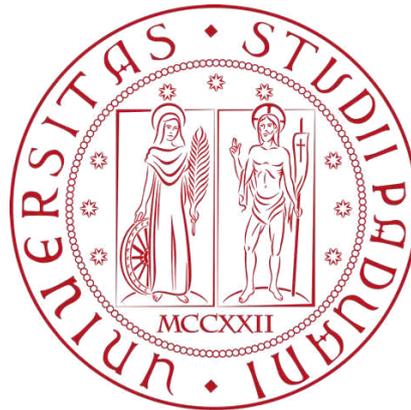


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biologia  
Corso di laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di laurea

*Analisi biochimiche di cellule di paziente con sindrome  
mitocondriale causata da una mutazione del gene ISCA2*

**Tutor:**

Prof.ssa Paola Costantini

**Co-tutor:**

Dott. Davide Doni

**Laureanda:**

Anna Vendrame

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

## Indice

<i>Indice delle figure</i> .....	3
<i>Indice delle tabelle</i> .....	3
<b>1 Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>2 Capitolo 1: Stato dell'arte</b> .....	<b>5</b>
2.1 <i>Biogenesi dei centri ferro-zolfo</i> .....	5
2.2 <i>Mutazioni e patologie associate</i> .....	6
2.3 <i>ISCA2 e Sindrome da disfunzione mitocondriale multipla</i> .....	7
2.4 <i>Scopo dello studio</i> .....	9
<b>3 Capitolo 2: Materiali e Metodi</b> .....	<b>10</b>
3.1 <i>Colture cellulari</i> .....	10
3.1.1 <i>Mantenimento in coltura dei fibroblasti</i> .....	10
3.1.2 <i>Conta cellulare</i> .....	12
3.2 <i>Western Blot</i> .....	13
3.2.1 <i>Lisi cellulare e quantificazione</i> .....	13
3.2.2 <i>SDS-PAGE e trasferimento</i> .....	15
3.2.3 <i>Saggio immunologico e chemiluminescenza</i> .....	17
3.3 <i>Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</i> .....	19
<b>4 Capitolo 3: Risultati e Discussione</b> .....	<b>21</b>
4.1 <i>Western Blot</i> .....	21
4.1.1 <i>Aconitasi 2</i> .....	23
4.1.2 <i>FECH</i> .....	24
4.1.3 <i>NDUFS1</i> .....	24
4.1.4 <i>SDHB</i> .....	25
4.1.5 <i>UQCRCFS1</i> .....	26
4.1.6 <i>ISCU</i> .....	26
4.1.7 <i>NFS1</i> .....	27
4.1.8 <i>Discussione generale dei risultati ottenuti tramite Western Blot</i> .....	27
4.2 <i>Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</i> .....	28
4.3 <i>Progetti futuri e conclusioni</i> .....	30
<b>5 Bibliografia</b> .....	<b>31</b>

## **Indice delle figure**

Figura 1: Modello di biogenesi delle proteine ferro-zolfo mitocondriali .....	5
Figura 2: Fibroblasti in coltura al 70% di confluenza.....	11
Figura 3: Western Blot e Istogramma ACO2.....	23
Figura 4: Western Blot e Istogramma FECH.....	24
Figura 5: Western Blot e Istogramma NDUFS1 .....	24
Figura 6: Western Blot e Istogramma SDHB .....	25
Figura 7: Western Blot e Istogramma UQCRC1.....	26
Figura 8: Western Blot e Istogramma ISCU .....	26
Figura 9: Western Blot e Istogramma NFS1 .....	27
Figura 10: Immagini al TEM di mitocondri di cellule di controllo e ISCA2 .....	29

## **Indice delle tabelle**

Tabella 1: Concentrazioni proteiche ottenute tramite saggio BCA .....	14
Tabella 2: Anticorpi utilizzati, fornitori e condizioni d'uso .....	19

# 1 Abstract

L'obiettivo del seguente elaborato è quello di presentare gli esperimenti svolti al fine di comprendere il fenotipo mitocondriale causato da una mutazione sul gene che codifica per ISCA2. Lo studio è stato svolto in collaborazione con il professore Salviati della Città della Speranza di Padova.

In particolare, gli esperimenti sono concentrati sul caso di un paziente ISCA2 con mutazione p.Ser112Gly. Il fenotipo del paziente è rappresentato da una encefalomiopatia, nonostante non sia estremamente severo. Clinicamente la patologia è spesso multisistemica, i sistemi maggiormente colpiti sono il sistema nervoso centrale, periferico e il muscolo.

Il gene *ISCA2* è localizzato sul cromosoma 14q24.3 e codifica per una proteina coinvolta nella sintesi dei centri [4Fe-4S]. Una mutazione di questo gene risulta responsabile della sindrome da disfunzioni mitocondriali multiple di tipo 4, una malattia mitocondriale neurodegenerativa a insorgenza precoce. La perdita di funzione di ISCA2 compromette la respirazione, la produzione di ATP, il potenziale di membrana mitocondriale e porta a una rete mitocondriale accorciata e un ridotto numero di copie di mtDNA.

Nell'ambito dell'indagine sperimentale, sono state condotte analisi sulla morfologia dei mitocondri presenti nei fibroblasti del paziente utilizzando la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Un focus significativo è stato posto sulle analisi eseguite tramite Western Blot, valutando le proteine influenzate o meno dalla funzione di ISCA2. Dai risultati ottenuti, è stato possibile stabilire una correlazione tra la mutazione in ISCA2 e lo stato patologico del paziente.

## 2 Capitolo 1: Stato dell'arte

### 2.1 Biogenesi dei centri ferro-zolfo

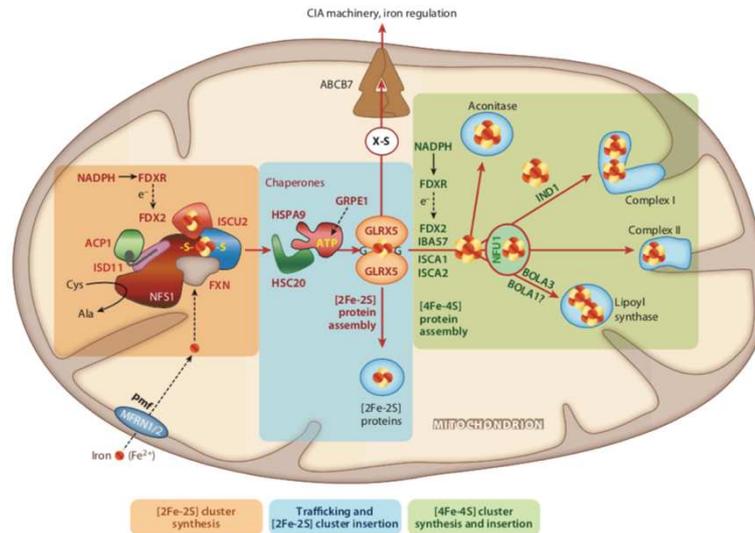


Figura 1: Modello di biogenesi delle proteine ferro-zolfo mitocondriali

I centri ferro-zolfo (Fe/S) sono una classe antica ed ubiquitaria di cofattori. Vengono sintetizzati nei mitocondri, dove svolgono funzioni o possono essere esportati per l'uso nel citosol. Nonostante la semplicità chimica dei centri Fe/S più abbondanti, ovvero le forme [2Fe-2S], [3Fe-3S] e [4Fe-4S], la loro sintesi, trasporto e assemblaggio nelle apoproteine sono facilitati da macchinari proteici molto complessi. Il processo è guidato dal macchinario di assemblaggio di *cluster* ferro-zolfo (ISC) ed è stato suddiviso in tre fasi principali: la sintesi *ex novo* di un centro [2Fe-2S] sulla proteina *scaffold* ISCU2, che funge da impalcatura; il trasferimento del centro debolmente legato da ISCU2 mediato dallo chaperone Hsp70 alla glutatione monotiolica GLRX5, seguito dallo spostamento e inserimento nelle proteine bersaglio [2Fe-2S]; avviene infine la conversione del centro legato a GLRX5 in [4Fe-4S], seguito dal trasferimento e inserimento nelle proteine bersaglio [4Fe-4S].

