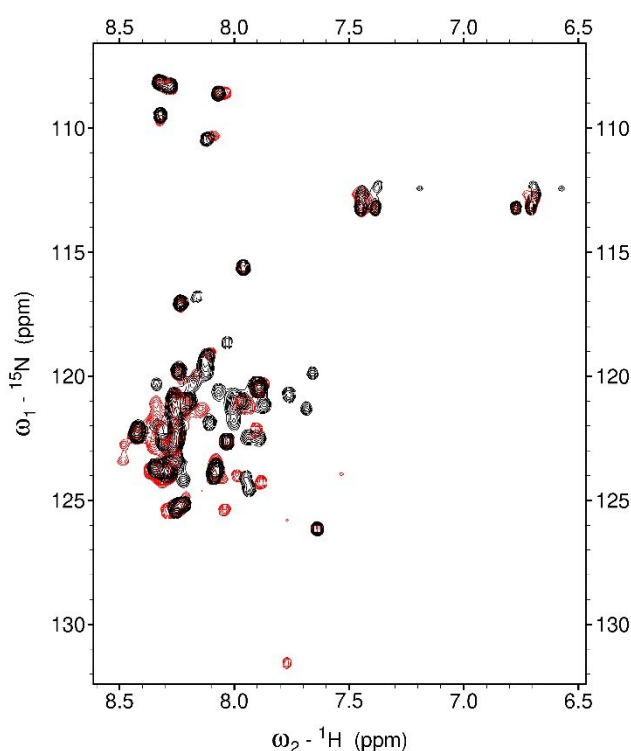


Figura 39: spettro NMR bidimensionale di IF₁ 1-60 acquisito due settimane dopo la prima analisi. In rosso viene riportato lo spettro bianco, mentre in nero la proteina con OSCP-N. In quest'ultimo si nota come i segnali dei picchi sono ancora ben risolti e intensi, mentre i segnali dei picchi del primo spettro presentano un'intensità e risoluzione inferiori.

4.4 Analisi Sparky

OSCP-N marcata

Sparky è un tool che consente di associare ciascun segnale generato da uno spettro NMR a uno specifico residuo. Inoltre, fornisce l'intensità di ciascun segnale per ogni dimensione (in questo caso del protone e dell'azoto). Una volta convertito lo spettro NMR bidimensionale di OSCP-N marcata con IF₁ non marcata in formato Sparky, esso viene aperto su tale tool. Lo spettro caricato su Sparky è riportato in figura 40.

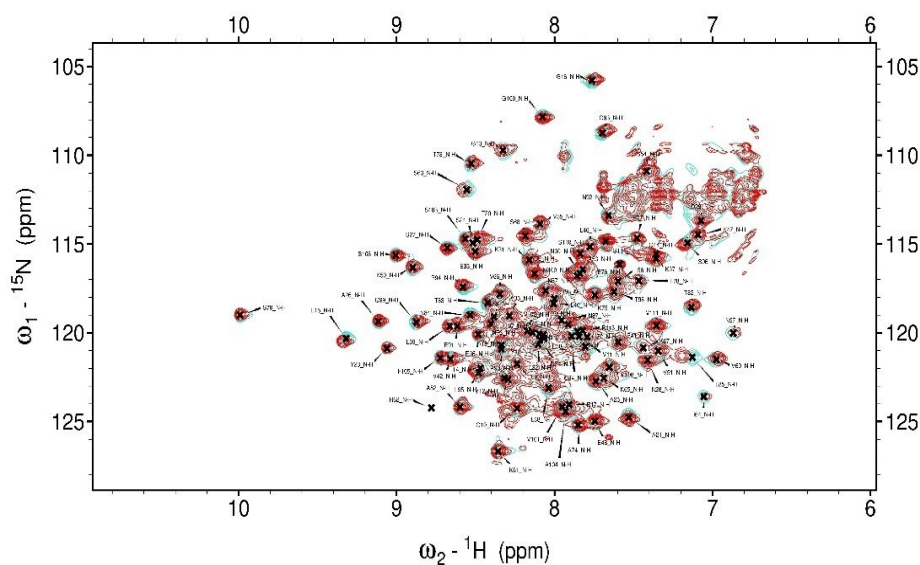


Figura 40: spettro NMR di OSCP-N convertito in formato Sparky e aperto in tale tool. In azzurro spettro bianco di OSCP-N, in rosso lo spettro del mix. Sparky consente di assegnare a ciascun segnale generato uno specifico residuo, come si può vedere in figura.

Come si nota dall'immagine a ciascun segnale è associato un residuo e in alto a destra si nota un po' di degradazione dovuto probabilmente ai passaggi di congelamento e scongelamento. A ciascun residuo sono associati il valore delle frequenze di risonanza per la dimensione del protone e le variazioni dei *chemical shift* tra la proteina da sola, bianco, e con IF₁, mix.

Dopo un processo di centramento dei picchi, ovvero centrare ogni singolo residuo con il centro del suo segnale, si ottengono i valori dell'intensità dei segnali nelle due dimensioni; tali segnali verranno riportati su un foglio Excel e verranno processati. Il centramento non è possibile farlo per tutti i residui in

quanto la risoluzione dello spettro NMR bidimensionale non è elevata, per tale motivo alcuni di questi segnali non verranno considerati nell'analisi dati.

Per calcolare le variazioni di *chemical shift* ciascun picco si utilizza la formula riportata di seguito:

$$\text{Eq. 10: } \Delta\delta = \sqrt{\frac{(\Delta\delta^{1H})^2 + \left(\frac{\Delta\delta^{15N}}{5}\right)^2}{2}}$$

Come si nota le variazioni di *chemical shift* nella dimensione dell'azoto vengono divisi per 5, in modo tale da poter paragonare in modo ottimale i segnali delle due dimensioni.

Una volta calcolato tale valore si costruisce l'istogramma riportato in figura 41:

