



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO IF5A-DHS: UN
POSSIBILE TARGET TERAPEUTICO**

**CHARACTERIZATION OF THE IF5A-DHS COMPLEX: A
POSSIBLE THERAPEUTIC TARGET**

Tesi di Laurea Magistrale

Relatore

di:

Chiar.mo Prof.

Francesco Mercante

Anna La Teana

Sessione **ESTIVA**

Anno Accademico **2020/2021**

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Il fattore di traduzione eIF5A	6
1.1.1 Scoperta.....	6
1.1.2 Struttura	6
1.1.3 Funzione	8
1.1.4 L'ipusinazione del residuo di lisina.	9
1.2 Deossi-ipusina sintasi umana (DHS).....	11
1.2.1 Struttura	11
1.2.2 Interazione tra DHS e eIF5A.....	12
1.2.3 GC7 come inibitore del complesso tra DHS e eIF5A.....	12
1.3 Il legame evolutivo tra Archaea ed Eukarya.	14
1.3.1 Sulfolobus solfataricus, organismo modello di studio	16
1.3.2 Caratteristiche strutturali e funzionali di aIF5A	17
2. SCOPO DEL LAVORO	19
3. MATERIALI E METODI.....	21
3.2 Espressione e purificazione di aIF5A.....	24
3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide.....	24
3.4 Western Blot.....	26
3.5 Elettroforesi in gel nativo	27
3.6 Cromatografia HPLC	28
3.7 Thermal shift assay.....	30
4. RISULTATI.....	32

<i>4.1 Purificazione di aDHS e aIF54 in E.coli</i>	32
<i>4.2 Analisi del complesso aIF54 e aDHS</i>	34
<i>4.3 Cromatografia liquida ad altre prestazioni per lo studio del complesso</i>	37
<i>4.4 Studio della denaturazione del complesso</i>	43
<i>4.5 Purificazione del complesso</i>	44
5. DISCUSSIONE	47
6. PROSPETTIVE FUTURE	49
7. BIBLIOGRAFIA	51

Capitolo Uno

1. INTRODUZIONE

La sintesi proteica rappresenta il complesso processo con cui i geni vengono convertiti in proteine, macromolecole indispensabili per il funzionamento di ogni cellula. In particolare, è di fondamentale importanza la tappa mediante cui l'informazione genetica, contenuta nell'mRNA, si traduce in una sequenza amminoacidica. Questo evento prende il nome di traduzione e si basa sull'universalità del codice genetico. Ciò che la cellula è in grado di leggere sono i codoni, ovvero specifiche triplette di nucleotidi alle quali viene associato un amminoacido. La sequenza amminoacidica nel suo insieme forma la struttura primaria di una proteina, fondamentale per la determinazione della sua conformazione tridimensionale finale [1].

Generalmente la sintesi proteica è divisa in tre fasi: inizio, allungamento, terminazione. Questo primo evento consiste nell'assemblaggio dell'apparato di traduzione costituito dal ribosoma, dall'amminoacil-tRNA e dal mRNA.

Inoltre per migliorare l'efficienza, il processo richiede fattori traduzionali, ovvero proteine specifiche per ogni tappa della traduzione. La subunità minore lega l'mRNA a livello dell'estremità 5' scorrendo lungo la molecola fino al riconoscimento del codone di inizio AUG. Ciò permette il distacco di alcuni fattori di traduzione e l'associazione con la subunità maggiore. A

questo punto avviene la fase di allungamento in cui si assiste alla formazione di legame peptidici tra i vari amminoacidi trasportati sul complesso dagli RNA transfer che si legano per complementarità ad un codone presente sull'mRNA. La sintesi proteica prosegue fino all'arrivo di un codone di stop, ovvero un codone che mette fine al processo di traduzione. A questo sito si legano infatti particolari fattori, i fattori di rilascio, che catalizzano il distacco della catena polipeptidica dal tRNA. Le due subunità ribosomiali vengono invece dissociate ed utilizzate per una nuova traduzione. Ad oggi, data la crescente necessità di produzione di proteine a livello industriale, l'ingegneria genetica offre tecniche che permettono di soddisfare tale scopo, come quella del DNA ricombinante che permette d'isolare un gene dall'organismo che lo possiede attraverso endonucleasi di restrizione e inserirlo in un ospite spesso di una specie diversa. Inoltre, è possibile sostituire la sequenza di DNA che precede un gene, chiamata promotore. Il promotore porta questo nome in quanto in grado di favorire il posizionamento della RNA polimerasi e di conseguenza la trascrizione del gene che lo segue, può essere reso inducibile andando quindi a regolare l'espressione proteica. Il trasferimento delle molecole di DNA ricombinante può avvenire mediante trasformazione o trasduzione, processi che avvengono anche in natura, o con nuove tecniche come l'elettroporazione e il trasferimento meccanico di particelle. Fermo

restando la compatibilità del vettore con l'organismo in cui è stato inserito, si otterrà la sua replicazione e quella del gene isolato in più copie contestualmente al processo di divisione cellulare.

1.1 Il fattore di traduzione eIF5A

1.1.1 Scoperta

Il fattore di inizio della traduzione eucariotica 5A è stato scoperto a metà degli anni '70 come proteina che stimola la sintesi della catena polipeptidica su uno stampo di RNA poliuridinico. L'eIF5A dei mammiferi è una piccola proteina acida (16,7kDa) con un alto livello di espressione in cellule di diversi tipi. Sono note due isoforme di questo fattore, eIF5A1 e eIF5A2, che sono codificate da geni diversi. Inoltre, ha un omologo negli Archaea (aIF5A) e un ortologo nei procarioti (EF-P). [2]

1.1.2 Struttura

La proteina è formata da due domini ovvero l'N terminale caratterizzato da 6 β -strand, che vanno a ripiegarsi in una parziale struttura a β -barile, mentre il dominio C-terminale è formato da 5 β -strand e 2 α -eliche. Il residuo di lisina in posizione 50 (Lys50) nella regione N-terminale è altamente conservato ed è protagonista della modifica post-traduzione di l'ipusinazione [3]. Il residuo è localizzato tra gli strand β 3 e β 4. Uno studio effettuato sul fattore eucariotico 5A [4,5] ha permesso di affermare che la proteina esiste come

dimero sia con il residuo di ipusina che in sua assenza. Grazie a degli studi effettuati con la cristallografia a raggi X, ottenendo una buona risoluzione, è stato possibile rivelare come la proteina interagisca con il ribosoma e quale sito si leghi. 5A si lega al ribosoma 80S (figura 1) nel sito P e interagisce con la proteina L1-stalk e l'elica H69 dell'rRNA 25S appartenenti alla subunità maggiore.[4]