La sintesi di un centro [2Fe-2S] a partire dal ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e dallo zolfo derivato dalla cisteina libera, coinvolge la partecipazione di sette diversi fattori ISC. Sei di questi formano il complesso centrale ISC, che contiene la cisteina desulfurasi NFS1 come componente centrale. La sintesi inizia con la conversione della cisteina

libera in alanina e il trasferimento del gruppo S a una cisteina conservata di NFS1, creando un gruppo persolfuro. La proteina ferredossina viene utilizzata per la riduzione del solfuro persolfuro (S<sub>0</sub>) al fine di generare un centro [2Fe-2S].

Il secondo passo principale nella biogenesi delle proteine Fe/S mitocondriali coinvolge il rilascio del centro [2Fe-2S] da ISCU2. ISCU2 viene consegnato allo chaperone Hsp70 HSPA9, che stimola l'idrolisi dell'ATP e innesca una modifica conformazionale del dominio legante il peptide dell'HSPA9, intrappolando così l'ISCU2 complessivo del centro. Infine, avviene il traffico del centro [2Fe-2S] legato all'omomero GLRX5 alle rispettive apoproteine bersaglio e l'inserzione nella catena polipeptidica.

L'ultimo passo nella biogenesi delle proteine Fe/S mitocondriali comprende la sintesi di un centro [4Fe-4S] e la sua inserzione nelle apoproteine riceventi. In questa fase sono coinvolte una serie di proteine quali: ISCA1, ISCA2, IBA57, NFU1, IND1 e BOLA. Entrambe le proteine ISCA interagiscono tra loro, e ISCA2 si lega preferibilmente a IBA57. Insieme, queste tre proteine ISC sono responsabili della generazione di praticamente tutte le proteine mitocondriali [4Fe-4S]. [1]

## 2.2 Mutazioni e patologie associate

La comprensione di questi complessi meccanismi ha aperto la strada all'identificazione di malattie associate a difetti in questa via. Generalmente, disfunzioni nel processo di assemblaggio dei centri Fe/S causano malattie multisistemiche con una predominanza di fenotipi neurologici e cardiologici.

Vengono riportati alcuni esempi:

- L'atassia di Friedreich è una malattia neurologica progressiva causata da varianti genetiche nel gene *FXN*, che porta a una marcata diminuzione della proteina fratassina.
- Miopatia ISCU è dovuta a varianti in ISCU, le quali causano carenze di enzimi contenenti centri Fe/S.
- Malattia correlata a LYRM4 è rara e causata da varianti in LYRM4, un fattore che regola la stabilità e l'attività di NFS1 e partecipa all'assemblaggio dei centri [2Fe-2S].
- Miopatia da FDX2 è associata a varianti in FDX2.

- Malattia correlata a GLRX5, causata da varianti in GLRX5, che compromettono la biogenesi dei centri Fe/S.

Queste patologie condividono un'anomalia nella formazione dei centri Fe/S, con conseguenti disfunzioni mitocondriali e sintomi clinici variabili. [2]

### **2.3 ISCA2 e Sindrome da disfunzione mitocondriale multipla**

Il gene *ISCA2*, situato sul cromosoma 14q24.3, codifica per una proteina coinvolta nella maturazione delle proteine mitocondriali ferro-zolfo. In collaborazione con *ISCA1* e *IBA57*, *ISCA2* partecipa alla fase finale della formazione dei centri ferro-zolfo. Varianti deleterie in questi geni causano la sindrome da disfunzione mitocondriale multipla (MMDS) di tipo 1 fino a tipo 5. Queste malattie si manifestano con un metabolismo energetico ridotto e compromissione della respirazione mitocondriale, colpendo principalmente tessuti ad alto fabbisogno energetico come cuore, cervello e muscoli. I sintomi iniziano precocemente e spesso conducono a una sopravvivenza limitata all'infanzia.

Una mutazione del gene che codifica per la proteina *ISCA2* risulta responsabile della sindrome da disfunzioni mitocondriali multiple di tipo 4.

Studi funzionali hanno dimostrato che la perdita di funzione di *ISCA2* compromette la respirazione, la produzione di ATP, il potenziale di membrana mitocondriale e porta a una rete mitocondriale accorciata e a un ridotto numero di copie di mtDNA. Inoltre, è stato dimostrato che l'alterazione di *ISCA2* non ha conseguenze sulla funzione delle proteine mitocondriali dipendenti da [2Fe-2S], bensì diminuisce la funzione del complesso II della catena respiratoria e la lipoilazione delle proteine, dipendente dalle proteine [4Fe-4S].

Queste scoperte sostengono l'idea che *ISCA2* probabilmente interviene nell'assemblaggio dei centri [4Fe-4S], influenzando di conseguenza la corretta funzione dei mitocondri.

Livelli proteici e attività enzimatiche sono stati valutati nei tessuti e nei modelli cellulari di pazienti con silenziamento genico, evidenziando una diminuzione del complesso II, mantenendo intatti i complessi I e III. Questi complessi sono costituiti

da diverse subunità con centri Fe/S; il complesso I ha otto centri Fe/S di cui due [2Fe–2S] e sei [4Fe–4S], mentre il complesso II ne ha tre, uno di ciascun tipo. Il complesso III porta un singolo centro [2Fe–2S].

ISCA2 è coinvolto nella maturazione dei centri [4Fe–4S], non influenzando quelli di tipo [2Fe–2S]. Ciò suggerisce che complessi I e II potrebbero manifestare carenze rispetto al complesso III. Studi precedenti, utilizzando modelli cellulari di silenziamento di ISCA2, hanno evidenziato riduzioni nell'attività dei complessi I e II, oltre a una diminuzione nei livelli proteici e nell'attività enzimatica dei complessi III e IV. Tuttavia, variazioni tra studi possono derivare da differenze cellulari e metodi di valutazione, mentre l'eterogeneità tra pazienti può contribuire agli effetti variabili.

[3]

Mutazioni nei geni ISCA1, ISCA2 e IBA57 sono associate a fenotipi clinici simili, compresi difetti neurodegenerativi come leucodistrofie dell'infanzia. [4]

Una rilevante scoperta riguarda l'interazione tra ISCA2 e IBA57, evidenziata dalle mutazioni nei loro geni riscontrate in pazienti affetti da sindromi da disfunzione mitocondriale multipla (MMDS). Questi pazienti mostrano un fenotipo biochimico simile, caratterizzato da difetti nei complessi I e II della catena respiratoria e da una ridotta lipoilazione delle proteine mitocondriali, entrambi causati da un assemblaggio compromesso dei centri [4Fe-4S]. La ridotta espressione di ISCA2 nei pazienti con IBA57 e viceversa suggerisce un collegamento funzionale diretto tra le due proteine, indicando che ISCA2 e IBA57 operano sinergicamente nella maturazione delle proteine [4Fe-4S]. [5]

Nel 2021 sono state identificate diverse famiglie con mutazioni in ISCA2, presenti in membri dello stesso nucleo familiare. Queste mutazioni sono associate a disordini neurologici, psicomotori e fenotipi patologici complessi. Gli studi molecolari hanno rivelato variazioni omozigote in ISCA2. Sebbene lo sviluppo psicomotorio iniziale fosse normale, il quadro clinico è peggiorato nel primo anno di vita, manifestando spasticità e compromissione visiva, tipiche di patologie mitocondriali. Lesioni nella sostanza bianca cerebrale, cerebellare e nel midollo

spinale sono risultate costanti, indicando una possibile leucoencefalopatia con coinvolgimento del tronco encefalico e del midollo spinale.

La morte solitamente si verifica nel periodo neonatale o nei primi anni di vita, e i sopravvissuti adolescenti presentano una grave encefalopatia, senza casi di sopravvivenza fino all'età adulta. [6]

## **2.4 Scopo dello studio**

Il gene *ISCA2* codifica una proteina coinvolta nel processo di sintesi dei centri [4Fe-4S]. La compromissione della funzione di *ISCA2* si traduce in un impatto negativo sulla respirazione, la produzione di ATP e il potenziale di membrana mitocondriale.