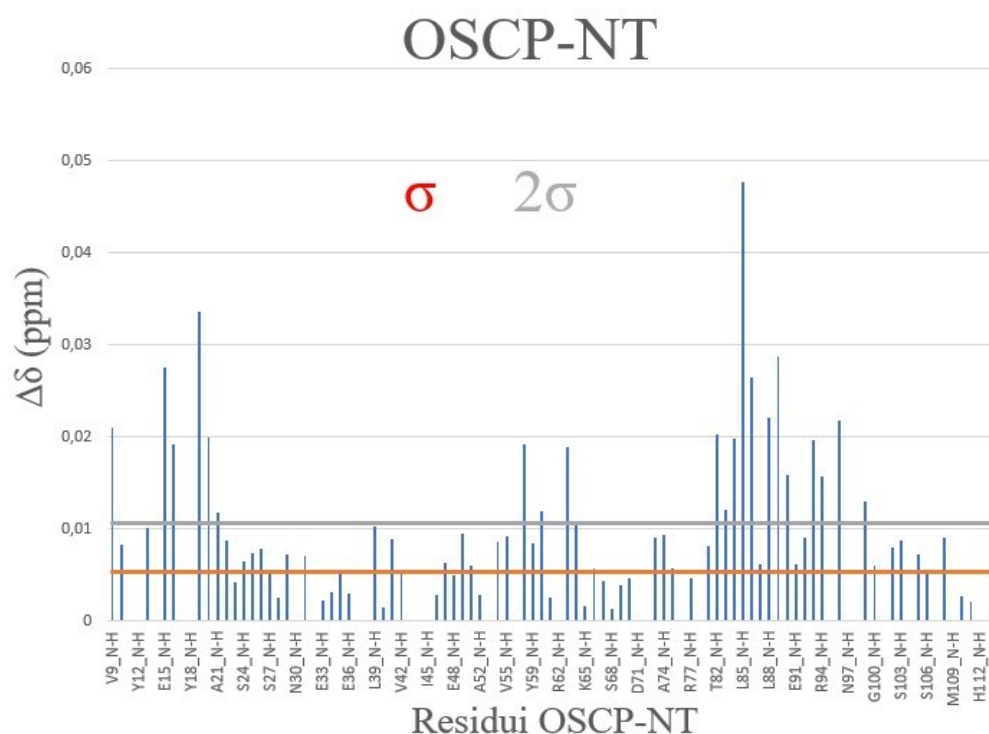
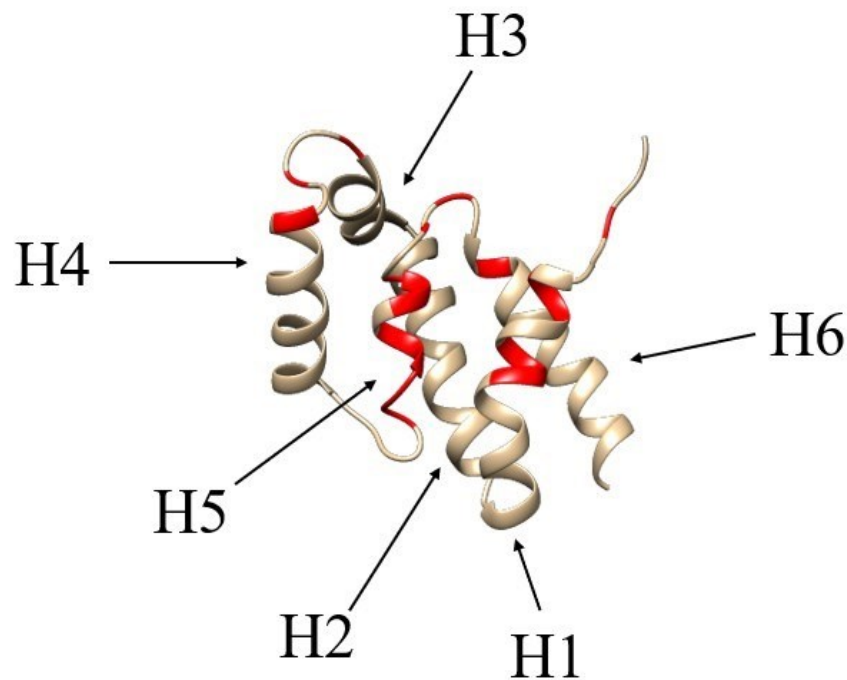


Figura 41: istogramma delle variazioni di *chemical shift* dei residui del costrutto OSCP-N. In arancio è riportata la deviazione standard (σ), mentre in rosso la deviazione standard per 2 (2σ). Esse servono per mettere in risalto quali sono i residui che subiscono le variazioni di *chemical shift* maggiori e che presentano perciò, un valore superiore a tali soglie.

Le linee orizzontali corrispondono al valore della deviazione standard (σ , in arancione) e della deviazione standard per 2 (2σ , in grigio). Esse servono per evidenziare quali sono i residui che subiscono le variazioni di *chemical shift* più significative.

Dall'analisi eseguita è emerso che i residui che subiscono le variazioni di *chemical shift* maggiori sono gli stessi di quando è stata testata con il costrutto di IF₁ 1-40, più corto (Galber et al., 2023). In particolare, i residui E15, G16, A19, T20 e A21 i quali appartengono all'elica H1; i residui N57, V60, S63 e I64 appartenenti alla *shoulder region* (H3-H4); e i residui compresi tra T82 e S96 situati tra l'elica H5 e H6 (figura 42). Perciò l'epitopo di legame tra il dominio N di OSCP e la proteina mitocondriale IF₁ è confermato.



*Figura 42: struttura del costrutto R6-R114 di OSCP-N studiato in questo lavoro di tesi, aperta tramite Chimera. In figura sono indicate le eliche del costrutto con i residui che subiscono le variazioni di *chemical shift* maggiori in rosso.*

Per confermare ulteriormente il verificarsi del legame tra le due proteine analizzate in questo lavoro di tesi, è stato eseguito un esperimento di massa in condizioni native, come verrà approfondito successivamente.

IF₁ marcata

La stessa procedura descritta per OSCP-N viene eseguita anche per IF₁ 1-60. Lo spettro bidimensionale ottenuto dall'analisi NMR viene convertito in formato Sparky e successivamente caricato su tale tool. Successivamente viene caricata la lista dei residui precedentemente assegnati dal nostro gruppo di ricerca. Come si può notare alcuni segnali sono privi di assegnazione, in quanto in precedenza sono stati presi in considerazione solo i primi 40 residui. Per tale motivo, i restanti 20 residui che vanno dal 41 al 60 sono privi di assegnazione e vengono indicati con il simbolo “???”. Le loro frequenze di risonanza per la dimensione del protone e dell'azoto verranno comunque analizzati per monitorare se subiscono variazioni di *chemical shift*.

Lo spettro Sparky della proteina IF₁ è riportato nella figura 43 sottostante.

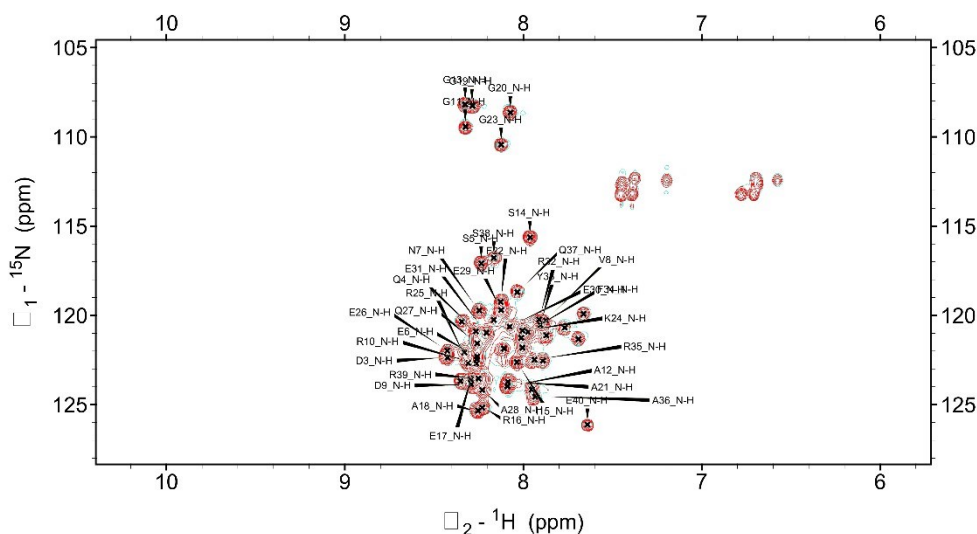


Figura 43: spettro NMR bidimensionale di IF₁ 1-60 convertito in formato Sparky e aperto mediante tale tool. In azzurro è lo spettro del bianco, mentre in rosso lo spettro del mix. Come si nota dal grafico vi sono dei picchi privi di assegnazione, dovuto al fatto che essi non sono stati ancora assegnati.