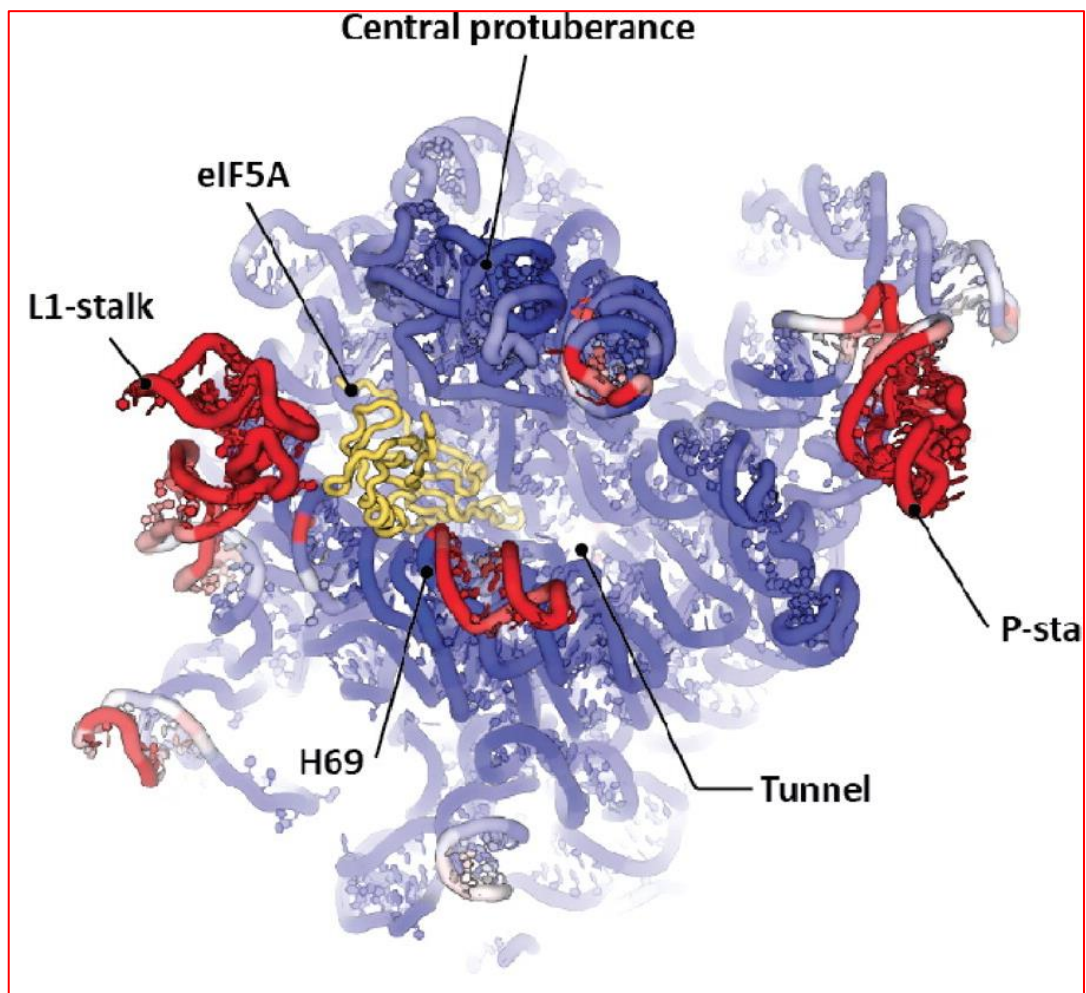


Figura 1. Struttura del fattore eucariotico eIF5A. In Rosso i siti del ribosoma con cui interagisce.[4]

1.1.3 Funzione

Contrariamente al nome convenzionale, la funzione principale di eIF5A è l'allungamento delle catene polipeptidiche [6]. L'ipotesi sul coinvolgimento di eIF5A nell'inizio della traduzione si basava sulla sintesi di metionil puromicina [2]. Questa reazione riproduce la formazione del primo legame peptidico ma non corrisponde pienamente a veri processi intracellulari. eIF5A non influenza l'assemblaggio delle subunità ribosomiali e si lega al complesso 80S già formato ($K_d = 9\text{nm}$). In particolare, la proteina è coinvolta nella traduzione di segmenti di poli-proline che possono, data la loro struttura tridimensionale bloccare i ribosomi. eIF5A, quindi, favorisce il recupero dei ribosomi impegnati nella traduzione di questi polipeptidi [6]. Inoltre, eIF5A è coinvolto nella terminazione della sintesi proteica studiata nelle cellule di lievito, che si manifesta nella stimolazione dell'idrolisi del peptidil tRNA catalizzata dai fattori di terminazione eRF1 ed eRF3 (figura 2). Il ruolo di terminazione della traduzione negli eucarioti superiori non è stato ancora approfondito. Inoltre, diverse ricerche indicano che eIF5A è coinvolto in processi che non sono direttamente correlati alla sintesi proteica, come il trasporto di mRNA appena generati dal nucleo al citoplasma e proteine attraverso le membrane del reticolo endoplasmatico [5,6]

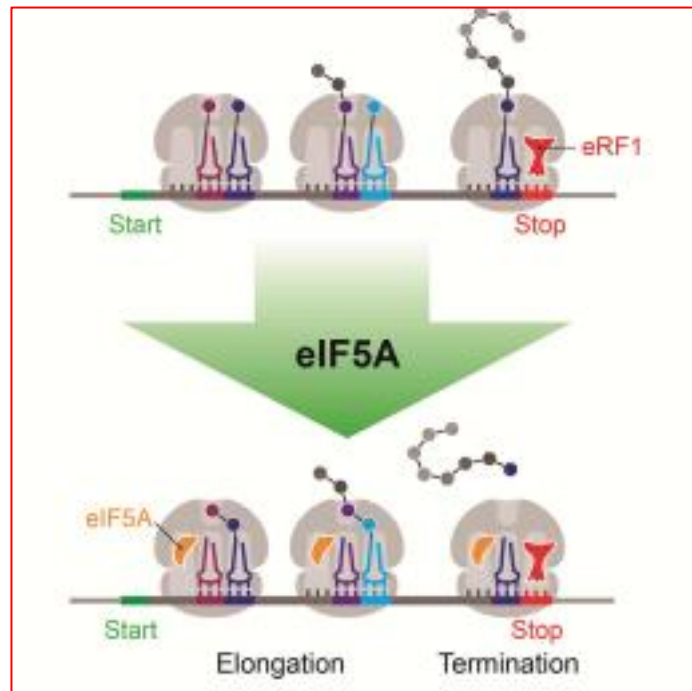


Figura 2. eIF5A nelle cellule di lievito è coinvolto nella terminazione della sintesi proteica.[3]

1.1.4. L'ipusinazione del residuo di lisina.

Il fattore di iniziazione eucariotico 5A viene attivato attraverso una modifica post-traduzionale del residuo di lisina in posizione 50, ovvero l'ipusinazione. L'attivazione avviene in due fasi: il primo enzima, la deossipusina sintasi (DHS), catalizza la scissione NAD dipendente della spermidina e il trasferimento della sua frazione 4-amminobutile a uno specifico residuo di lisina in eIF5A per formare il residuo deossi-ipusina. La seconda reazione enzimatica è mediata dall'enzima deossi-ipusina idrossilasi (DOOH) che idrossila questo intermedio per formare il residuo di ipusina e maturare eIF5A(figura3) [7,8].

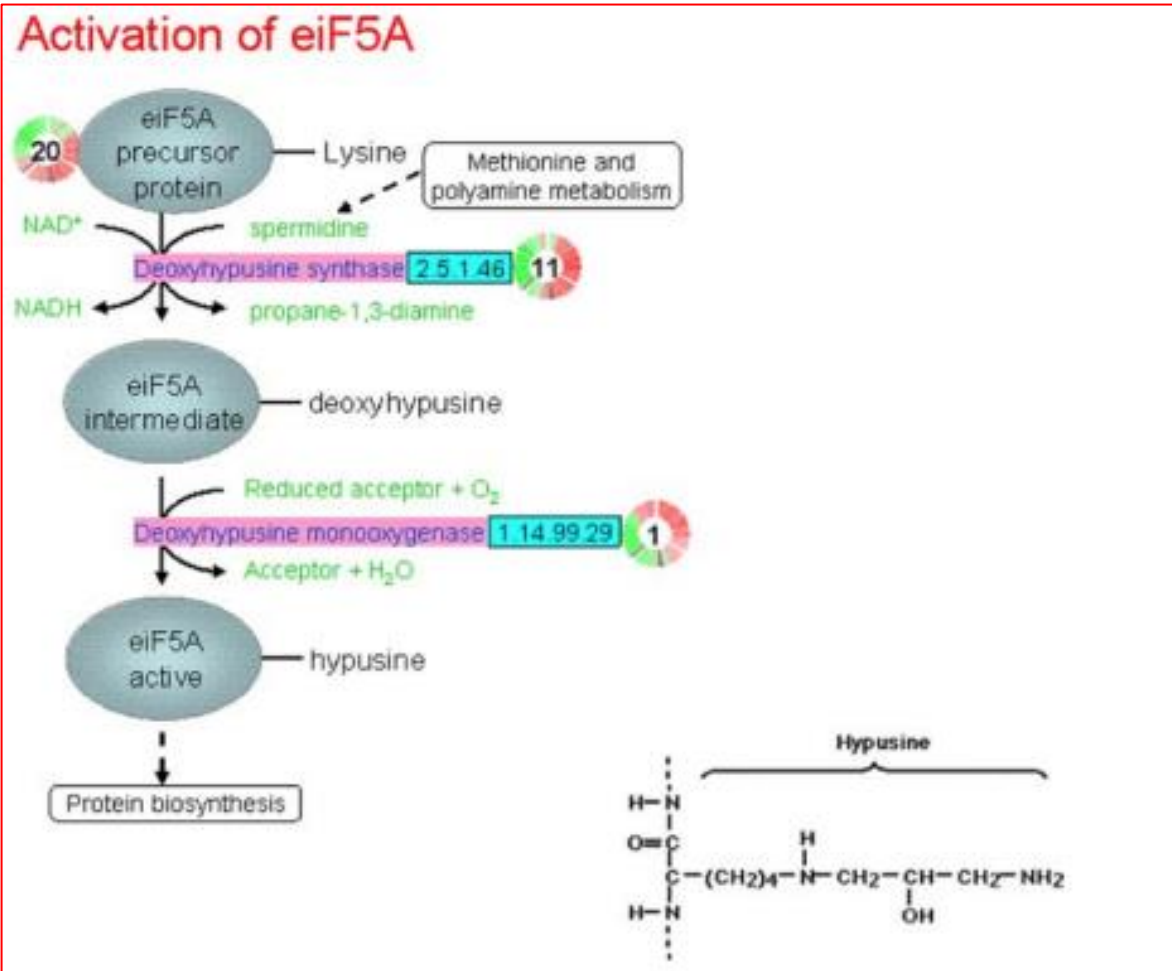


Figura3. Biosintesi del residuo di ipusina in eIF5A. [7]

In uno studio [7], è stato dimostrato l'importanza del cofattore NAD a far legare la spermidina al precursore 5A durante la prima reazione enzimatica.