Lo scopo della ricerca è dunque quello di comprendere un'ipotetica correlazione tra la mutazione p.Ser112Gly in *ISCA2* e lo stato patologico del paziente. Al fine di comprendere ciò, vengono svolte delle analisi tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e Western Blot.

In particolare, la microscopia elettronica permette di analizzare la morfologia dei mitocondri presenti nei fibroblasti del paziente al fine di osservare variazioni rispetto ai mitocondri presenti nei fibroblasti di controllo. Le analisi tramite Western Blot permettono invece di fare una valutazione delle proteine che vengono o meno influenzate dalla funzione di *ISCA2*. Per fare ciò, sono state selezionate delle proteine con funzioni differenti all'interno del mitocondrio, in modo tale da avere una prospettiva ampia e più specifica concentrandosi su proteine contenenti centri ferro-zolfo.

## **3 Capitolo 2: Materiali e Metodi**

### **3.1 Colture cellulari**

I tessuti rappresentano la fonte di materiale più adatta per isolare le cellule in quanto rappresentano le cellule che effettivamente si trovano nel corpo. Il primo passaggio dell'isolamento di cellule singole è dato dalla disgregazione della matrice extracellulare e le giunzioni cellula-cellula che tengono unite le cellule fra loro. Per fare ciò il tessuto viene in genere trattato con enzimi proteolitici e agenti che legano, o chelano, il calcio da cui dipende l'adesione cellula-cellula. Una blanda agitazione permette di dissociare il tessuto in cellule singole. A questo punto le cellule possono essere fatte crescere in coltura e rappresentano una popolazione omogenea di cellule da cui estrarre materiale. La maggior parte delle cellule provenienti da tessuti non riesce a vivere in sospensione per cui richiede una superficie solida sulla quale crescere e dividersi. Solitamente questo supporto viene fornito dalla superficie di una piastra di coltura di plastica.

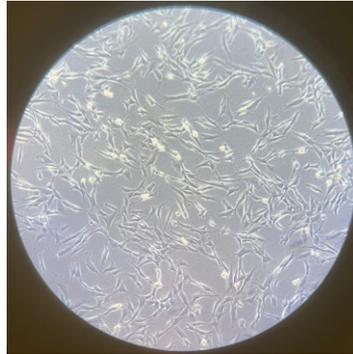
Prendono il nome di colture primarie quelle generate direttamente dai tessuti di un organismo e generalmente le cellule costituenti le colture primarie vengono rimosse dalla piastra e coltivate di nuovo (*passate*) ripetutamente in colture secondarie. Questo permette alle cellule di essere subcoltivate più volte per settimane o mesi. Ad un certo punto però le cellule muoiono, il processo di senescenza cellulare replicativa infatti riguarda quelle cellule che cessano di dividersi dopo un numero finito di divisioni cellulari in coltura. [7]

#### **3.1.1 Mantenimento in coltura dei fibroblasti**

I fibroblasti sono cellule ottenute da una biopsia cutanea e sono deputati a produrre le proteine del derma. I fibroblasti umani si dividono di norma soltanto 25-40 volte in coltura prima di entrare in senescenza. In queste cellule la limitata capacità di proliferazione riflette un progressivo accorciamento e una progressiva perdita di telomeri delle cellule stesse.

Tutti gli esperimenti sono preceduti dallo scongelamento delle cellule e dal loro mantenimento in coltura in modo tale da raggiungere una quantità di cellule, nel

caso specifico di fibroblasti, ad una densità elevata. Crescendo e duplicandosi, i fibroblasti formano un monostrato cellulare confluyente che occupa l'intera superficie della piastra. I fibroblasti presentano una morfologia allungata, fusiforme e tendono a crescere gli uni vicino agli altri.



*Figura 2: Fibroblasti in coltura al 70% di confluenza*

Le *criovials* contenenti i fibroblasti sono conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  per cui il primo passaggio dello scongelamento coinvolge l'estrazione delle *criovials* e il loro posizionamento nel bagno termostatico a  $37^{\circ}\text{C}$ . Non appena si staccano dal fondo della *criovial* vengono risospese in 5 mL di terreno (*DMEM con glutammax, piruvato, 25mM glucosio, 10% FBS e 1% antibiotici penicillina/streptomicina*) e trasferite in una Falcon. Il terreno ha la funzione di diluire il DMSO ovvero un criopreservante che è tossico per le cellule. Successivamente, le cellule vengono centrifugate per 10 minuti a  $200 \times g$  con formazione di un pellet in cui sono localizzate le cellule. Viene così eliminato il surnatante contenente residui di DMSO e FBS per poi risospendere nuovamente le cellule in 5 mL di terreno DMEM. Le cellule vengono poi trasferite in una fiasca T25 e distribuite uniformemente con un movimento a croce della fiasca stessa. Vengono infine incubate a  $37^{\circ}\text{C}$  per permettere la loro divisione.

Ogni due o tre giorni circa viene effettuato il cambio del terreno che permette di reintrodurre i nutrienti necessari alle cellule per sopravvivere e accrescersi. Nel momento in cui i fibroblasti hanno raggiunto una notevole confluenza è fondamentale dividerli, dunque, da una fiasca T75 dividerli equamente in altre tre T75. Per fare questo, dopo aver rimosso il terreno, vengono fatti uno o due lavaggi con PBS che permette di eliminare i residui di terreno rimasti. Successivamente

vengono utilizzati 1,5 mL di tripsina per staccare i fibroblasti in adesione dalla piastra. L'incubazione della tripsina è di circa 2 minuti, al termine dei quali è necessario inattivare l'enzima per evitare l'eccessiva digestione delle cellule; questo viene fatto aggiungendo del terreno con un volume pari ad almeno il doppio del volume di tripsina utilizzato. Dopo essersi assicurati di aver staccato la maggior parte delle cellule osservando la fiasca al microscopio ottico, queste vengono trasferite in una Falcon per proseguire con la centrifugazione per 10 minuti a 200 x g. Al termine della centrifugazione viene rimosso il terreno e le cellule vengono risospese in nuovo terreno per poi essere trasferite nelle nuove fiasche e incubate a 37°C.

Dalle fiasche dedicate ai Western Blot è necessario prelevare le cellule per congelare a -20°C il pellet secco. Per fare questo le cellule vengono staccate con tripsina, centrifugate per eliminare il terreno e risospese in PBS. Il PBS permette di eliminare completamente il terreno per cui viene effettuata un'altra centrifuga e dopo aver eliminato il surnatante il pellet viene congelato a secco.

### **3.1.2 Conta cellulare**

È fondamentale conoscere la quantità di cellule che si ha a disposizione prima di effettuare gli esperimenti. Per questo motivo viene svolta la conta cellulare sfruttando la camera di *Bürker*. Vengono utilizzati 10 µL di sospensione cellulare insieme a 10 µL di Trypan blue, un colorante selettivo per le cellule morte. Questi vengono entrambi inseriti in una eppendorf al fine di ottenere una miscela omogenea. Con la miscela ottenuta vengono riempiti entrambi i quadranti della camera di Bürker per proseguire con la conta al microscopio ottico.

I risultati ottenuti dalla conta sono i seguenti:

- $2,5 \cdot 10^6$  fibroblasti di paziente ISCA2/mL;
- $0,95 \cdot 10^6$  fibroblasti di controllo/mL.

Le sospensioni cellulari utilizzate per la conta sono inoltre state impiegate per la semina sui pozzetti destinati al TEM. In particolare, sono state seminate 40.000 cellule per pozzetto.

## 3.2 Western Blot

Il Western Blot è una tecnica utilizzata per la rilevazione e la analisi semiquantitativa delle proteine. Consente infatti la separazione e identificazione di una specifica proteina di interesse in una miscela proteica, come ad esempio un lisato cellulare.