I segnali che non risultano ben risolti non verranno considerati per l'analisi dati.

Le variazioni di *chemical shift* dei segnali di ¹⁵N IF₁ in assenza e presenza di OSCP non marcata sono state analizzate utilizzando l'equazione 10 (Eq. 10).

Successivamente si ottiene il seguente istogramma (figura 44):

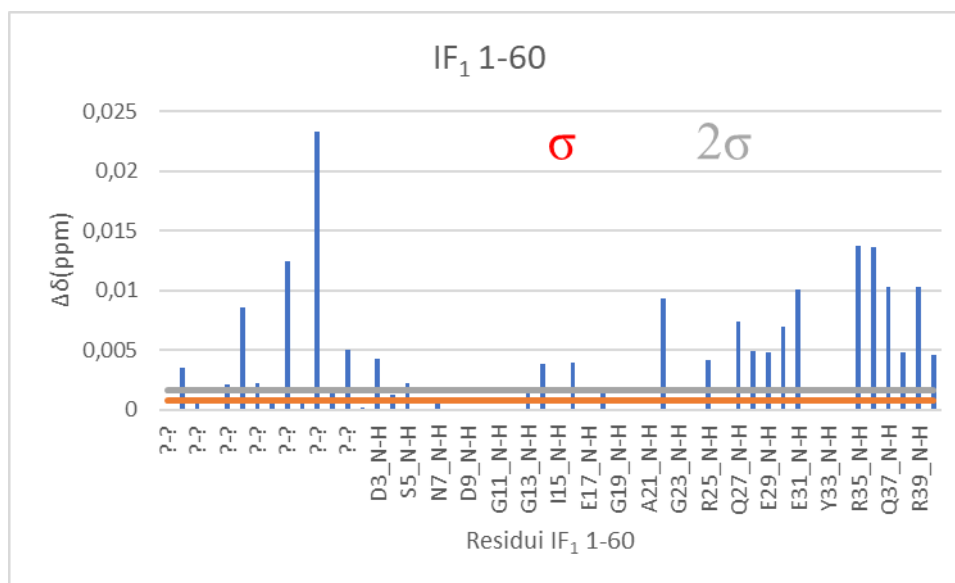


Figura 44: istogramma dei residui di IF₁ 1-60 che subiscono le variazioni di chemical shift maggiori. In rosso è riportata la deviazione standard (σ), mentre in grigio la deviazione standard per 2 (2σ). Esse vengono utilizzate per settare una soglia oltre la quale le variazioni di chemical shift dei residui sono importanti.

Le linee orizzontali corrispondono alla deviazione standard (σ , in arancio) e deviazione standard per 2 (2σ , in grigio). Esse vengono calcolate per andare a individuare quali residui presentano variazioni di chemical shift maggiori.

Dall'analisi condotta si nota che gli amminoacidi del costrutto IF₁ 1-60 che subiscono le variazioni di chemical shift maggiori si trovano tra i residui Q27 e E40. Tali residui sono gli stessi riscontrati dallo stesso gruppo di ricerca che in passato ha condotto lo stesso studio ma sul costrutto più piccolo di IF₁, ovvero i residui 1-40 (Galber et al., 2023), confermando il sito di legame. Tale conferma sono confortanti per andare successivamente a sintetizzare il peptide con la sequenza di legame di IF₁ (ovvero la porzione coinvolta nel legame) in modo tale da poter condurre altri esperimenti per determinare la costante di affinità_D.

Dallo studio condotto sono emersi delle variazioni di chemical shift anche in alcuni dei 20 residui aggiuntivi, ma a causa della mancata assegnazione non è possibile indicare quale residuo è soggetto a tale spostamento.

Per confermare la formazione del complesso molecolare tra OSCP-N e IF₁ 160 è stata eseguita un'analisi di spettrometria di massa in condizioni native, come verrà illustrato in seguito.

4.5 Studio dell'interazione tra OSCP-N e IF₁ mediante spettrometria di massa in condizioni native

La spettrometria di massa in condizioni native permette di monitorare la formazione o meno dei complessi molecolari e per questo motivo è stata utilizzata in questo lavoro di tesi.

La tecnica deve essere eseguita in presenza di solo buffer di acetato di ammonio, per tale motivo i buffer utilizzati per l'ultima purificazione della SEC analitica sia di OSCP-N che di IF₁ 1-60 sono costituiti solo da ammonio acetato, in quanto i sali non sono adatti alla tecnica. Per eliminare possibili contaminanti e sali presenti nella soluzione, provenienti dalle cromatografie precedenti alla SEC analitica, le proteine vengono lavate con un volume totale di 20 mL dei rispettivi buffer SEC analitica costituiti da solo ammonio acetato. Per lavarle si sono effettuati svariati step di centrifugazione a 5000 RCF, 10 minuti a 4°C, ponendo le proteine nei concentratori NeoSpin da 1.5 mL, con un *cut-off* di 5 kDa.

Per il calcolo della forza ionica si utilizza la seguente equazione (Eq. 11):

$$\text{Eq. 11: } I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 * C_i$$

La forza ionica per il buffer SEC analitica di OSCP-N è pari 0.45; mentre per IF₁ 1-60 è pari a 0.11. Dunque, è possibile calcolare quanto ammonio acetato serve in ogni buffer per emulare la forza ionica ideale. I buffer utilizzati presentano tale composizione:

- OSCP-N: 450 mM Ammonio Acetato
- IF₁ 1-60: 110 mM Ammonio Acetato

La spettrometria di massa ha il vantaggio di richiedere poche quantità di campione, per tale motivo è stato eseguito una sola fase di espressione e purificazione per entrambe le proteine. I campioni analizzati infatti hanno un volume di 10 µL.

Lo spettrometro di massa utilizzato presenta come sorgente *un'electrospray ionization* (ESI) e un analizzatore a tempo di volo (TOF).

Al termine della fase di purificazione abbiamo ottenuto 15 μL di OSCP-N 341 μM e 20 μL di IF₁ 1-60 2.2 mM. In questo lavoro di tesi sono stati preparati campioni da 5 μM di proteina.