1.2 Deossi-ipusina sintasi umana (DHS)

1.2.1 Struttura

L'enzima deossi-ipusina sintasi umano nel suo stato nativo, è descritta come un tetramero composto da 4 subunità di circa 41kDa (figura 4). Ciascuna subunità contiene un fold (Rossmann) capace di legare i nucleotidi. Sono presenti due dimeri A1A2 e B1B2 associati tra di loro e contenente 4 siti attivi, 2 per ogni dimerico. Il sito di legame del NAD è presente in una subunità mentre la porzione catalitica è presente nell'altra. Ogni subunità è caratterizzata da: un β -foglietto parallelo composto da 6 strand in posizione centrale, un piccolo β -foglietto antiparallelo e 16 α eliche

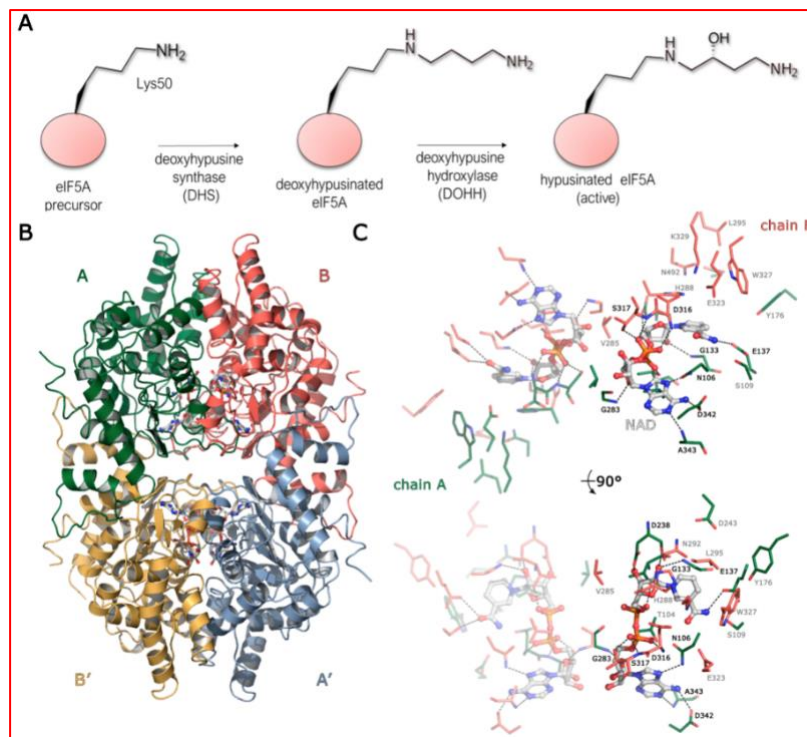


Figura 4. Modello strutturale della forma tetrameric di DHS. Nel dettaglio il legame con una molecola di NAD. [8]

Il sito attivo è localizzato all'interno della struttura, non facilmente accessibile se non attraverso una regione ad imbuto che comprimendosi forma un tunnel che porta all'interno di una regione più grande dove avviene l'interazione con il substrato [9,10].

1.2.2 Interazione tra DHS e eIF5A

L'interazione tra il DHS e il fattore di traduzione 5A è altamente specifica. Un primo studio [8] della deossi-ipurina umana ha rivelato quattro siti attivi dell'enzima situati all'interno di tunnel profondi. Analisi successive hanno posto un dubbio riguardo al DHS ovvero, anche se è presente come tetramero, l'unità catalitica fondamentale dell'enzima sembra essere un dimero. La nuova struttura cristallina della deossi-ipurina ha permesso di ottenere risposte sul fatto che il tetramero è necessario sia per un meccanismo di regolazione che per una maggiore stabilità. Il DHS in forma tetramericca lega una singola molecola di eIF5A, nonostante i 4 siti attivi [10,11].

1.2.3 GC7 come inibitore del complesso tra DHS e eIF5A

A causa del legame tra alti livelli di eIF5A e infezioni o tumori, i ricercatori hanno posto l'attenzione verso possibili inibitori della singolare modifica post-traduzionale in modo tale da sviluppare varie terapie antitumorali con particolare attenzione a inibitori della formazione del complesso DHS-5A.

Grazie a recenti studi l'N1-guanil-1,7-diamminoheptano (GC-7) è la principale

molecola capace di colpire l'interazione tra le due proteine protagoniste. Il GC7 è un analogo della spermidina e mostra un $K_i=10\text{nM}$, che è 500 volte inferiore al K_m della spermidina fisiologica. Inibendo l'accesso alla spermidina viene a mancare la prima reazione di modificazione del substrato eIF5A; è stato dimostrato che l'uso di GC7 inibisce la crescita di varie cellule di mammifero tuttavia a causa della scarsa specificità e selettività possono dar luogo a diversi effetti collaterali. Inoltre, a causa delle poliammine ossidasi presenti nel sangue la disponibilità di questo composto ad oggi è limitata e non permette studi clinici. Grazie alla forte somiglianza tra le proteine eucariotiche e quelle archeali (figura 5), è possibile sfruttare microrganismi come *Sulfolobus solfataricus* per ottenere risultati di più facile comprensione ma comunque trasferibili al modello umano.[12,13]

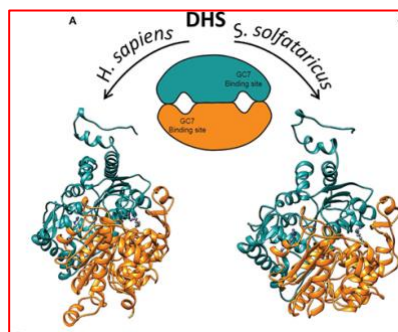


Figura 5. Modello strutturale del DHS in *H.sapiens* e *S.Solfataricus*. [13]

1.3 Il legame evolutivo tra Archaea ed Eukarya.

L'origine della cellula eucariotica rimane uno degli enigmi della biologia moderna. Recenti studi hanno fornito supporto per far emergere l'evoluzione della cellula eucariotica all'interno del dominio Archaea, ma l'identità e la natura del presunto antenato rimangono oggetto di dibattito. La recente scoperta del Lokiarchaeota[14] e altri membri del superphylum Asgard suggerisce che un'analisi più attenta della biologia cellulare e dell'evoluzione di questi gruppi può aiutare a far luce sull'origine della cellula eucariota. I lignaggi Asgard portano la maggior parte delle caratteristiche che sono chiaramente associate ad Archaea, tuttavia, in molte filogenesi molecolari, appaiono come un gruppo gemello degli eucarioti e sono distinti dagli altri Archaea in quanto portano molti geni ESP associati a processi finora conosciuti solo dagli eucarioti (figura 6). Appaiono spesso nelle filogenesi molecolari come strettamente correlati agli eucarioti e possiedono 'Proteine eucariote Signature' codificate da geni precedentemente ritenuti unici per gli eucarioti. Questa affinità filogenetica è stata ampiamente interpretata come indicante che i lignaggi di Asgard sono Archaea simili agli eucarioti, con quest'ultimi che si evolvono dall'interno di un Archaea parafiletico [15]. Nella mia tesi si è sfruttato l'omologia di eIF5A con aIF5A, un modello meno

complesso rispetto alla sua controparte eucariotica, ma utile per studiare le interazioni, i processi molecolari e la modifica post-traduzionale unica.