### 3.2.1 Lisi cellulare e quantificazione

La lisi cellulare è fondamentale per ricavare l'estratto proteico dalle cellule prima di procedere con l'identificazione della proteina di interesse. Per questo sono stati scongelati i pellet precedentemente congelati a secco a  $-20^{\circ}\text{C}$  e risospesi in buffer di lisi, *RIPA buffer*, con seguente composizione: *50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Na deoxycholate; 0,1% SDS; 1 mM EDTA*. Al buffer di lisi sono inoltre stati aggiunti gli inibitori delle proteasi (*Sigma-Aldrich®*, *complete EDTA-free™*) con una concentrazione finale 1X.

Dopo aver trasferito il pellet risospeso nelle eppendorf corrispondenti queste sono state mantenute in ghiaccio per ridurre ulteriormente l'attività delle proteasi. Il buffer di lisi ha agito per 30 minuti al termine dei quali è stata effettuata una centrifugazione a  $17000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , per 30 minuti.

Le proteine di interesse sono localizzate nel surnatante del quale sono stati ricavati rispettivamente: C1 90  $\mu\text{L}$ , C2 85  $\mu\text{L}$ , C3 85  $\mu\text{L}$ , I1 120  $\mu\text{L}$ , I2 125  $\mu\text{L}$ , I3 120  $\mu\text{L}$ . Per le due differenti linee cellulari, infatti, è stato effettuato un triplicato tecnico C1, C2, C3 dei fibroblasti di controllo e I1, I2, I3 dei fibroblasti di paziente.

Per conoscere la concentrazione proteica nei lisati è stato condotto il *saggio BCA* che permette la quantificazione proteica. Il reattivo BCA rappresenta una soluzione contenente ioni rame  $\text{Cu}^{2+}$  che subiscono una riduzione a  $\text{Cu}^{+}$  in presenza di residui amminoacidici. La soluzione originariamente presentante ioni  $\text{Cu}^{2+}$  si manifesta con una colorazione verde, ma durante il processo di riduzione, cambia la tonalità del colore assumendo una sfumatura viola, la cui intensità si amplifica in proporzione alla quantità di proteine coinvolte nella reazione. Questa particolare caratteristica consente, tramite la valutazione dell'assorbanza, di determinare la concentrazione proteica nella soluzione contenente il reattivo BCA ridotto, il cui massimo di assorbimento è rilevato a 562 nm.

La concentrazione sconosciuta delle proteine si deduce indirettamente attraverso una retta di taratura, ottenuta analizzando i valori di assorbanza del reattivo BCA in soluzioni contenenti diverse concentrazioni graduali note di una proteina di controllo. Nello specifico, in una piastra *multiwell* con novantasei pozzetti a fondo piatto, sono state aggiunte quantità graduali, in duplicato, da 0 a 10  $\mu\text{L}$  di BSA (albumina sierica bovina) a una concentrazione di 2 mg/mL, completando il volume finale a 100  $\mu\text{L}$  con PBS. Parallelamente sono stati preparati altri dodici pozzetti per i lisati, sei per ogni linea cellulare, tenendo conto del duplicato che è stato fatto per ogni lisato. In ciascuno di questi pozzetti sono stati inseriti 2  $\mu\text{L}$  di campione al quale sono stati aggiunti 98  $\mu\text{L}$  di PBS.

Successivamente in ogni pozzetto sono stati introdotti 100  $\mu\text{L}$  di reattivo A+B (*Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit*) in rapporto 50:1. La reazione necessita di circa 30 minuti per avvenire ed inoltre viene effettuata in condizioni di buio in quanto i reagenti sono fotosensibili. Una volta terminata la reazione è stata condotta la lettura dell'assorbanza a 562 nm.

Dalla media dei valori dei due pozzetti registrati per ogni concentrazione è stata ottenuta la retta di taratura, la quale ha permesso di calcolare le concentrazioni proteiche presenti nei lisati di interesse.

La seguente tabella riporta i risultati ottenuti:

<i>Campione</i>	<i>Concentrazione (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</i>
<i>C1</i>	7,865621121
<i>C2</i>	8,634496804
<i>C3</i>	7,504011761
<i>I1</i>	7,85236237
<i>I2</i>	7,81321453
<i>I3</i>	7,796937841

Tabella 1: Concentrazioni proteiche ottenute tramite saggio BCA

### 3.2.2 SDS-PAGE e trasferimento

Una volta preparati i campioni per il Western Blot, si procede con la tecnica dell'SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*), che consiste nella separazione delle proteine dei lisati cellulari all'interno di un gel di poliacrilammide, in base al loro peso molecolare, mediante un campo elettrico.

È stato aggiunto ai lisati un tampone *Laemmli* 4X a pH 6-8, composto da diversi agenti:

- Blu di bromofenolo allo 0.1%, fondamentale come indicatore della corsa elettroforetica;
- Tris HCl a 62.5 mM, un tampone che mantiene il pH dei campioni in un *range* basico;
- SDS al 2%, uno dei principali agenti che denaturano le proteine;
- β-mercaptoetanolo al 5%, un denaturante che rompe i ponti disolfuro tra le proteine;
- Glicerolo al 10%, un triolo che impedisce alle proteine di diffondere dal gel, aumentando la densità del campione proteico acquoso.

Ogni lisato cellulare è stato trattato aggiungendo una quantità di tampone sufficiente per ottenere una concentrazione 1X.

Per la migrazione elettroforetica, è stato utilizzato un gel (*GenScript*) con un gradiente di poliacrilammide 4-20%, ideale per separare proteine di diverso peso molecolare.

Il gel è stato inserito in una cassetta specifica per l'SDS-PAGE riempita con un buffer di corsa SDS Tris-MOPS (*GenScript*). Gli estratti proteici sono stati caricati nei pozzetti centrali e il *ladder* di pesi molecolari di riferimento in due pozzetti esterni del gel.

I volumi da caricare nei pozzetti sono stati calcolati sulla base delle concentrazioni dei lisati, considerando che ogni campione doveva contenere 40 µg di proteine.

La corsa elettroforetica è stata condotta applicando una corrente di 100V per un'ora e mezza. Durante l'elettroforesi, i campioni attraversano due fasi: la fase di *stacking* che ha la funzione di impaccare, comprimere e quindi concentrare i componenti

proteici; e la fase di *running*, in cui avviene la vera e propria separazione sulla base del peso molecolare delle proteine.

Una volta completato l'SDS-PAGE, è stato eseguito il trasferimento "semi-dry", che ha permesso lo spostamento delle proteine dal gel di poliacrilammide ad una membrana di nitrocellulosa (*BIO-RAD Trans-Blot Turbo*) attraverso l'utilizzo di un campo elettrico. Per il trasferimento, sono state preparate due serie di sette membrane di spugna ciascuna, precedentemente inumidite e stese.

Nel frattempo, la membrana di nitrocellulosa è stata immersa nel buffer di trasferimento Transblot Turbo (*100mL Transblot Turbo Transfer Buffer BIO-RAD 1X, 100 mL EtOH al 100% e 30 mL H2O Milli-Q*) e posta sull'agitatore. Il gel di poliacrilammide è stato estratto dal supporto e privato dei pozzetti.

Successivamente, è stato collocato in un contenitore apposito sovrapponendo, in ordine, il primo set di membrane spugnose, la membrana di nitrocellulosa, il gel di poliacrilammide ed il secondo set di membrane. Questo contenitore è stato quindi inserito nel sistema di trasferimento *Trans-Blot® Turbo™ (BIO-RAD)*, che ha applicato una corrente elettrica di 25V per 30 minuti.

Una volta trasferite le proteine sulla membrana di nitrocellulosa questa è stata trattata con Ponceau-red, un colorante rosso utilizzato per individuare rapidamente e reversibilmente la presenza delle proteine trasferite. Questo ha permesso dunque di verificare con certezza il corretto trasferimento delle proteine prima di procedere con ulteriori analisi. Successivamente, la membrana è stata decolorata immergendola in TBS 1X per 10 minuti.