È stato eseguito un primo esperimento di massa nativa su OSCP-N e IF₁ separatamente, con l'obiettivo di monitorare se le proteine stessero bene, se ci fosse la presenza di aggregati o contaminati vari. Gli spettri di massa di OSCP-N e IF₁ 1-60 sono riportati nella figura 45 e 46 rispettivamente:

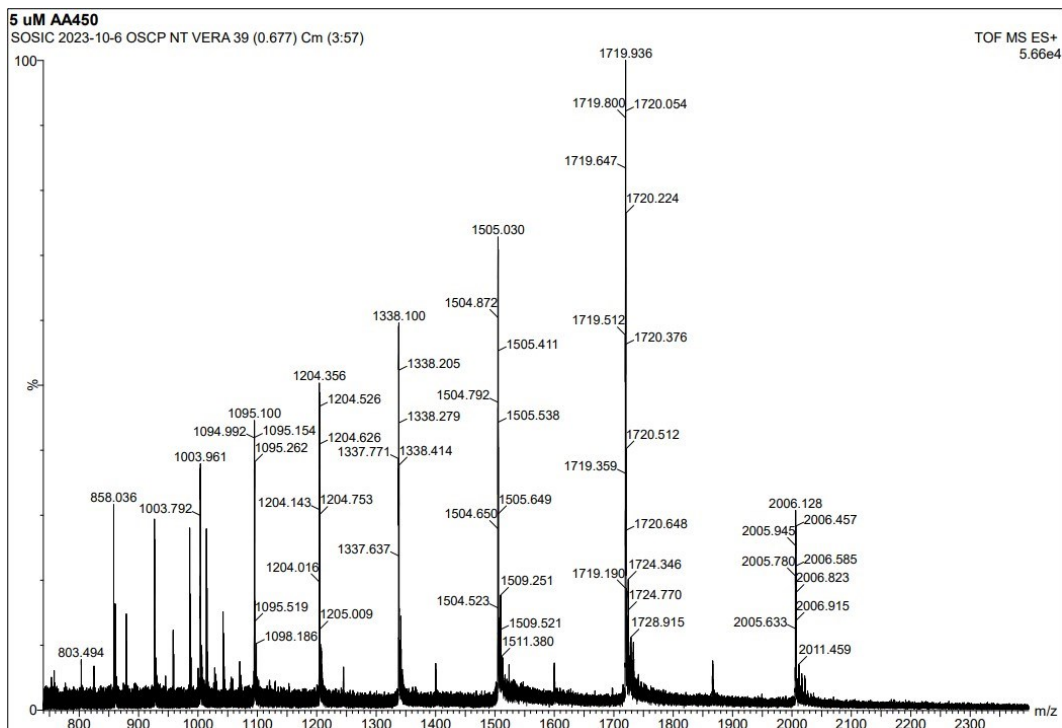


Figura 45: spettro MS di OSCP-N 5 μM in buffer SEC analitica OSCP-N 450 mM in buffer ammonio acetato 450 mM.

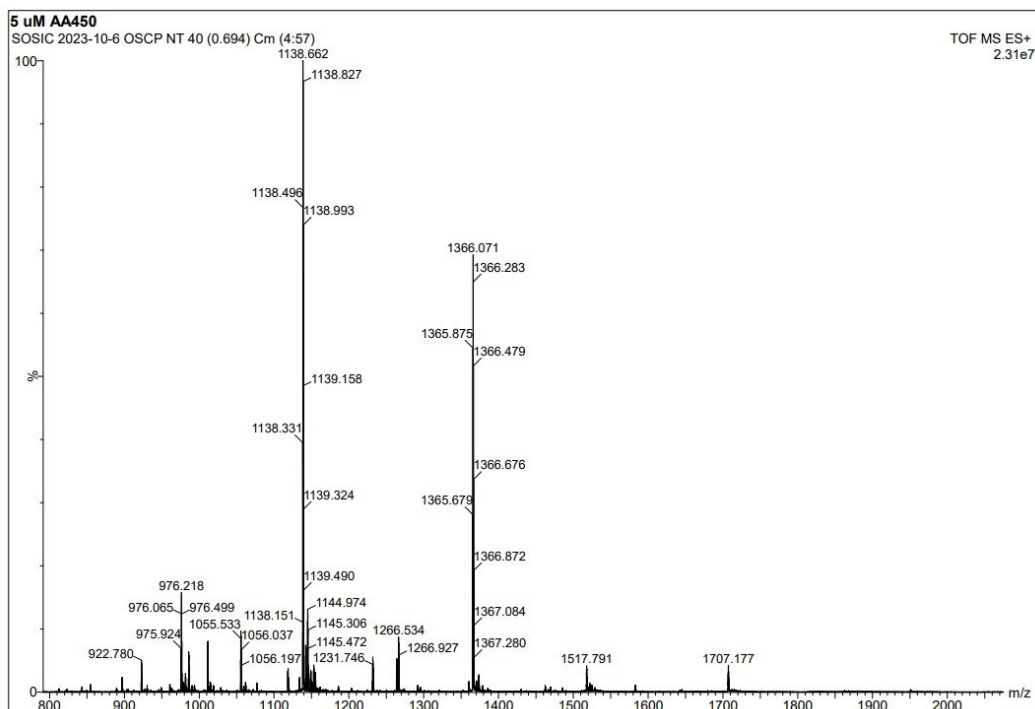


Figura 46: spettro MS IF₁ 1-60 5 μ M in buffer SEC analitica OSCP-N 450 mM Ammonio Acetato

I campioni per la spettrometria di massa nativa sono preparati con il buffer della SEC analitica di OSCP-N. Questa scelta è dovuta ad OSCP-N che tende ad aggregare in buffer di IF₁ 1-60, dunque si preferisce preparare i campioni con lo stesso buffer, in modo tale da avere uno spettro MS migliore, in particolare il rapporto segnale rumore, S/N.

Come precedentemente accennato vengono preparati campioni da 10 μ L. La composizione dei campioni del bianco è la seguente:

- OSCP-N: 0.3 μ L di OSCP-N 341 μ M + 9.7 μ L di buffer SEC analitica OSCP-N 450 mM ammonio acetato;
- IF₁ 1-60: 0.3 μ L di IF₁ 1-60 2.2 mM + 9.7 μ L di buffer SEC analitica OSCP-N 450 mM ammonio acetato. 12042.97

Come si nota dagli spettri di MS in figura 45 OSCP-N è presenta da sola nel campione, senza la presenza di aggregati o di possibili sali presenti. Tale affermazione è dovuta dalla presenza di una serie di picchi relativi allo ione molecolare con carica: +14 858.036 m/z; +12 1003.961 m/z; +10 1204.356 m/z;

+9 1338.100 m/z; +8 1505.030 m/z; +7 1719.936 m/z; +6 2006.128 m/z. Tali valori sono riconducibili al peso molecolare teorico di OSCP-N 12042.97 Da.