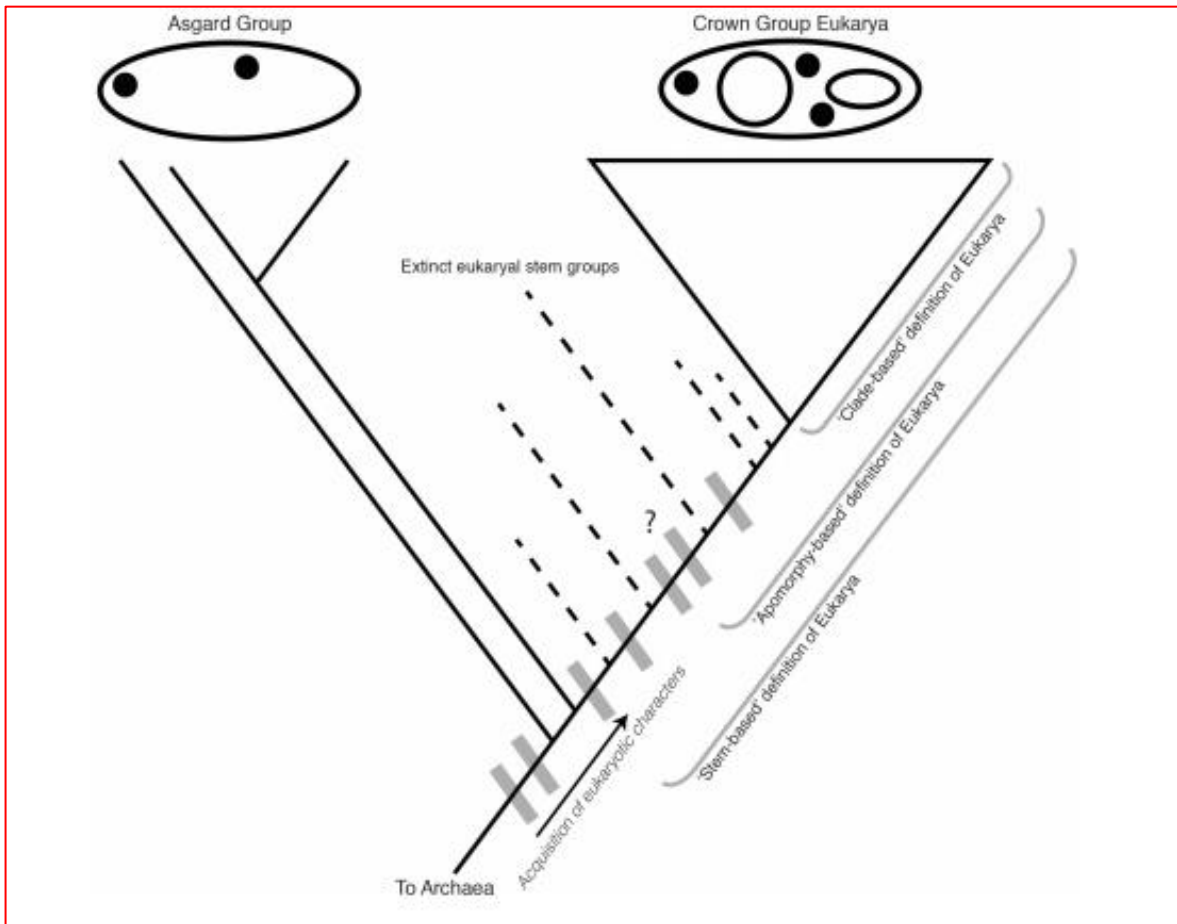


Figura 6. Cladogramma di Asgard ed evoluzione degli eucarioti in relazione a diverse definizioni di Eukarya. I caratteri eucariotici specifici (ESP, caselle grigie) sono stati acquisiti nell'antenato di Asgard + Eukarya e continuano ad essere acquisiti nel lignaggio del tronco eucariotico.[15]

1.3.1 Sulfolobus solfataricus, organismo modello di studio

Grazie alla somiglianza nei domini Eukarya e Archeae dei fattori di traduzione 5A, dell'enzima DHS e che la modifica di l'ipusina sia presente in entrambi i modelli, si è scelto di utilizzare il fattore di traduzione aIF5A (omologo di eIF5A) di *Sulfolobus solfataricus*, appartenente al regno dei *Crenarchaeota* [16], per approfondire l'interazione e la stabilità dell'eventuale complesso. Poiché *Sulfolobus spp.* possono essere coltivate e manipolate in condizioni di laboratorio, sono organismi modello popolari per diversi studi. La caratteristica eccezionale di questi organismi, che sono stati studiati a partire dagli anni '70, è la loro capacità di prosperare a pH estremamente basso e alta temperatura, caratteristiche che non hanno precedenti negli eucarioti e nei batteri. Nello specifico i microrganismi appartenenti alla specie di *Sulfolobus solfataricus* sono stati isolati per la prima volta nella Solfatara di Pozzuoli. Infatti, crescono a temperatura intorno a 80°C, a pH tra 2 e 4 e in presenza di zolfo che metabolizzano per produrre energia necessaria al loro sostentamento. Le caratteristiche termofile della struttura proteica, nello specifico, potrebbero favorire la necessaria cristallizzazione della struttura in uno studio ai raggi X, analizzando le interazioni durante la prima reazione di ipusina e dell'inefficacia del GC7 come inibitore nella formazione del complesso.

1.3.2 Caratteristiche strutturali e funzionali di aIF5A

Gli Archaea contengono una proteina omologa a eIF5A e ortologa del fattore batterico EF-P, chiamato fattore 5A (aIF5A), che mostra una forte somiglianza strutturale e funzionale con le altre due proteine. Questa proteina è stata isolata dal termofilo *Sulfolobus acidocaldarius* come una piccola proteina di 15 kDa contenente la specifica modifica post-traduzionale di un residuo di lisina, chiamato ipusina, come descritto per gli eucarioti. Per quanto riguarda la struttura è prevalentemente composto da β -strand e comprende due domini distinti, un dominio N-terminale e un dominio C-terminale. Questi due domini sono collegati da un breve linker di soli due residui. Una caratteristica peculiare è che il dominio N/C-terminale hanno carica differente, C è per lo più caricato negativamente, quindi 5A può agire come una proteina in grado di legarsi con l'acido nucleico (soprattutto molecole di RNA) attraverso la sua porzione positiva all'N-terminale e viceversa negativa al dominio C-terminale. aIF5A svolge la stessa funzione del suo omologo ovvero sono fattori di allungamento e eseguono il compito essenziale per salvare i ribosomi dallo stallo durante la sintesi delle proteine che portano sequenza particolari come i tratti di polyproline. Indispensabile per questa azione è la modifica post-traduzione di l'ipusina che ritroviamo in entrambe le proteine in corrispondenza di un residuo situato nel

dominio N-terminale. Tuttavia, la via dell'ipusinazione in Archaea rimane sconosciuta perché, nonostante la presenza della proteina ipusinata, solo il primo enzima, DHS, è presente. Recenti studi confermano la funzione di aIF5A non solo come fattore di traduzione bensì come fattore legante l'RNA influenzandone il turn-over. Probabilmente queste due proprietà, in conflitto, possono essere regolate dallo stato di modificazione post-traduzionale della proteina (ipusinata vs non ipusinata) e/o dalla sua interazione con diversi partner proteici [17,18].

Capitolo secondo

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di utilizzare come modello di studio le proteine archeali aIF5A e l'enzima aDHS del microorganismo estremofilo *Sulfolobus solfataricus* con l'obiettivo di approfondire le caratteristiche, l'interazione e la stabilità permettendo una futura analisi strutturale del complesso. Il fattore di traduzione 5A ha una modifica post-traduzionale unica: l'ipusinazione del residuo di lisina in posizione conservata. Nei casi di tumori o di infezioni associate alla malaria, diabete o HIV-1 questa proteina è over espressa. Tali prove, hanno indirizzato i vari gruppi di ricerca all'individuazione di ipotetici inibitori in grado di bloccare il processo di ipusinazione, infatti questa modifica è essenziale per la corretta funzione della proteina e la sua assenza indirizza la cellula all'apoptosi, cellule tumorali incluse. Essenziale a questo scopo è avere la possibilità di ottenere una quantità significativa di complesso (20-30mg) quindi sono state utilizzate diverse tecniche per analizzare l'interazione fra le due proteine e ottimizzare la purificazione. Risulta fondamentale la conoscenza dettagliata della struttura molecolare del complesso fra il fattore e gli enzimi coinvolti nelle modifiche post-traduzionali, tuttavia anche se le strutture delle singole proteine DHS e

5A sono note non si hanno ancora informazioni strutturali sul complesso data la difficoltà di cristallizzare. Questa tesi è l'inizio di una ricerca più estesa e dettagliata che consentirà, grazie ad approcci strutturali e all'utilizzo di simulazioni di dinamica molecolare, lo sviluppo di molecole in grado di inibire la maturazione di IF5A.

Capitolo terzo

MATERIALI E METODI

3.1 *Espressione e purificazione aDHS*

La sequenza codificante per aDHS di *Sulfolobus solfataricus* è stata amplificata e inserita nel vettore plasmidico pQE-70, in cui troviamo la resistenza all'ampicillina, il promotore T7 dell'operone lac che permette l'espressione del gene a valle (aDHS) grazie all'induzione con Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) un analogo del lattosio. Successivamente utilizzando cellule di *Escherichia coli* (*E. coli*), nello specifico DH5, si è propagato il vettore. Il plasmide ricombinante estratto è stato usato per trasformare cellule di *Escherichia coli* BL21 ideali per la produzione di proteine ricombinanti. Per facilitare la purificazione della proteina d'interesse, si è utilizzata una coda di istidine (his-tag) localizzata nella porzione C-terminale della proteina.