È stata infine saturata con 20 mL di soluzione TBS 1X al 10% di latte; questo passaggio ha permesso il blocco dei siti aspecifici di legame degli anticorpi. Questo consente agli anticorpi di legarsi solo alle proteine di interesse e non in maniera casuale alla superficie della membrana.

### 3.2.3 Saggio immunologico e chemiluminescenza

A questo punto la membrana di nitrocellulosa viene posta all'interno di una Falcon da 50 mL e sottoposta ad un lavaggio con 5 mL di soluzione di TTBS 1X. In questo modo la membrana viene preparata all'interazione con l'anticorpo primario specifico per il riconoscimento della proteina d'interesse. La membrana viene così lasciata in agitazione a 4°C *overnight* con l'anticorpo primario. Il giorno seguente l'anticorpo primario viene rimosso e la membrana viene nuovamente sottoposta a diversi cicli di lavaggio con 5 mL di TTBS al fine di eliminare i residui di anticorpo primario e preparare la nitrocellulosa ad una nuova incubazione con l'anticorpo secondario coniugato all'enzima perossidasi di rafano (*Horse-radish peroxidase, HRP*). Questa incubazione ha una durata di un'ora al termine della quale, dopo aver rimosso l'anticorpo secondario, vengono eseguiti ulteriori cicli di lavaggio con 5 mL di TTBS.

Per ciascuna proteina è stata eseguita la diluizione dell'anticorpo associato in soluzione TTBS 1X seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Nel dettaglio, gli anticorpi utilizzati e le relative informazioni sono illustrati nella *Tabella 2*.

Nel caso specifico sono state utilizzate un totale di quattro membrane di nitrocellulosa, ogni membrana dunque è stata incubata e sviluppata in giorni differenti con anticorpi differenti. È necessario adottare una precauzione fondamentale quando si identificano proteine con peso molecolare simile; una membrana incubata con degli anticorpi che riconoscono proteine aventi peso molecolare analogo causerebbe infatti dei problemi di sovrapposizione del segnale. Per evitare questo, dunque per poter riutilizzare la membrana, viene effettuato un processo di *stripping* che permette di rimuovere gli anticorpi legati alla membrana, sia primari che secondari, per reincubarla con un nuovo anticorpo. La soluzione di *stripping* consiste in: *glicina 25 mM, SDS 1%, pH 5*; per un totale di 5 mL. Le tempistiche variano in base al contesto dell'esperimento, in questo caso le membrane sono state lasciate in soluzione per 10 minuti in agitatore.

In seguito, è fondamentale svolgere dei lavaggi con TBS per poi saturare nuovamente la membrana con soluzione TBS 1X al 10% di latte. Questo passaggio permette di bloccare nuovamente i siti aspecifici di legame che erano stati rimossi

durante lo *stripping*. A questo punto la membrana di nitrocellulosa è pronta per lo sviluppo del risultato finale attraverso il *ChemiDoc<sup>TM</sup> MP Imaging System*.

La chemiluminescenza rappresenta un processo biochimico che comporta la produzione di luce attraverso l'interazione di due componenti reattive, come un enzima attivo e il suo substrato. Mediante il legame dell'enzima all'anticorpo secondario, viene rilevata la presenza dell'anticorpo primario in un campione biologico. Quest'ultimo è vincolato, a sua volta, a una proteina specifica che si intende identificare.

L'aggiunta del substrato al sistema provoca l'avvio della reazione enzimatica, dando luogo all'emissione di un segnale luminoso osservabile. Questa tecnica costituisce dunque la base per individuare una proteina specifica tra tutte le altre presenti nel pannello ottenuto tramite SDS-PAGE.

Perciò, l'ultimo passaggio comportava l'impiego del sistema di imaging *ChemiDoc<sup>TM</sup> MP* per la rivelazione della nitrocellulosa. Affinché le bande relative alla proteina specifica diventassero visibili, è stato diffuso uniformemente sulla membrana il reattivo ECL, un substrato per la perossidasi. Di conseguenza, utilizzando l'apparecchiatura, sono state acquisite le immagini della luminescenza chimica emessa dalle bande proteiche di interesse nei campioni di lisati.

Una volta ottenute le immagini rappresentanti le bande proteiche, queste sono state analizzate tramite due differenti software che hanno permesso rispettivamente un'analisi di tipo semiquantitativo e un'analisi di tipo statistico. In primo luogo, per poter calcolare la quantità di proteine presenti sulle bande è stato impiegato il programma *ImageJ* che ha trasformato le bande visualizzate in funzioni matematiche, le quali aree rappresentavano le quantità proteiche.

Successivamente sono state svolte le analisi statistiche mediante l'utilizzo del programma *GraphPad Prism* che ha permesso la costruzione di istogrammi rappresentativi delle percentuali proteiche presenti nei due gruppi differenti di dati.

<i>Anticorpo</i>	<i>Fornitore</i>	<i>Condizioni d'uso</i>
$\alpha'$ -ISCU	LSBio; LS-C157839	1:1000 in TTBS1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -NFS1	Santa Cruz; SC-365308	1:500 in TTBS 1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -NDUFS1	Santa Cruz; SC-271510	1:500 in TTBS 1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -SDHB	Santa Cruz; SC-59688	1:500 in TTBS 1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -UQCRFS1	Santa Cruz; SC-271609	1:500 in TTBS 1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -FECH	Santa Cruz; SC-377377	1:500 in TTBS 1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -ACO2	Invitrogen; MA1-029	1:1000 in TTBS1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -VINC	Sigma-Aldrich; V-9264	1:1000 in TTBS 1X - O/N, 4°C
$\alpha'$ -CS	Invitrogen; MA5-17264	1:1000 in TTBS 1X - O/N, 4°C
$\alpha''$ -mouse peroxidase	Sigma-Aldrich; A-4416	1:10 000 in TTBS IX - 1h, RT
$\alpha''$ -rabbit peroxidase	Sigma-Aldrich; A-0545	1:20 000 in TTBS 1X - 1h, RT

Tabella 2: Anticorpi utilizzati, fornitori e condizioni d'uso

### 3.3 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Nel microscopio elettronico a trasmissione (TEM) la fonte di illuminazione è un filamento o catodo che emette elettroni dall'alto di una colonna cilindrica alta circa due metri. Gli elettroni sono quindi accelerati sul filamento da un anodo nelle vicinanze e fatti passare attraverso un minuscolo forellino per formare un fascio di elettroni che viaggia lungo la colonna. Avvolgimenti magnetici posti a intervalli lungo la colonna mettono a fuoco il fascio di elettroni. Il campione è posto nel vuoto, attraverso un portello a tenuta stagna, sul percorso del fascio di elettroni. Il campione è in genere colorato con materiale denso agli elettroni. Alcuni degli

elettroni che passano attraverso il campione sono dispersi da strutture colorate con il materiale denso agli elettroni; il rimanente è messo a fuoco e forma un'immagine. L'immagine può essere osservata su uno schermo fosforescente o registrata con una macchina fotografica ad alta risoluzione. Poiché gli elettroni dispersi sono perduti dal fascio, le regioni dense del campione appaiono nell'immagine come aree di ridotto flusso elettronico e sono scure.

Poiché nel microscopio elettronico il campione è esposto a un vuoto molto spinto, i tessuti vivi sono di solito uccisi e preservati per fissazione: prima con glutaraldeide, che unisce covalentemente le molecole proteiche a quelle vicine, quindi con tetrossido di osmio, che si lega, stabilizzandoli, ai doppi strati lipidici oltre che alle proteine.

Poiché gli elettroni hanno un potere penetrante molto limitato, i tessuti fissati devono essere tagliati normalmente in sezioni estremamente sottili prima di essere osservati. Queste sezioni sottili, prive di acqua e di altri solventi volatili, sono poste su un piccolo retino metallico circolare per l'osservazione nel microscopio. [7]

Nel caso specifico è stata utilizzata una piastra da 24 pozzetti a fondo piatto in cui sono state seminate 40 000 cellule in ogni pozzetto utilizzato. Sono state seminate cellule sospese in terreno ad alto glucosio ma anche cellule in terreno a basso glucosio. Nel dettaglio quindi per ognuna delle linee cellulari, di paziente ISCA2 e di controllo, sono stati preparati un totale di sei pozzetti, di cui tre con terreno HG (*high glucose*) e tre con terreno LG (*low glucose*) in modo tale da ottenere anche un triplicato tecnico.