Lo stesso discorso vale anche per IF₁ 1-60 (figura 46), in quanto sono stati rilevati una serie di picchi relativi allo ione molecolare con carica: +7 976.218 m/z; +6 1138.662 m/z; +5 1366.071 m/z; +4 1707.177 m/z. Tali valori sono riconducibili alla massa teorica di IF₁ 1-60 di 6832.026 Da.

Per studiare l'interazione tra OSCP-N e IF₁ 1-60 sono stati preparati dei campioni con diversi rapporti tra le due proteine in esame. In particolare, il rapporto preso in esame e analizzato in questo lavoro di tesi è quello 1:10, ovvero la concentrazione di IF₁ 1-60 è 10 volte maggiore rispetto a quella di OSCP-N. La regione per cui viene scelto questo rapporto è la stessa per l'esperimento NMR bidimensionale, ovvero siccome l'interazione è debole, è necessario l'utilizzo di una concentrazione maggiore di ligandi.

Il campione per l'analisi presenta tale composizione:

- Mix: 1.5 µL di OSCP-N 341 µM + 4.6 µL di IF₁ 1-60 2.2 mM + 6.2 µL buffer OSCP-N SEC analitica 450 mM ammonio acetato.
- Mix: 1.5 µL di OSCP-N 341 µM + 4.6 µL di IF₁ 1-60 2.2 mM + 6.2 µL buffer IF₁ 1-60 SEC analitica 110 mM ammonio acetato.

Il campione contenente entrambe le proteine è stato preparato utilizzando una volta il buffer di OSCP-N e una volta il buffer di IF₁ 1-60, per monitorare se la differenza di forza ionica influenzasse o meno il legame tra le due. Gli spettri di massa di entrambe i campioni sono riportati in figura 47.

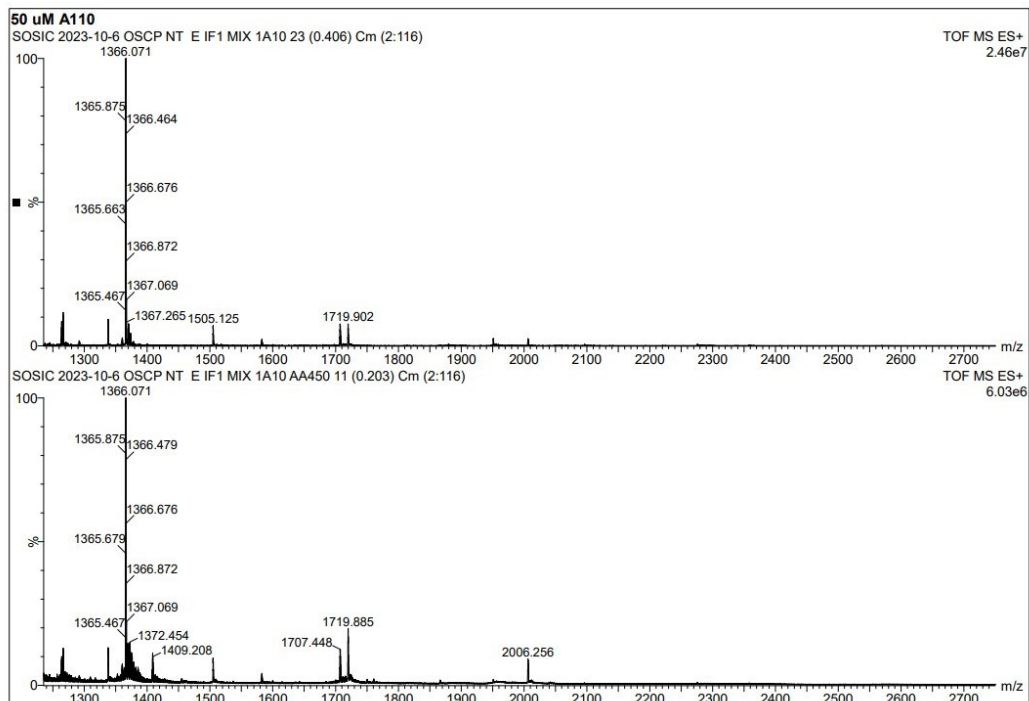


Figura 47: in alto è riportato lo spettro di massa del mix tra OSCP-N e IF₁ 160, in un rapporto molare 1:10, nel buffer SEC di IF₁ 1-60; la composizione del campione è la seguente: 1.5 µL di OSCP-N 341 µM + 4.6 µL di IF₁ 1-60 2.2 mM + 6.2 µL buffer IF₁ 1-60 SEC analitica 110 mM ammonio acetato. Sotto è riportato lo spettro di massa del mix tra OSCP-N e IF₁ 1-60, in un rapporto molare 1:10, nel buffer SEC di OSCP-N; la composizione del buffer è la seguente: 1.5 µL di OSCP-N 341 µM + 4.6 µL di IF₁ 1-60 2.2 mM + 6.2 µL buffer OSCP-N SEC analitica 450 mM ammonio acetato.

Dagli spettri ottenuti si sono riscontrati la presenza di due specie ioniche aggiuntive, assenti nei precedenti spettri MS utilizzati come bianco. Tali specie ioniche sono meglio evidenziabili mediante un ingrandimento nella zona tra 1750 e 2125 di rapporto m/z, come riportato nello spettro in figura 48.

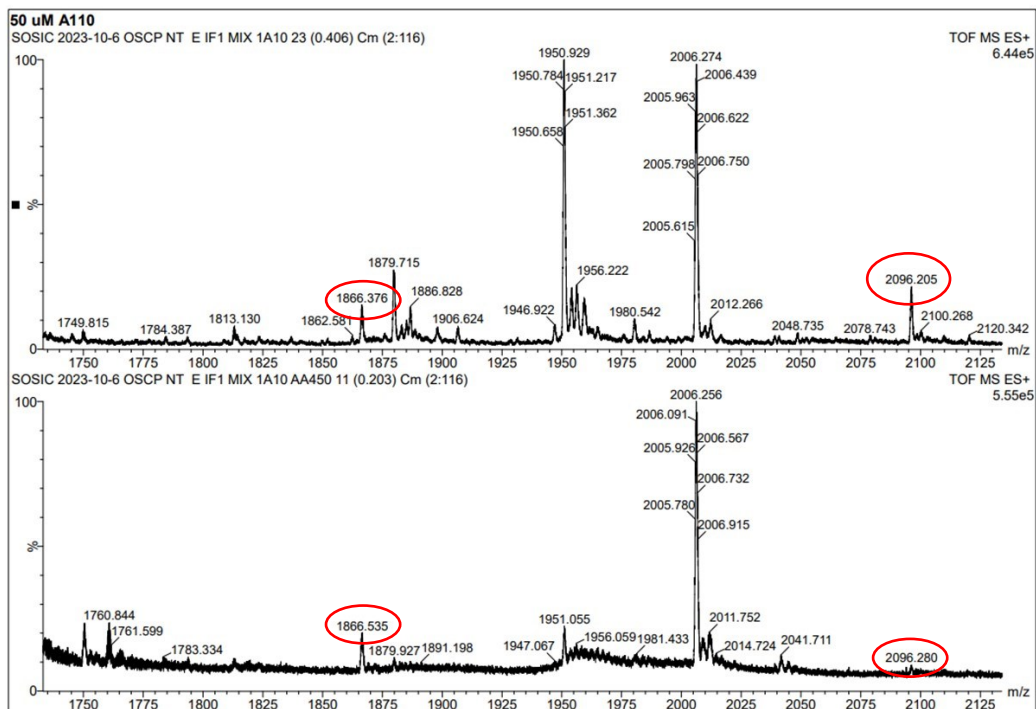


Figura 48: ingrandimento dell'area tra 1750 e 2125 di rapporto m/z . In alto viene riportato il mix nel buffer SEC di IF₁ 1-60, mentre sotto il mix nel buffer di OSCP-N. Gli ioni nuovi riscontrati nel mix di reazione e che sono assenti nel bianco di entrambe questi segnali sono cerchiati in rosso e corrispondono allo ione 1866.376 e lo ione 2096.205.