Il ceppo BL21, con al suo interno il plasmide ricombinate pQE-70-aDHS, è stato piastrato in terreno Luria-Bertani (LB), in presenza di ampicillina (25 μ g/ml) e incubata a 37° over night. Il giorno seguente dopo aver raccolto

con un'ansa sterile le colonie isolate sono state propagate in 20 ml terreno LB liquido aggiunto di ampicillina incubate over night a 37° in forte agitazione. Il giorno successivo attraverso lo spettrofotometro impostato a una lunghezza d'onda di 600nm si è valutata la crescita batterica attraverso la densità ottica, in modo tale da prelevare una certa quantità dalla coltura dei 20 ml per avere un OD di partenza di 0,1 in un terreno liquido 500 ml (addizionato di ampicillina) e incubata a 37° in agitazione. A intervalli di tempo prefissati (20 minuti) è stata valutata la crescita batterica attraverso la densità ottica e al valore di una OD compresa tra 0,4 e 0,8 è stato aggiunto l'induttore IPTG 0,5M, sempre in incubazione per 4 ore per l'espressione della proteina ricombinante nelle cellule batteriche trasformate. Dopo 4 ore, la coltura è stata centrifugata a 5'000 g per 30 minuti a 4° bloccando la crescita batterica. Il pellet ottenuto dalla centrifugazione viene congelato a -80° per un'intera notte. Per la lisi il pellet è stato risospeso, in 10 ml di lysis buffer (Tris HCl pH 6 50mM, KCl 150mM, imidazolo 15mM, PMSF 1mM, β-mercaptoetanol 10mM, lisozima 25ug/ml, Triton X 0,1%) e lasciato in agitazione per circa 30 minuti in ghiaccio, per ottimizzare la lisi il pellet è stato sonicato, successivamente il lisato è stato centrifugato a 10'000g per 30 minuti, per chiarificarlo. La falcon contenente il sopranatante è stata riscaldata a 65° in un bagno termostatico per 30 minuti, passaggio reso possibile dalla caratteristica

di termofilia della proteina ricombinante. Il lisato è stato centrifugato a 5000g per 10 minuti e prelevato il soprannatante. Quest'ultimo è stato incubato con 500 µl di resina Ni-Nta (binding capacity 5-10 Mg/MI) pre-equilibrata con equilibration buffer (tris-HCl pH 6,8 50mM, NaCl 150mM, Imidazolo 15mM) over night a 4° in agitazione per permettere il legame tra l'His-tag di aDHS e il nichel della resina. Il lisato e la resina sono stati trasferiti in una colonna cromatografica lavata precedentemente con acqua Milliq e atteso che la resina si impacchettasse sul fondo. Avvenuto ciò è stato raccolto il flow through avendo l'attenzione di non lasciare la resina a secco.

Successivamente la colonna è stata trattata con 30 ml di wash buffer (Tris-HCl pH 6.8 50mM, NaCl 1mM, Imidazolo 40mM) e l'eluizione della proteina DHS è resa possibile utilizzando elution buffer (Tris-HCl pH 6, 50mM, NaCl 150mM, Imidazolo 250mM) sfruttando la maggiore affinità dell'imidazolo per la resina rispetto alle code di isitidine. Al termine è stata valutata la concentrazione di DHS attraverso il saggio Bradford e se necessario si utilizzano dei concentratori centrifugando a 14000g a 4°C per 10 minuti. La proteina è stata dializzata over night e over day in buffer di dialisi (Tris HCl 50mM pH 8, KCl 150mM) ricontrollando al termine la concentrazione di DHS e la qualità della purificazione è stata valutata attraverso SDS-PAGE e colorazione con Blue di Comassie.

3.2 Espressione e purificazione di aIF5A

Il gene codificante per aIF54 di *Sulfolobus solfataricus* è stato amplificato e inserito nel vettore plasmidico pETM11, quindi fatto diffondere in cellule di *Escherichia coli* (*E. coli*) del ceppo DH5. Il plasmide ricombinante, precedentemente sequenziato, è usato per trasformare delle cellule ROSETTA di *E. coli*. Contrariamente di aDHS, per facilitare la successiva purificazione e formazione del complesso, il gene di aIF5A è stato inserito in un vettore plasmidico che codifica per una coda di istidine (His-tag) situata non più all'estremità C-terminale bensì N-terminale. Inoltre, è presente un peptide linker di 10 aminoacidi in cui il sito di taglio è riconosciuto dalla proteasi del virus del tabacco (TEV) tra l'His tag e aIF5A.

I vari processi di lisi e purificazione sono gli stessi utilizzati per aDHS descritti in precedenza.

3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

La PAGE è una delle metodiche elettroforetiche più utilizzate in cui i gel di poliacrilammide sono preparati facendo copolimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N, N'-metile bisacrilammide. Grazie a un campo elettrico i campioni proteici, precedentemente bolliti per 10 minuti a 98°C e aggiunti in sample buffer (Tris-HCl 50mM pH 6.8, 10% SDS, 10% Glicerolo, 1% 2-mercaptoetanololo, 0,02% blu di bromofenolo)

vengono separati esclusivamente per il loro peso molecolare grazie alla denaturazione con l'SDS che legandosi ad esse le denatura permettendo loro di migrare in stato unfolded dove la struttura tridimensionale non ha alcun effetto sulla velocità poiché sono tutte non ripiegate; inoltre hanno tutte carica negativa migrando quindi dal polo negativo al polo positivo. Una volta caricati i campioni nei pozzetti, con l'aiuto di una siringa Hamilton Microliter, sono stati fatti migrare a 70 Volt fino a raggiungere la linea che separa stacking e running gel e successivamente per un'ora e mezza a 120 Volt. Il buffer di corsa utilizzato per l'elettroforesi è formato da 25mM Tris-HCl, 192mM glicina, 0,1% SDS. È stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 15%, la cui composizione è presente in figura 7, il quale viene colorato a fine corsa attraverso il Blue Coomassie, un colorante che lega i residui basici e può essere utilizzato direttamente su gel.

<i>Componenti</i>	<i>Stacking gel 5%</i>	<i>Running Gel 15%</i>
H2O sterile	2,895ml	1.23ml
Bis/Acrilammide	835µl	2.5ml
Tris-HCl	1,25ml (pH 6.8) [0.5M]	1,25ml (pH 8.8) [1.5M]
Ammonio PerSolfato 10%	15µl	15µl
TEMED	7,5µl	7,5µl
SDS	50µl	50µl

Figura 7. Componenti stacking e running gel per SDS page.

3.4 Western Blot

L'obiettivo del Western blotting (o Immunoblotting o Immunofissazione) è l'identificazione, con un anticorpo specifico, di un determinato antigene (proteina) presente all'interno di una complessa miscela di antigeni (o proteine) separate in un gel di poliacrilammide in base al peso molecolare e immobilizzate su una membrana. Il western blot permette di monitorare l'espressione proteica in una cellula e quindi di determinare la presenza, la quantità e il peso molecolare di uno specifico antigene. La prima fase è appunto l'elettroforesi e avvenuta questa deve aver luogo il trasferimento su una membrana di nitrocellulosa (Nitrocellulose GE Healthcare Life science). Inizialmente è prevista un'incubazione con una miscela di proteine non specifiche (BSA) con lo scopo di saturare tutti i punti della membrana di nitrocellulosa che potrebbero legare le proteine in modo non specifico. Segue un'incubazione con anticorpo primario specifico per la nostra proteina d'interesse o per un tag. L'anticorpo secondario porta legato un enzima specifico (in questo caso è una perossidasi di rafano) e viene utilizzato per fare una seconda incubazione della membrana e legare il primo anticorpo. Successivamente si ha la formazione di un segnale chemiluminescente visualizzabile attraverso il sistema Chemidoc-Biorad. Il trasferimento è avvenuto in immersione, a freddo, a 100V per 30 minuti utilizzando il buffer

di trasferimento (25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% SDS, 20% metanolo).

Nella figura 8 è mostrato il protocollo di riferimento.

Soluzione di blotto	Anticorpo primario O.N. 4°C	1° lavaggio	Anticorpo secondario 1h T.A.	2° lavaggio
TBS + 0.1% Tween 20, 5% milk	Anti-5A (1 a 10'000)	TBS + 0.1% Tween 20 3x5min	Anti-mouse 1 a 10'000 Coniugato con HRP	TBS + 0.1% Tween 20 4x5min
	Anti-His (1 a 6'000)	TBS + 0.1% Tween 20 3x5min	Anti-rabbit 1 a 10'000 Coniugato con HRP	TBS + 0.1% Tween 20 4x5min

Figura 8. Protocollo di Western Blot.