Tutti gli esperimenti precedentemente svolti sono stati fatti in terreno HG. La scelta di utilizzare anche un terreno LG in questo esperimento è stata fatta per verificare eventuali cambiamenti nei risultati.

La fissazione delle cellule e la successiva analisi al TEM sono state condotte in collaborazione con l'*Imaging Facility* del dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova.

## 4 Capitolo 3: Risultati e Discussione

Il seguente capitolo si concentra sulla presentazione delle proteine studiate utilizzando la tecnica del Western Blot, fornendo un'analisi dei risultati ottenuti e le conclusioni che possono essere tratte da essi. La discussione dei risultati ottenuti si basa sull'analisi delle bande rilevate e sulla loro intensità relativa. Attraverso confronti tra campioni di controllo e di paziente, è stato possibile determinare l'espressione differenziale delle proteine.

Inoltre, vengono mostrate le immagini ottenute dalla microscopia elettronica a trasmissione (TEM) al fine di valutare la morfologia dei mitocondri di fibroblasti di paziente.

### 4.1 Western Blot

L'analisi del Western Blot, come già discusso nel precedente capitolo, riguarda in primis la quantificazione delle diverse bande, che viene fatta in relazione a dei normalizzatori.

I normalizzatori sono delle proteine di riferimento che non vengono influenzate nella loro quantità dalle possibili alterazioni presenti nelle cellule del paziente, ma sono sempre prodotte fisiologicamente.

Nel caso specifico sono stati utilizzati come normalizzatori:

- Vinculina: proteina citoscheletrica utilizzata per confrontare la quantità proteica con la massa cellulare.
- Citrato sintasi: enzima coinvolto nella prima reazione del ciclo di Krebs, esso catalizza infatti la condensazione dell'ossalacetato con acetil-CoA, ad ottenere citrato. Essendo una proteina mitocondriale viene utilizzata per confrontare la quantità proteica con la massa mitocondriale.

I normalizzatori, dunque, in particolar modo la citrato sintasi, permettono di comprendere se la riduzione della proteina nelle cellule di paziente è effettiva, oppure se rappresenta un artefatto dovuto ad un numero minore di mitocondri presente nelle cellule che si rispecchia in una minore quantità proteica, o ad una procedura di caricamento delle proteine nel gel non rigorosa.

Per l'analisi di Western Blot sono state selezionate una serie di proteine con funzioni differenti nel contesto del mitocondrio:

- Aconitasi 2 (ACO2): enzima essenziale nel ciclo di Krebs, converte l'acido citrico in acido isocitrico. È costituito da una singola catena proteica avvolta a formare più domini, i quali si stringono attorno al sito attivo che contiene un complesso ferro-zolfo, in particolare ACO2 contiene un centro [4Fe-4S].
- FECH: ferrochelatasi, catalizza l'inserimento del ferro ferroso nella protoporfirina IX nella via di sintesi dell'eme.
- NDUFS1: subunità facente parte del complesso I della catena respiratoria, trasferisce gli elettroni dal NADH alla catena respiratoria. Il complesso I presenta un totale di otto centri ferro-zolfo, di cui due [2Fe-2S] e sei [4Fe-4S].
- SDHB: subunità facente parte del complesso II della catena respiratoria, presenta tre centri ferro-zolfo, uno di ciascun tipo.
- UQCRC1: subunità facente parte del complesso III della catena respiratoria, subunità del nucleo catalitico contenente un centro [2Fe-2S].
- ISCU: enzima di assemblaggio di centri ferro-zolfo, fornisce l'architettura strutturale su cui sono assemblati i centri [2Fe-2S].
- NFS1: cisteina desulfurasi, catalizza la desulfurazione della L-cisteina in L-alanina e partecipa all'assemblaggio dei centri [2Fe-2S] sulla proteina di impalcatura ISCU.

In seguito, vengono raffigurate le immagini rappresentative dei Western Blots svolti. Dal momento che per ogni campione è stato fatto un triplicato tecnico (n=3), sono state selezionate le due bande, rispettivamente controllo e paziente, più rappresentative del Blot stesso. Per quanto riguarda invece le membrane che sono state strippate, per le diverse proteine sono state selezionate coppie di bande differenti. Ognuna delle proteine successivamente rappresentate viene confrontata con vinculina e citrato sintasi, i due normalizzatori utilizzati.

Inoltre, sono mostrati i rispettivi istogrammi creati dal software *GraphPad Prism* e la determinazione della significatività statistica è basata sul *t-test*: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$  rispetto al controllo.

Vengono presentate innanzitutto le proteine contenenti centri ferro-zolfo come Aconitasi 2 e FECH, seguite da tre diverse subunità presenti nei tre complessi della catena respiratoria, rispettivamente NDUFS1, SDHB e UQCRFS1, ed infine vengono prese in considerazione due proteine con attività nella prima fase di biosintesi dei centri ferro-zolfo e prive di centri ferro-zolfo al loro interno come ISCU e NFS1.

#### 4.1.1 Aconitasi 2

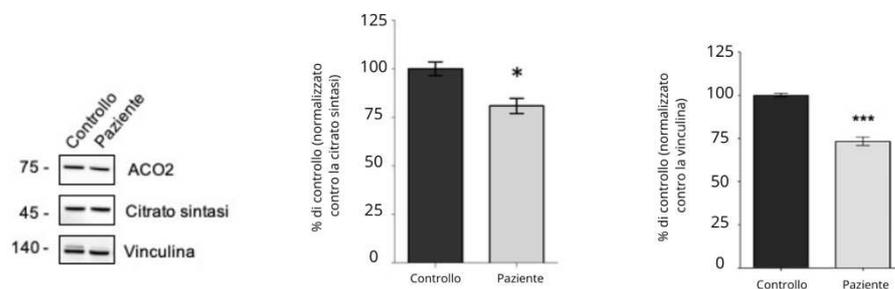


Figura 3: Western Blot e Istogramma ACO2

Una prima osservazione delle bande permette di avere un'intuizione su quanto viene riscontrato nell'istogramma. L'enzima Aconitasi 2, dalle analisi svolte, risulta essere ridotto nelle cellule di paziente rispetto a quelle di controllo, in particolare con una significatività del 5% utilizzando come normalizzatore la citrato sintasi. Nel secondo istogramma invece, dove è stata utilizzata la vinculina come normalizzatore, la significatività risulta essere dello 0,1% dunque la soglia è ancora più stringente.

Partendo dal presupposto che la proteina ISCA2 è coinvolta nella terza fase del processo di biogenesi dei centri ferro-zolfo, ovvero la sintesi di un centro [4Fe-4S] a partire da un centro [2Fe-2S], può essere ragionevole che una mutazione sul gene che codifica per la proteina ISCA2 abbia delle conseguenze impattanti anche su determinate proteine contenenti centri [4Fe-4S], come Aconitasi 2, in cui il centro svolge un ruolo importante nella sua funzione catalitica.