Come si nota dalla figura sovrastante vi è la presenza di due nuove specie ioniche, assenti nel bianco di entrambe le proteine. Tali specie ioniche (cerchiate in rosso) sono lo ione 1866.376 m/z e 2096.205 m/z ; essi corrispondono rispettivamente alla carica +10 e +9 ed è riconducibile al peso molecolare teorico del complesso OSCP-N-IF₁ 1-60, ovvero 18862.97 Da.

La presenza questi ioni fornisce un'importante informazione riguardo il legame tra le due proteine analizzate in questo lavoro di tesi, in quanto la loro presenza indica che il legame si viene a instaurare; dunque, vi è la formazione del complesso molecolare.

4.6 Discussione dello studio di interazione

La possibile interazione tra il dominio N-terminale della subunità OSCP e i residui 1-60 di IF₁ è stata studiata con due diverse tecniche: NMR e spettrometria di massa.

Mediante la generazione di spettri NMR bidimensionali è stato possibile evidenziare alcune variazioni di *chemical shift* dei segnali ottenuti, sia per OSCP-N che per IF₁. Mediante la successiva analisi eseguita con il tool Sparky, è stato possibile individuare i residui che subivano le variazioni di *chemical shift* maggiori, indice del fatto che sono coinvolti nell'interazione tra le due proteine analizzate.

Per avere la conferma definitiva della formazione del legame tra OSCP-N e IF₁ 1-60 è stata eseguita un'analisi di spettrometria di massa in condizione nativa. Per verificare l'interazione era necessario l'individuazione di una specie ionica assente negli spettri MS di OSCP-N e IF₁ 1-60 da soli. Tali specie ioniche aggiuntive, indice della formazione del complesso, sono 1866.376 m/z e 2096.205 m/z.

I risultati ottenuti confermano l'ipotesi che il dominio N-terminale e la proteina mitocondriale IF₁ interagiscono tra di loro.

5. Conclusioni e prospettive future

La proteina OSCP è una delle subunità che costituiscono l'ATP sintasi, complesso enzimatico localizzato nei mitocondri, in particolare nella membrana interna, responsabile della sintesi di ATP e del corretto metabolismo energetico delle cellule. OSCP è localizzata all'interfaccia tra il dominio catalitico e lo *stalk* periferico, che lo collega al dominio intermembrana, ed è il dominio maggiormente esposto verso la matrice mitocondriale. Tale localizzazione consente ad OSCP di avere un

importante ruolo regolatorio; infatti, è un sito di interazione per i molti modulatori dell'ATP sintasi, e grazie alla sua flessibilità, trasmette le variazioni conformazionali instaurate dall'interazione al complesso molecolare. L'importanza della subunità risiede anche nel ruolo chiave di regolatore, sempre attraverso le interazioni con particolari modulatori, della formazione e attività del *Permeability Transition Pore* (PTP), complesso proteico che svolge un ruolo fondamentale nel processo di apoptosi.

Il lavoro di tesi esposto si inserisce in un progetto più ampio il cui obiettivo era provare l'interazione tra OSCP e la proteina IF₁. L'interazione, ipotizzata nelle cellule tumorali, in cui IF₁ risulta sovraespressa, potrebbe inibire l'apertura del PTP rendendo le cellule tumorali immortali. Lo studio di tale interazione costituisce un elemento fondamentale per la comprensione dei fenomeni che sottraggono le cellule tumorali dai normali processi di difesa dell'organismo e potrebbe rappresentare una nuova via di ricerca farmacologica nella terapia antitumorale.

Facendo seguito a studi precedenti svolto da questo gruppo di ricerca, in questo lavoro di tesi l'obiettivo era di confermare l'interazione tra il dominio N-terminale di OSCP e i residui 1-60 di IF₁, entrambi nelle forme umane. Dopo aver espresso per via ricombinante i domini, lo studio di interazione è stato condotto mediante l'utilizzo di due diverse tecniche: risonanza magnetica nucleare e spettrometria di massa nativa.

Gli spettri NMR bidimensionali ottenuti hanno mostrato *chemical shift perturbation* per diversi residui di entrambe le proteine marcate. Tali residui hanno permesso di definire l'epitopo di interazione tra le due proteine. Utilizzando il costrutto 1-60 di IF₁ si sono ottenuti risultati sostanzialmente uguali a quelli ottenuti in precedenza utilizzando una variante più corta di IF₁(1-40). Per verificare ulteriormente tale interazione è stata eseguita un'analisi di spettrometria di massa nativa che rappresenta un metodo complementare per lo studio dell'interazione. Tale analisi ha confermato la formazione del complesso mediante l'individuazione di due specie ioniche, solamente presenti nel campione contenente sia OSCP-N che IF₁ 1-60 e corrispondenti alla massa molecolare del complesso.

I risultati incoraggiano future analisi e danno un'ulteriore conferma della possibile interazione tra le due proteine. In particolare, la fase successiva sarà produrre la proteina IF₁ doppiamente marcata, sia con il ¹⁵N che con il ¹³C, in modo tale da poter acquisire degli spettri NMR tridimensionali. Tale analisi ha l'obiettivo di andare ad assegnare i 20 residui aggiuntivi, i primi 40 erano stati assegnati da questo gruppo di ricerca.

Per avere la conferma dell'epitopo di interazione verrà sintetizzato un peptide costituito dal numero minimo di residui di IF₁ coinvolti nell'interazione. Il *binding* di tale peptide su OSCP-N verrà caratterizzato mediante NMR ed i risultati verranno confrontati con quelli ottenuti con le proteine più lunghe. Successivamente si eseguirà anche uno studio ITC per calcolare la costante di affinità (K_D) tra OSCP-N e il peptide.