3.5 Elettroforesi in gel nativo

Nel PAGE nativo, le proteine sono trattate con sample buffer non riducenti e non denaturanti. La separazione è effettuata in assenza di SDS e la mobilità delle proteine dipende da altri fattori oltre il peso molecolare, come la forma e la carica della proteina. Interazioni proteina-proteina possono essere mantenute durante l'elettroforesi in condizioni native e alcune proteine possono essere separate come complessi multisubunità, nel nostro caso tra 5A e DHS. Sono stati preparati il buffer di corsa (25mM Tris, 192mM glicina) e il sample buffer di caricamento (2X: 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glicerolo, 1% blu di bromofenolo), inoltre i campioni a differenza

dell'elettroforesi SDS-PAGE non sono stati portati a una temperatura di 98° bensì attivati a 65° per un'ora sfruttando la caratteristica di termofilia derivante dall'archaea *Sulfolobus sulfataricus*, facilitando a raggiungere il corretto folding proteico previsto intorno ai 65-70° C . Il gel nativo è stato comprato dalla BIORAD (Mini PROTEAN TGX). La migrazione è stata eseguita a 120 V per 2 ore in ghiaccio. Conclusa la corsa il gel è stato colorato con comassie.

3.6 Cromatografia HPLC

La cromatografia liquida ad alta prestazione sfrutta pressioni elevate, ha un buon grado di risoluzione e consente di ottenere con rapidità la separazione delle sostanze. Il campione va opportunamente preparato affinché risulti il più limpido possibile, sciolto nel solvente migliore e ad una concentrazione idonea. Il solvente o la miscela di solventi vengono fatti fluire dalle apposite canule dello strumento mediante l'impiego delle pompe. Dopo aver effettuato la pulizia delle canule, portato il flusso alla velocità desiderata e verificata la linea di base è possibile selezionare il programma di analisi prescelto per il campione in oggetto e iniziare. Una piccola quantità di campione, nell'ordine di microlitri, viene introdotta con un'apposita siringa nella colonna attraverso un iniettore a spirale. Man mano che procede l'analisi, le diverse componenti del campione vengono separate in colonna e i rivelatori ottici registrano le

variazioni d'intensità della luce di un raggio luminoso fatto passare attraverso il liquido in uscita dalla colonna e le trasformano in impulsi elettrici trasmessi ad un computer che fornisce un grafico detto cromatogramma. Il cromatogramma riporta in ascissa, il tempo espresso in minuti e in ordinata l'assorbanza espressa in mAU. Le sostanze separate sono rappresentate graficamente come picchi. Per gli esperimenti svolti in questa tesi è stata impiegata la cromatografia ad esclusione molecolare. Nella colonna è presente una fase stazionaria composta da un polimero (superdex) poroso, e le molecole sono separate in base al loro peso molecolare: le più piccole avranno un tempo maggiore di eluizione dovute alla porosità del polimero, le molecole più grandi saranno filtrate in maniera minore eluendo in tempi più brevi. Nello studio è stata utilizzata una Agilent 1260 Infinity HPLC a cui è stata installata una colonna Superdex™ 200 increase 5/150 (GE Healthcare). Le proteine sono state poste all'interno di un tampone di corsa (20mM Tris HCl pH 7.4, 150mM NaCl) alle seguenti concentrazioni: aDHS 0.5µg/µl; aIF5A 0.25µg/µl. Per favorire la formazione del complesso i campioni sono stati aggiunti dei cofattori necessari all'attività enzimatica: NAD (2mM) e spermidina (2mM) e inoltre la corsa è avvenuta a 65°, temperatura ottimale per riprodurre la condizione nativa. Gli eluati sono stati esaminati in SDS-PAGE e Western Blot.

3.7 Thermal shift assay

La purificazione delle proteine ricombinanti per saggi biochimici o studi strutturali presenta difficoltà intrinseche che dipendono dall'ottimizzazione della stabilità proteica. L'uso di coloranti per monitorare la denaturazione termica delle proteine con rilevamento sensibile della fluorescenza consente la determinazione rapida ed economica della stabilità delle proteine utilizzando strumenti Real-time PCR. Per la mia tesi è stato utilizzato come strumento il ROTOR GENE 3000 e come colorante il SYBRO ORANGE.

L'apparecchio è costituito da una piastra in cui caricare i vari campioni da analizzare incluso il controllo negativo aumentando progressivamente la temperatura di 2°C al minuto, partendo da 40°C. La fluorescenza in ciascun pozzetto viene misurata a intervalli regolari. Il SYBRO ORANGE è stato diluito partendo da una concentrazione stock 5000X, l'esperimento sfrutta la capacità di questo colorante di legarsi alle regioni idrofobiche delle proteine e aumentando la temperatura in modo costante la proteina denaturandosi espone le superfici idrofobiche aumentando di conseguenza la fluorescenza. Come controllo negativo è stato utilizzato un buffer contenente Tris-HCL 50mM e KCL 150mM, il campione contenente il complesso 5A-DHS con un rapporto molare 1:4 è stato incubato a 65°C per 30 minuti. Le proteine 5A e DHS sono

state caricate singolarmente a diverse concentrazioni in modo da visualizzare lo shift più significativo.

Capitolo quarto

RISULTATI

4.1 Purificazione di aDHS e aIF5A in E.coli

Per poter studiare l'interazione e la maggiore stabilità del complesso rispetto alla proteina presa singolarmente è stato utilizzato come ospite di espressione *E. coli* con i vettori plasmidici descritti nei Materiali e Metodi, al fine di ottenere grandi quantità di proteine grazie a un'espressione resa inducibile. Il primo test da effettuare prima di procedere con la lisi e iniziare il protocollo di purificazione è stato quello di verificare se a seguito dell'induzione con l'IPTG le proteine vengano prodotte. Sia con DHS e 5A si prelevano 2 ml di coltura prima dell'induzione e dopo 4 ore di induzione si prelevano 2 ml di post indotto. Le aliquote sono state centrifugate, i pellet risospesi e incubati a 95°C per 5 minuti e sottoposti a una corsa elettroforetica SDS-PAGE. Il risultato dell'elettroforesi, dopo colorazioni con comassie, mostra un aumento d'espressione proteica nel post indotto rispetto al campione pre-indotto. Tale differenza è maggiormente visibile nel caso di aIF5A nei ceppi ROSETTA piuttosto che in aDHS nel ceppo BL21 (figura 9)

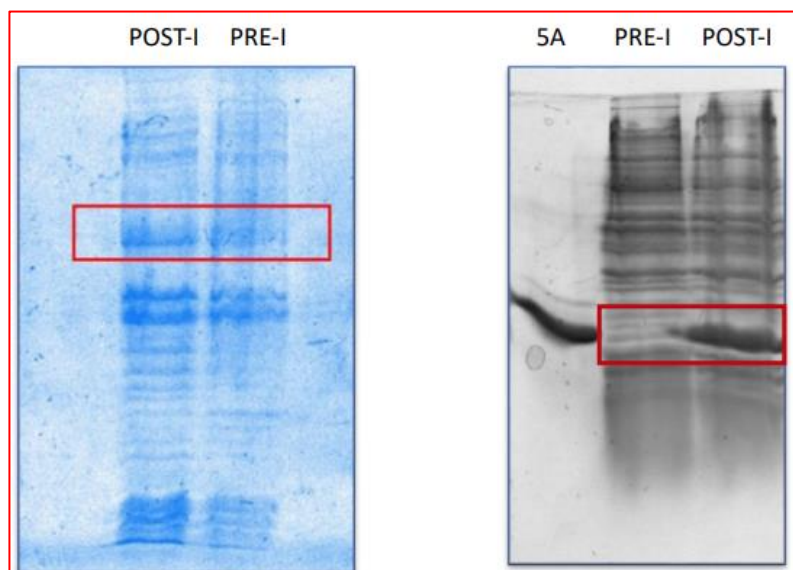


Figura 9. SDS-PAGE dei campioni pre e post-indotti di aDHS (a sinistra) e aIF5A (a destra). Per il campione aIF5A la banda è più visibile grazie al fatto che *E.coli* produce una grande quantità di proteina a seguito dell'induzione con IPTG (0.5M)

Una volta confermata l'espressione delle due proteine si può procedere con la purificazione seguendo le indicazioni descritte nel capitolo materiali e metodi. Gli eluati raccolti alla fine della purificazione sono stati sottoposti sempre a una corsa elettroforetica in condizioni denaturanti al fine di accertarsi che la proteina si è staccata dalle biglie di nichel contenute nella resina a cui era legata attraverso la coda di istidine. Per aDHS si è ottenuta una grande quantità di proteina apprezzabile dalle bande presente negli eluati e dalla assenza di esse nei vari wash caricati nei pozzetti, andando appunto a confermare il legame della proteina con la resina. Gli eluati positivi

successivamente vengono raccolti e posti insieme in modo da ottenere un unico pool (figura 10).