I risultati ottenuti sono conformi a quanto descritto in letteratura. Studi precedenti hanno permesso infatti di comprendere che GLRX5 funge da donatore iniziale di centri per la maturazione delle proteine mitocondriali [4Fe-4S]. Tuttavia, il traffico

di centri da GLRX5 e la conversione in forme [4Fe-4S] richiedono essenzialmente la presenza simultanea di tre componenti ISC, ISCA1, ISCA2 e IBA57. [8]

#### 4.1.2 FECH

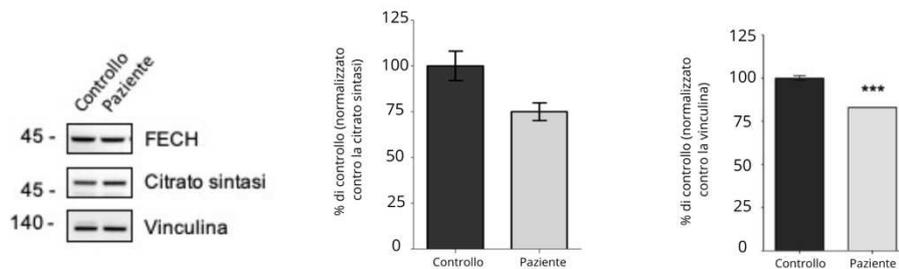


Figura 4: Western Blot e Istogramma FECH

L'enzima FECH, ferrochelatasi contiene al suo interno un centro [2Fe-2S]. Da una prima osservazione delle bande non risulta così evidente una riduzione della proteina FECH, ferrochelatasi, delle cellule di paziente rispetto a quelle di controllo. L'analisi statistica ha invece permesso di identificare una certa riduzione della proteina stessa, sebbene non significativa nell'istogramma in cui è stata utilizzata la citrato sintasi come normalizzatore. Nel secondo istogramma invece, in cui è stata utilizzata la vinculina come normalizzatore, la riduzione è pressoché la stessa, ciò che risulta differente è la deviazione che è molto piccola. Verosimilmente questo ha permesso di stabilire una significatività dello 0,1%.

#### 4.1.3 NDUFS1

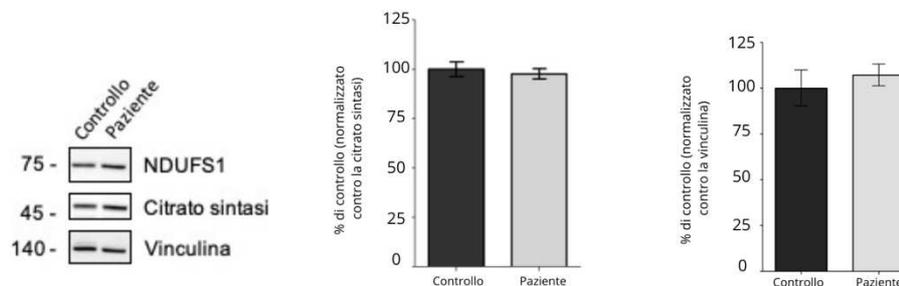


Figura 5: Western Blot e Istogramma NDUFS1

La proteina presa in considerazione è NDUFS1 ovvero una subunità del complesso I della catena respiratoria. È stata scelta tra le proteine da analizzare in quanto presenta una struttura interessante, NDUFS1 infatti contiene diversi centri ferro-zolfo, in particolare è caratterizzata da due centri [4Fe-4S] e da un centro [2Fe-2S]. I risultati mostrano come la proteina NDUFS1 non sia ridotta nei mitocondri delle cellule di paziente rispetto ai mitocondri delle cellule di controllo.

Una possibile spiegazione è che la proteina non risenta di questa alterazione, dunque non sembra essere compromessa in modo rilevante.

#### 4.1.4 SDHB

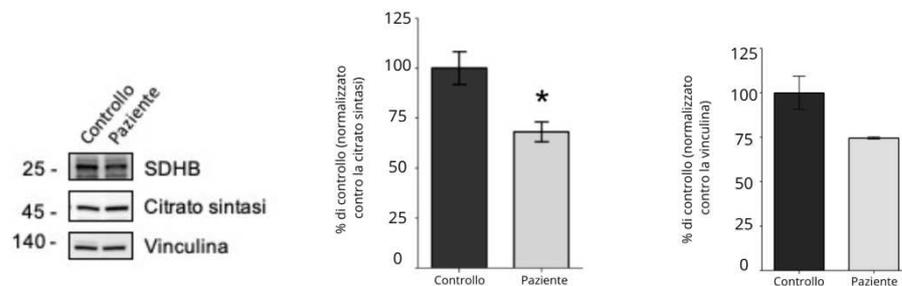


Figura 6: Western Blot e Istogramma SDHB

SDHB rappresenta una subunità del complesso II della catena respiratoria. Anch'essa, come NDUFS1 presenta diversi centri ferro-zolfo, in particolare è caratterizzata da un centro [4Fe-4S], uno [3Fe-3S] e un [2Fe-2S].

Dai risultati è possibile osservare che la proteina SDHB risulta ridotta nei mitocondri delle cellule di paziente rispetto ai mitocondri delle cellule di controllo, dunque, la mancanza di centri ferro-zolfo o la loro alterazione, va a destabilizzare la subunità che di fatto è dunque maggiormente suscettibile rispetto invece a NDUFS1.

### 4.1.5 UQCRFS1

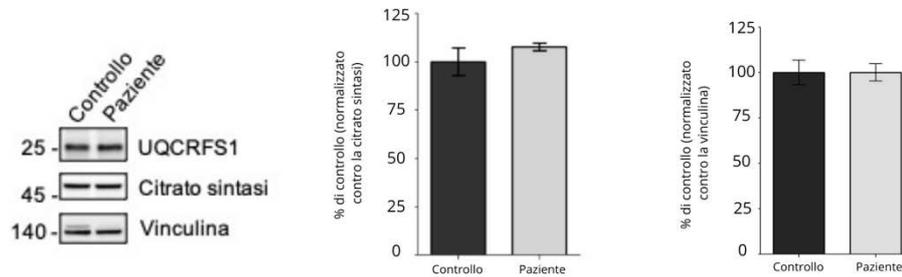


Figura 7: Western Blot e Istogramma UQCRFS1

È stata svolta l'analisi prendendo in considerazione anche una subunità del complesso III della catena respiratoria, ovvero la proteina UQCRFS1, contenente un centro [2Fe-2S].

Dall'analisi dei risultati si osserva che la proteina UQCRFS1 non è ridotta nei mitocondri di cellule di paziente rispetto ai mitocondri di cellule di controllo.

Considerando la funzione di ISCA2 ed il suo coinvolgimento nella formazione dei centri [4Fe-4S] risulta plausibile che una mutazione nel gene che codifica per ISCA2 non abbia delle conseguenze sulla proteina UQCRFS1 contenente un centro [2Fe-2S].

### 4.1.6 ISCU

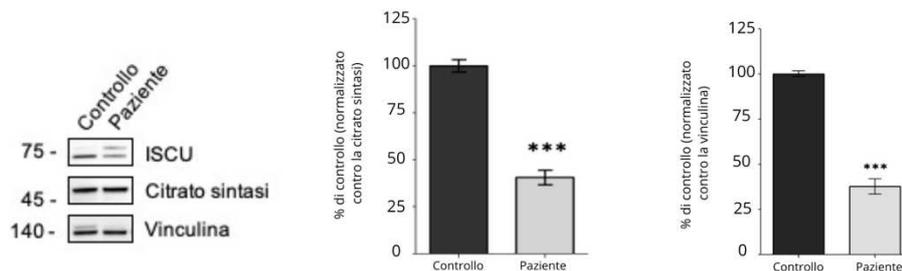


Figura 8: Western Blot e Istogramma ISCU

La proteina ISCU svolge una funzione di impalcatura molecolare per la formazione dei centri ferro-zolfo; in particolare ISCU interviene nella prima fase del processo di biogenesi. Questa proteina non contiene centri ferro-zolfo al suo interno per cui il

fatto che dalle analisi risulta significativamente ridotta nei mitocondri di fibroblasti di paziente non è facilmente esplicabile.