6. Abbreviazioni e acronimi

AEC: Anionic Exchange Chromatography

ATP: Adenosine TriPhosphate

A β : proteina β amiloide

Bz 423: Benzodiazepina 423

CEC: Cationic Exchange Chromatography

CyPD: CYcloPhilin D

DSS: acido 4,4-dimetil-4-silapentane-1-solfonico

ESI: ElectroSpray Ionisation

FID: Free Induction Decay

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation

IDP: Intrinsically Disordered Protein

IF₁: Inhibitory Factor 1

IMAC: Immobilised Metal Affinity Chromatography

IMM: Inner Mitochondrial Membrane

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside

NFκB: Nuclear Factor κ chain transcription in B cells

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

OSCP: Oligomycin Sensitivity Conferral Protein

PCR: Polymerase Chain Reaction PKA:

Protein Kinase A

PMSF: fenilmetilsolfonil fluoruro

PTP: Permeability Transition Pore

ROS: Reactive Oxygen Species

SEC: Size Exclusion Chromatography

SOFAST: band-Selective Optimized-Flip-Angle Short-Transient

SUMO: Small Ubiquitin-related Modifier

TFA: acido trifluoroacetico

TMS: TetraMetilSilano

TOF: Time Of Flight

TRIS: tris(idrossimetil)amminometano cloridrato

B_{DP}: conformazione della subunità β specifica per il legame con ADP e P_i

β_E: conformazione della subunità β specifica per il rilascio dei substrati β-

ME: β-mercaptoetanolo β_{TP}: conformazione della subunità β specifica per il legame con Mg²⁺-ATP

7. Ringraziamenti

Ringrazio il prof. Bellanda per avermi dato la possibilità di fare il tirocinio nei pressi del suo laboratorio e di avermi introdotto in un ambiente magnifico.

Simone, ragazzo molto intelligente, che mi ha accompagnato durante questi nove mesi e che mi ha insegnato, oltre a numerose tecniche, anche come si lavora in laboratorio. Ti auguro il meglio per il futuro.

A Lara per essermi stato vicino durante questi due anni sia nei momenti belli che meno belli. Grazie per avermi spinto e aiutato sia nell'ambito privato che in quello universitario, senza di te probabilmente ci avrei messo altri due anni prima di laurearmi. Ti voglio bene e ti auguro il meglio.

Gloria, Francesco e Matteo, fidati compagni di laboratorio che ci sono sempre stati sia nei momenti di difficoltà sia quando c'era bisogno di fare innumerevoli pause caffè.

A mia madre, mio padre e mia sorella, per avermi dato la possibilità di studiare e per essermi stati vicini durante tutto il mio percorso universitario.

Ringrazio i miei tre coinquilini, Fulvio per essere sempre presente nei momenti in cui avevo bisogno di staccare la testa e per avermi accolto sin dal primo giorno di Padova; Giovanni per avermi regalato momenti di spensieratezza da quando si è unito a noi; e Mario, per essere stato tanto paziente e per essere sempre disponibile per spiegazioni.

Ringrazio tutti i ragazzi/e che ho conosciuto a Padova con i quali ho passato due anni meravigliosi, tanti momenti di svago e che mi hanno fatto sentire a casa.

8. Bibliografia

- Antonieli, M., Giorgio, V., Fogolari, F., Glick, G., Bernardi, P., & Lippe, G. (2014). The Oligomycin-Sensitivity Conferring Protein of Mitochondrial ATP Synthase: Emerging New Roles in Mitochondrial Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(5), 7513–7536. <https://doi.org/10.3390/ijms15057513>
- Antonieli, M., Jones, K., Antonucci, S., Spolaore, B., Fogolari, F., Petronilli, V., Giorgio, V., Carraro, M., Di Lisa, F., Forte, M., Szabó, I., Lippe, G., & Bernardi, P. (2018). The unique histidine in OSCP subunit of F-ATP synthase mediates inhibition of the permeability transition pore by acidic pH. *EMBO Reports*, *19*(2), 257–268. <https://doi.org/10.15252/embr.201744705>
- Beck, S. J., Guo, L., Phensy, A., Tian, J., Wang, L., Tandon, N., Gauba, E., Lu, L., Pascual, J. M., Kroener, S., & Du, H. (2016). Deregulation of mitochondrial F₁F₀-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *7*(1), 11483. <https://doi.org/10.1038/ncomms11483>
- Bergeaud, M., Mathieu, L., Guillaume, A., Moll, U., Mignotte, B., Le Floch, N., Vayssière, J.-L., & Rincheval, V. (2013). Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. *Cell Cycle*, *12*(17), 2781–2793. <https://doi.org/10.4161/cc.25870>
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blalchy-Dyson, E., Di Lisa, F., & Forte, M. A. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS Journal*, *273*(10), 2077–2099. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05213.x>
- Cabezón, E., Butler, P. J. G., Runswick, M. J., & Walker, J. E. (2000). Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F₁-ATPase Inhibitor Protein, IF1, by pH.

Journal of Biological Chemistry, 275(33), 25460–25464.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M003859200>

Carbajo, R. J., Kellas, F. A., Runswick, M. J., Montgomery, M. G., Walker, J. E., & Neuhaus,

D. (2005). Structure of the F₁-binding Domain of the Stator of Bovine F₁F_oATPase and How it Binds an α -Subunit. *Journal of Molecular Biology*, 351(4),

824–838. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.012>

Carbajo, R. J., Kellas, F. A., Yang, J.-C., Runswick, M. J., Montgomery, M. G., Walker, J. E., & Neuhaus, D. (2007). How the N-terminal Domain of the OSCP Subunit of Bovine F₁F_o-ATP Synthase Interacts with the N-terminal Region of an Alpha Subunit. *Journal of Molecular Biology*, 368(2), 310–318.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.059>

Carraro, M., Checchetto, V., Szabó, I., & Bernardi, P. (2019). F- ATP synthase and the permeability transition pore: Fewer doubts, more certainties. *FEBS Letters*, 593(13), 1542–1553. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13485>

Carraro, M., Jones, K., Sartori, G., Schiavone, M., Antonucci, S., Kucharczyk, R., Di Rago, J.-P., Franchin, C., Arrigoni, G., Forte, M., & Bernardi, P. (2020). The Unique

Cysteine of F-ATP Synthase OSCP Subunit Participates in Modulation of the Permeability Transition Pore. *Cell Reports*, 32(9), 108095.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108095>

Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D., & Kühlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13602–13607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204593109>

Davies, K. M., & Daum, B. (2013). Role of cryo-ET in membrane bioenergetics research.

Biochemical Society Transactions, 41(5), 1227–1234.

<https://doi.org/10.1042/BST20130029>

Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., A Sosunov, A., M McKhann, G., Yan, Y., Wang, C.,

Zhang, H., Molkentin, J. D., Gunn-Moore, F. J., Vonsattel, J. P., Arancio, O.,

Chen, J. X., & Yan, S. D. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease.

Nature Medicine, 14(10), 1097–1105. <https://doi.org/10.1038/nm.1868> Edelhoich, H.

(1967). Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in

Proteins *. *Biochemistry*, 6(7), 1948–1954. <https://doi.org/10.1021/bi00859a010>

EMD Biosciences (1971). Novagen pET System Manual 11th Edition.