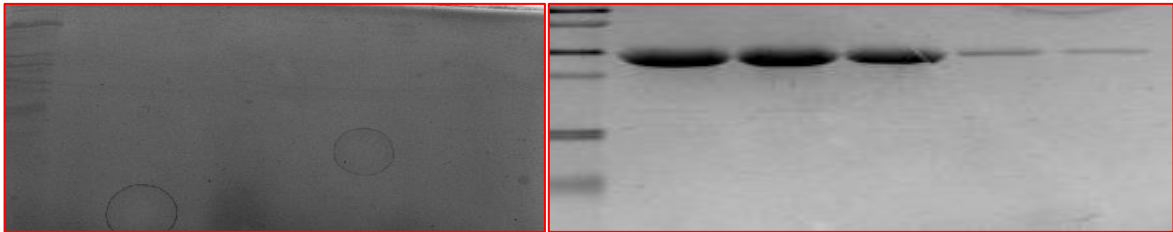


Figura 10. A sinistra il gel con i wash a destra gli eluati, è apprezzabile una buona espressione proteica di DHS.

La concentrazione proteica è stata valutata attraverso un saggio Bradford, un colorante che si lega ai residui basici e effettuando una lettura in assorbanza a 595nm. Con i valori di assorbanza ottenuti si costruisce una curva di taratura e si calcola la nostra concentrazione. Se necessario le proteine devono essere concentrate utilizzando dei concentratori (Amicon Ultra-4 10K Centrifugal Filter Device) e infine dializzate ON/OD per l'eliminazione dell'imidazolo. Il pool viene diviso in aliquote da 500µl e conservate a -80°C.

4.2 Analisi del complesso aIF54 e aDHS

Per poter studiare il complesso tra 5A e l'enzima DHS sono state utilizzate diverse analisi molecolari. Il primo approccio è stato di utilizzare non più la SDS-PAGE bensì effettuare l'elettroforesi in condizioni native, quindi di non

denaturare le proteine permettendo la migrazione non basata sul peso molecolare bensì dal loro punto isoelettrico. Nella tesi sia le proteine prese singolarmente sia la miscela contenente il fattore 5A e l'enzima DHS in un rapporto molare specifico di 2:1,4:1 e 8:1 (il rapporto migliore, grazie anche a uno studio effettuato sulle proteine umane, risulta essere il 4:1) sono stati incubati a 65° per 1 ora al fine di consentire l'interazione ottimale e quindi la formazione del complesso delle due proteine termofile. Finita l'incubazione i campioni sono stati caricati nel gel nativo Mini PROTEAN TGX e sottoposti a elettroforesi per 2 ore in ghiaccio a 150V. In questo esperimento (figura 12) è stata valutata l'interazione tra le due proteine e inoltre si è voluto osservare l'effetto dell'inibitore GC7 sul complesso. DHS sembrerebbe migrare con tre bande suggerendo diversi tipi di strutture, 5A migra più velocemente grazie alla minore dimensione ed è presente una singola banda. I risultati delle corsie 3, 4 indicano chiaramente che la formazione di un complesso aIF5A-aDHS è avvenuta come testimoniano la formazione di una banda molto netta e con una velocità di migrazione leggermente superiore rispetto alla proteina aDHS singola nonché la quasi assenza della banda corrispondente alla proteina aIF5A che è impegnata nell'interazione con l'enzima. Nel pozzetto 8 si è voluto testare l'effetto inibitorio del GC7 ma sembrerebbe, alle concentrazioni testate, non disturbare l'interazione tra le due proteine.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.

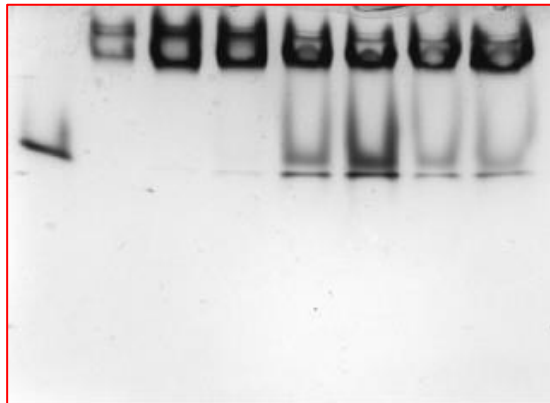


Figura 12. Analisi del complesso in gel nativo, I campioni sono stati così caricati, 1: aIF54 5ug (294pmol), 2: DHS 5ug (35,5pmol),3: IF5A:DHS 1:1 (100pmol:100pmol),4: IF5A:DHS 2:1 (200pmol:100pmol),5: IF5A:DHS 4:1 (400pmol:100pmol),6: IF5A:DHS 8:1 (800pmol:100pmol),7: IF5A:DHS 4:1 (sample buffer pH 6.8 BioRad),8: IF5A:DHS 4:1 + GC7 750µM.

Successivamente si è voluto testare se la presenza dei cofattori NAD e spermidina (figura 13) ottimizzassero la formazione del complesso (rettangolo rosso) ma confrontato con il precedente gel nativo la formazione del complesso è indipendente dai cofattori. Il complesso, di nuovo, non sembrerebbe essere influenzato da GC7 (rettangolo verde), anche in presenza di spermidina con una concentrazione 10 volte maggiore rispetto all'analogo competitivo.

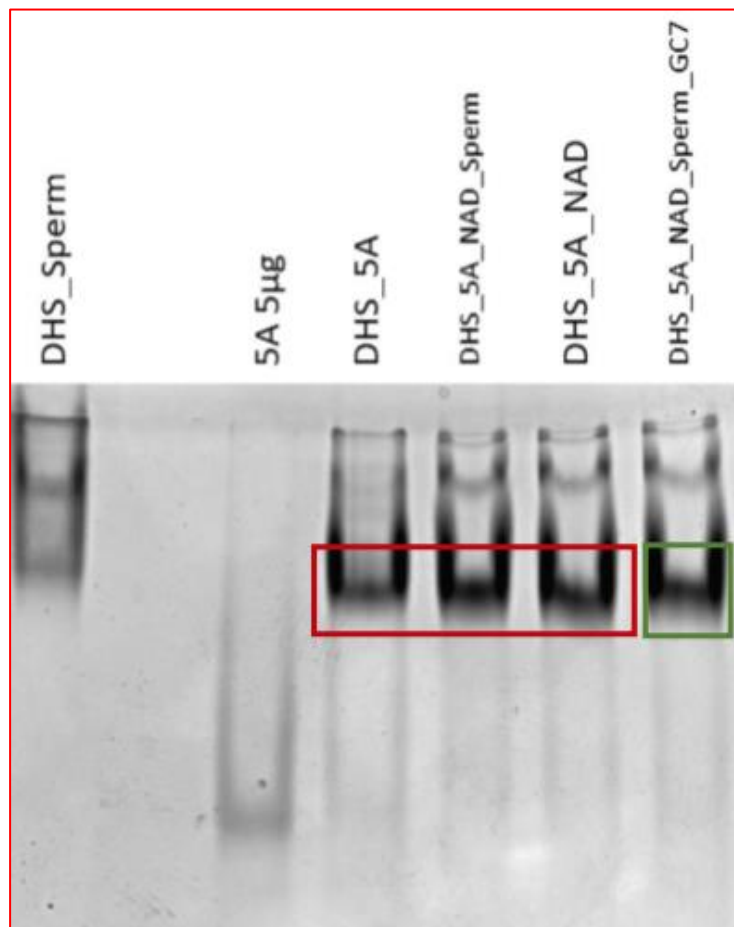


Figura 13. Gel in condizioni native. 80pmol DHS; 294pmol 5A; 1mM NAD; 1mM Spermidina; 0.1mM GC7.

Il gel nativo è stato ripetuto utilizzando una concentrazione di GC7 maggiore di 10 volte (1mM) rispetto a quella usata per gli studi precedenti. Ma la formazione del complesso non è alterata, anche utilizzando una concentrazione decisamente maggiore (figura 14).

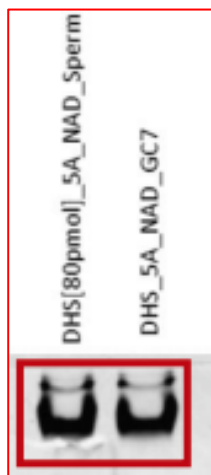


Figura 14. Corsa in gel nativo, la formazione del complesso non è messa in discussione

4.3 Cromatografia liquida ad alte prestazioni per lo studio del complesso

Per lo studio del complesso e dell'interazione fra le due proteine DHS e 5A è stata utilizzata l'HPLC, i processi e la colonna utilizzata sono descritti in materiali e metodi. Nella prima analisi è escluso il GC7 e sarà studiato nella successiva analisi cromatografica. Le proteine sono caricate sia individualmente che con la presenza dei cofattori. I campioni in HPLC sono stati aggiunti di tampone per la corsa (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl). La temperatura è stata settata a 65°, per aumentare l'affinità e l'interazione tra le due proteine. Le eluizioni sono state raccolte e sottoposte ad analisi western blot. aIF5A è stato caricato ad una concentrazione di 0.25µg/µl, mentre per aDHS sono stati caricati 0.5µg/µl. Le concentrazioni di Spermidina, NAD e sono le stesse usate per gli esperimenti in gel nativo.