#### 4.1.7 NFS1

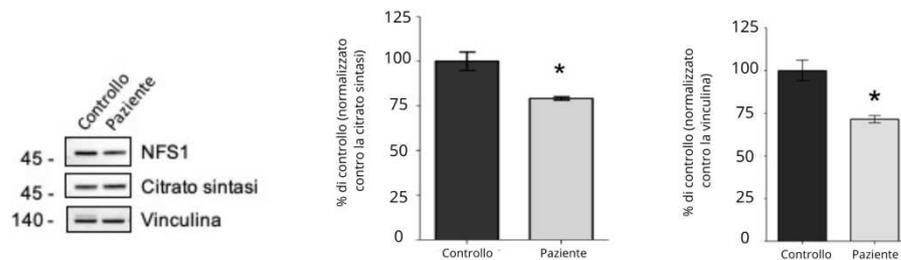


Figura 9: Western Blot e Istogramma NFS1

La proteina NFS1 è coinvolta nella fase iniziale del processo di biogenesi dei centri ferro-zolfo, e agisce come una desulfurasi. Il suo ruolo chiave è quello di catalizzare la rimozione degli atomi di zolfo dai precursori dei centri ferro-zolfo.

NFS1, come ISCU, non contiene centri ferro-zolfo al suo interno per cui, anche in questo caso, risulta complessa la spiegazione di una significativa riduzione della proteina stessa nei mitocondri di fibroblasti di paziente.

#### 4.1.8 Discussione generale dei risultati ottenuti tramite Western Blot

Generalmente, in tutte le proteine analizzate, gli istogrammi in cui la proteina viene normalizzata contro la vinculina e quelli in cui viene normalizzata contro la citrato sintasi, risultano avere un andamento molto simile.

Si nota tuttavia una maggiore significatività nella riduzione laddove la proteina di interesse viene normalizzata contro la vinculina. Ciò è spiegabile in quanto la vinculina rappresenta un normalizzatore cellulare e non mitocondriale, come invece la citrato sintasi. La citrato sintasi dunque tiene in considerazione la quantità di mitocondri presenti nelle cellule.

Inoltre, dal momento che ISCA2 interviene nella formazione dei centri [4Fe-4S] nel processo di biogenesi dei cluster ferro-zolfo, non ci si aspetta che ci siano delle ripercussioni in proteine coinvolte nella prima fase della via di biosintesi. Tuttavia,

sono state riscontrate delle riduzioni sia di ISCU, sia di NFS1. Questo può essere indice del fatto che ci siano delle anomalie a monte.

Seppure non significativa, la riduzione della proteina FECH, contenente un centro [2Fe-2S], può infatti essere giustificata in maniera indiretta dalla alterazione di ISCU e NFS1.

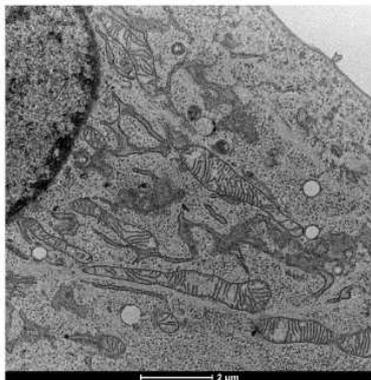
## **4.2 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

L'analisi svolta al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) in collaborazione con l'*Imaging Facility* del dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova, ha permesso di fare una valutazione morfologica dei mitocondri delle due diverse linee cellulari, ISCA2 e controllo.

Dalle immagini della *figura 10* è possibile notare, per quanto riguarda i mitocondri di cellule di controllo, una certa eterogeneità sia nella morfologia degli stessi, sia nel numero di creste mitocondriali e nel numero di giunzioni che esse possiedono. In particolare, è possibile osservare questa varietà nell'ultima delle quattro immagini raffigurate, in cui viene riscontrato un certo numero di mitocondri. Per quanto riguarda invece i mitocondri di cellule ISCA2, non è possibile denotare differenze sostanziali rispetto ai mitocondri di cellule di controllo. Tuttavia, si nota una generale ridotta densità di creste mitocondriali. Vengono infatti riscontrati una serie di mitocondri che presentano al loro interno delle regioni vuote prive di creste mitocondriali. Sebbene questa caratteristica non sia univoca per tutti i mitocondri ISCA2, rappresenta una differenza morfologica con i mitocondri di cellule di controllo.

In sintesi, è dunque possibile affermare non esserci delle differenze sostanziali tra la morfologia dei mitocondri di cellule di controllo e mitocondri di cellule ISCA2, si può però evidenziare una generale riduzione della densità di creste mitocondriali.

CTRL



ISCA2

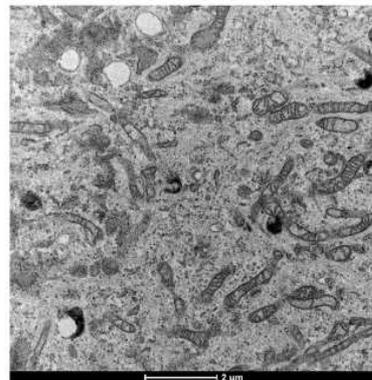
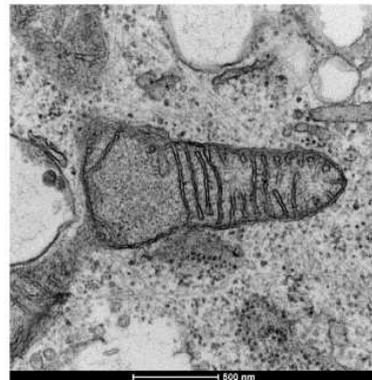


Figura 10: Immagini al TEM di mitocondri di cellule di controllo e ISCA2

### **4.3 Progetti futuri e conclusioni**

Durante il periodo di tirocinio presso il laboratorio della professoressa Paola Costantini, sono state svolte delle analisi preliminari utilizzando cellule di paziente ISCA2.

I risultati ottenuti hanno consentito una caratterizzazione preliminare del fenotipo biochimico di cellule con mutazione nella proteina ISCA2. In particolare, sono state riscontrate delle variazioni nell'espressione di alcune proteine con ruoli differenti all'interno del mitocondrio ed inoltre sono state osservate alcune differenze nella morfologia dei mitocondri di cellule di paziente rispetto a mitocondri di cellule di controllo.

È in programma una serie di altri esperimenti con lo scopo di approfondire la funzione di ISCA2 e quali conseguenze possa avere una mutazione nel gene che codifica per la proteina stessa.

## 5 Bibliografia

- [1] Seven-A.Freibert e L. Roland , «Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis,» *Annual Review of Biochemistry*, vol. 89, pp. 471-499, 2020.
- [2] A. Selvanathana e B. P. Sankaran, «Mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis and neurological disorders,» *Mitochondrion*, vol. 62, pp. 41-49, 2022.
- [3] J. T. Alaimo, A. Besse, C. L. Alston , K. Pang , V. Appadurai, M. Samanta, P. Smpokou, R. McFarland, R. W. Taylor e P. E. Bonnen, «Loss-of-function mutations in ISCA2 disrupt 4Fe-4S cluser machinery and cause a fatal leukodystrophy with hyperglycinemia and mtDNA depletion,» *Human Mutation*, vol. 39, n. 4, pp. 537-549, 2018.
- [4] M. Alfadhel, MD, MHSc e FCCMG, «Multiple Mitochondrial Dysfunctions Syndrome 4 Due to ISCA2 Gene Defects: A Review,» *Child Neurology Open*, vol. 6, pp. 1-4, 2019.
- [5] V. Nasta, S. Da Vela, S. Gourdoupis, S. Ciofi-Baffoni, D. I. Svergun e L. Banci, «Structural properties of [2Fe-2S] ISCA2-IBA57: a complex of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery,» *Scientific Reports* , vol. 9, n. 1, p. 18986, 2019.
- [6] E. Lebigot, M. Schiff e M.-P. Golinelli-Cohen, «A Review of Multiple Mitochondrial Dysfunction Syndromes, Syndromes Associated with Defective Fe-S Protein Maturation,» *Biomedicines*, vol. 9, n. 8, p. 989, 2021.
- [7] B. Alberts , A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts e P. Walter, in *Biologia molecolare della cellula*, Zanichelli, 2016, pp. 466-596.
- [8] B. D. Weiler, M.-C. Bruck, I. Kothe, E. Bill, R. Lill e U. Muhlenhoff, «Mitochondrial [4Fe-4S] protein assembly involves reductive [2Fe-2S] cluster fusion on ISCA1-ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2,» vol. 117, n. 34, pp. 20555-20565, 2020.