Faccenda, D., Nakamura, J., Gorini, G., Dhoot, G. K., Piacentini, M., Yoshida, M., &

Campanella, M. (2017). Control of Mitochondrial Remodeling by the ATPase

Inhibitory Factor 1 Unveils a Pro-survival Relay via OPA1. *Cell Reports*, 18(8),

1869–1883. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.070>

Fiorentino, F., Rotili, D., & Mai, A. (2023). Native mass spectrometry-directed drug discovery: Recent advances in investigating protein function and modulation.

Drug Discovery Today, 28(5), 103548.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103548>

Formentini, L., Pereira, M. P., Sánchez-Cenizo, L., Santacatterina, F., Lucas, J. J.,

Navarro, C., Martínez-Serrano, A., & Cuezva, J. M. (2014). In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning.

The EMBO Journal, 33(7), 762–778. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386392>

Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L., & Cuezva, J. M. (2012). The

Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response. *Molecular Cell*, 45(6), 731–742.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.008>

- Galber, C., Fabbian, S., Gatto, C., Grandi, M., Carissimi, S., Acosta, M. J., Sgarbi, G., Tiso, N., Argenton, F., Solaini, G., Baracca, A., Bellanda, M., & Giorgio, V. (2023). The mitochondrial inhibitor IF1 binds to the ATP synthase OSCP subunit and protects cancer cells from apoptosis. *Cell Death & Disease*, *14*(1), 54.
<https://doi.org/10.1038/s41419-023-05572-y>
- García-Bermúdez, J., & Cuezva, J. M. (2016). The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1857*(8), 1167–1182.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.004>
- García-Bermúdez, J., Sánchez-Aragó, M., Soldevilla, B., del Arco, A., Nuevo-Tapióles, C., & Cuezva, J. M. (2015). PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase. *Cell Reports*, *12*(12), 2143–2155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.052>
- Giorgio, V., Burchell, V., Schiavone, M., Bassot, C., Minervini, G., Petronilli, V., Argenton, F., Forte, M., Tosatto, S., Lippe, G., & Bernardi, P. (2017). Ca²⁺ binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition. *EMBO Reports*, *18*(7), 1065–1076. <https://doi.org/10.15252/embr.201643354>
- Giorgio, V., Fogolari, F., Lippe, G., & Bernardi, P. (2019). OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: Role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore. *British Journal of Pharmacology*, *176*(22), 4247–4257.
<https://doi.org/10.1111/bph.14513>
- Giorgio, V., Guo, L., Bassot, C., Petronilli, V., & Bernardi, P. (2018). Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*, *70*, 56–63.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>

- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., Lippe, G., & Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(15), 5887–5892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>
- Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2007). How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(40), 15671–15676. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707326104>
- Griffiths, E. J., & Halestrap, A. P. (1993). Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *25*(12), 1461–1469. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1993.1162>
- Gu, J., Zhang, L., Zong, S., Guo, R., Liu, T., Yi, J., Wang, P., Zhuo, W., & Yang, M. (2019). Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science*, *364*(6445), 1068–1075. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4852>
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(1), 232–238. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst187>
- Kühlbrandt, W., & Davies, K. M. (2016). Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(1), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.006>
- Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D., & Butt, T. R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics*,

5(1/2), 75–86. <https://doi.org/10.1023/B:JSFG.0000029237.70316.52>

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A*

Publication of the Protein Society, 4(11), 2411–2423.

<https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>

Palma, E., Tiepolo, T., Angelin, A., Sabatelli, P., Maraldi, N. M., Basso, E., Forte, M. A., Bernardi, P., & Bonaldo, P. (2009). Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice. *Human Molecular Genetics*, 18(11), 2024–2031.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp126>

Petronilli, V., Costantini, P., Scorrano, L., Colonna, R., Passamonti, S., & Bernardi, P. (1994). The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(24), 16638–16642.

Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., & Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophysical Journal*, 76(2), 725–734.

[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77239-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77239-5)

Pinke, G., Zhou, L., & Sazanov, L. A. (2020). Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(11), 1077–1085.

<https://doi.org/10.1038/s41594-020-0503-8>

Rasola, A., Sciacovelli, M., Chiara, F., Pantic, B., Brusilow, W. S., & Bernardi, P. (2010). Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 107(2), 726–731.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0912742107>

Rees, D. M., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2009). The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21597–21601.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0910365106>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Rühle, T., & Leister, D. (2015). Assembly of F1F0-ATP synthases. *Biochimica Et Biophysica*

Acta, 1847(9), 849–860. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.005>

Sánchez-Aragó, M., Formentini, L., Martínez-Reyes, I., García-Bermudez, J., Santacatterina, F., Sánchez-Cenizo, L., Willers, I. M., Aldea, M., Nájera, L., Juarránz, A., López, E. C., Clofent, J., Navarro, C., Espinosa, E., & Cuezva, J. M. (2013). Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis*, 2(4), e46.

<https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.9>

Schanda, P., Kupce, E., & Brutscher, B. (2005). SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. *Journal of Biomolecular NMR*, 33(4), 199–211.

<https://doi.org/10.1007/s10858-005-4425-x>

Spikes, T. E., Montgomery, M. G., & Walker, J. E. (2020). Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23519–23526. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013998117>

- Stelzer, A. C., Frazee, R. W., Van Huis, C., Cleary, J., Opirari, A. W., Glick, G. D., & AlHashimi, H. M. (2010). NMR studies of an immunomodulatory benzodiazepine binding to its molecular target on the mitochondrial F₁F₀-ATPase. *Biopolymers*, 93(1), 85–92. <https://doi.org/10.1002/bip.21306>
- Tamara, S., Den Boer, M. A., & Heck, A. J. R. (2022). High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Chemical Reviews*, 122(8), 7269–7326. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00212>
- Van Schaick, G., Haselberg, R., Somsen, G. W., Wuhrer, M., & Domínguez-Vega, E. (2022). Studying protein structure and function by native separation–mass spectrometry. *Nature Reviews Chemistry*, 6(3), 215–231. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00353-7>
- Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S., & Moll, U. M. (2012). P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149(7), 1536–1548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.014>
- Vassilopoulos, A., Pennington, J. D., Andresson, T., Rees, D. M., Bosley, A. D., Fearnley, I. M., Ham, A., Flynn, C. R., Hill, S., Rose, K. L., Kim, H.-S., Deng, C.-X., Walker, J. E., & Gius, D. (2014). SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(4), 551–564. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5420>
- Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>
- Yang, W., Nagasawa, K., Münch, C., Xu, Y., Satterstrom, K., Jeong, S., Hayes, S. D., Jedrychowski, M. P., Vyas, F. S., Zaganjor, E., Guarani, V., Ringel, A. E., Gygi, S. P., Harper, J. W., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondrial Sirtuin Network Reveals

Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization. *Cell*, 167(4), 985-1000.e21.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.016> Young, C. L., Britton, Z. T., &

Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications.

Biotechnology Journal, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>

Zamzami, N., & Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: How Pandora's box opens. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(1), 67–71.

<https://doi.org/10.1038/35048073>