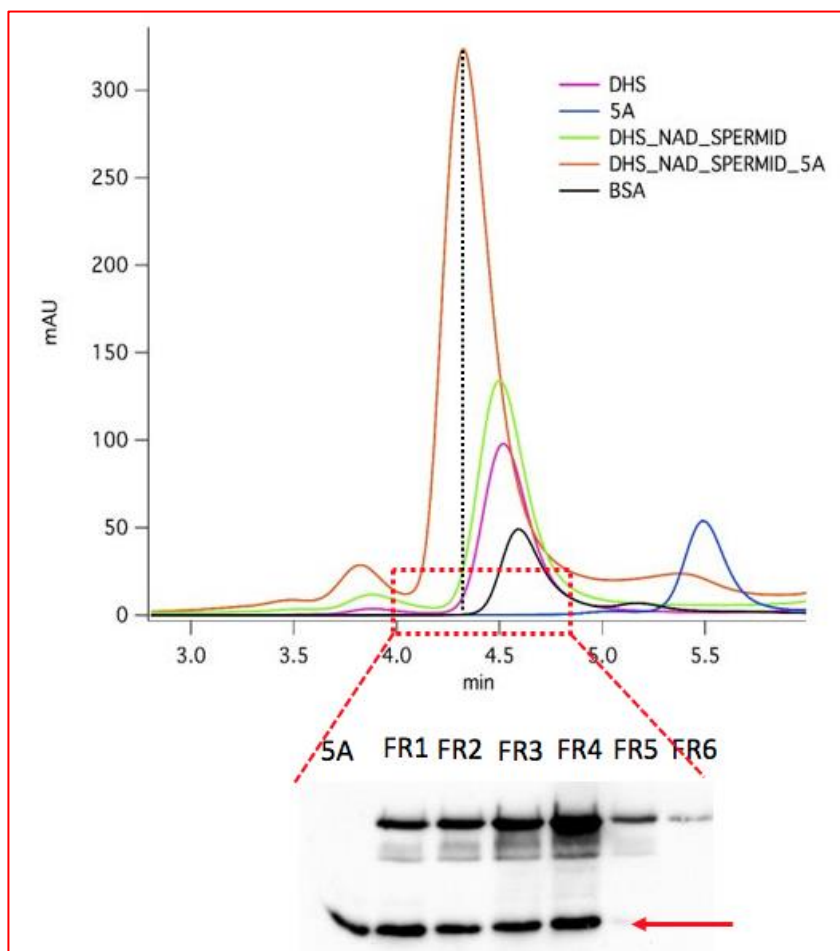


Figura 15. Cromatogramma a seguito di HPLC e Western blot delle frazioni del picco arancione (campione contenente entrambe le proteine più cofattori) Anti-His è l'Ab usato. La BSA è stata caricata come riferimento al peso molecolare.

La figura 15 mostra i vari picchi del cromatogramma e attraverso un software interno all'HPLC è possibile calcolare i tempi di eluizione (min) di ogni campione e, e quindi al volume di eluizione corrispondente, con il peso molecolare (kDa) delle molecole in esame. Il picco viola corrispondente al DHS è stato eluito a un volume di 1.8ml corrispondente ad un peso molecolare di ~140kDa, questo dato ci evidenzia che l'enzima in vitro, si trova

in forma tetrameric, rispettando valori di pH e temperatura ideali Il DHS aggiunto di NAD e spermidina eluisce praticamente allo stesso volume del DHS caricato da solo (1.78ml). aIF5A (picco in blu) questo eluisce ad un volume di 2.21ml corrispondente ad un peso molecolare di ~17kDa, ovvero la proteina in forma monomeric con l'aggiunta all' N-terminale la coda di istidine e il sito di taglio per la proteasi TEV. Il campione contenente entrambe le proteine e i cofattori eluisce ad un volume di 1.73ml, il picco (in arancione) presenta uno shift minimo rispetto al picco del DHS (1.78ml) ma coerente con il piccolo peso molecolare del fattore 5A (17kDa). Di conseguenza l'HPLC ha confermato la formazione del complesso tra le due proteine in questione. Grazie alla presenza dell'anticorpo anti-istidina nel Western Blot è possibile visualizzare senza troppa difficoltà la banda 5A anche dove si è formato il complesso. Successivamente si è effettuata un'altra HPLC dove è stata testato il GC7, ovvero se andasse a interferire con la formazione del complesso, ma come confermato precedentemente dal gel nativo anche nel cromatogramma il picco corrispondente al campione caricato senza GC7 non presenta uno shift (i picchi sono sovrapposti) rispetto al campione caricato con l'inibitore (figura 16).

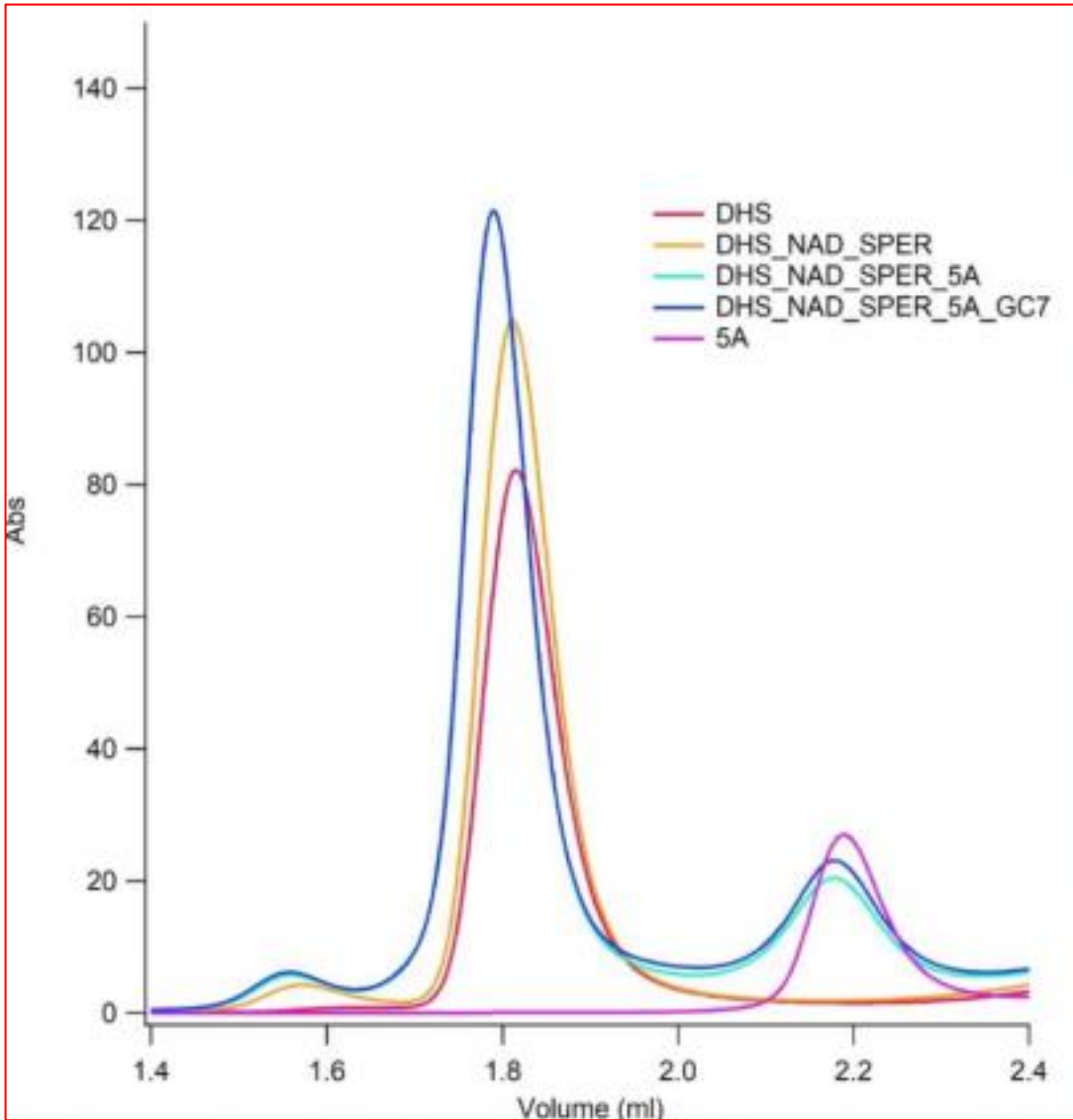


Figura 16..Cromatogramma a seguito di HPLC; i vari colori corrispondono ai campioni caricati.

Successivamente gli eluati sono stati separati attraverso una SDS-PAGE e saggiate con un western blot, utilizzando gli stessi anticorpi (figura 17).

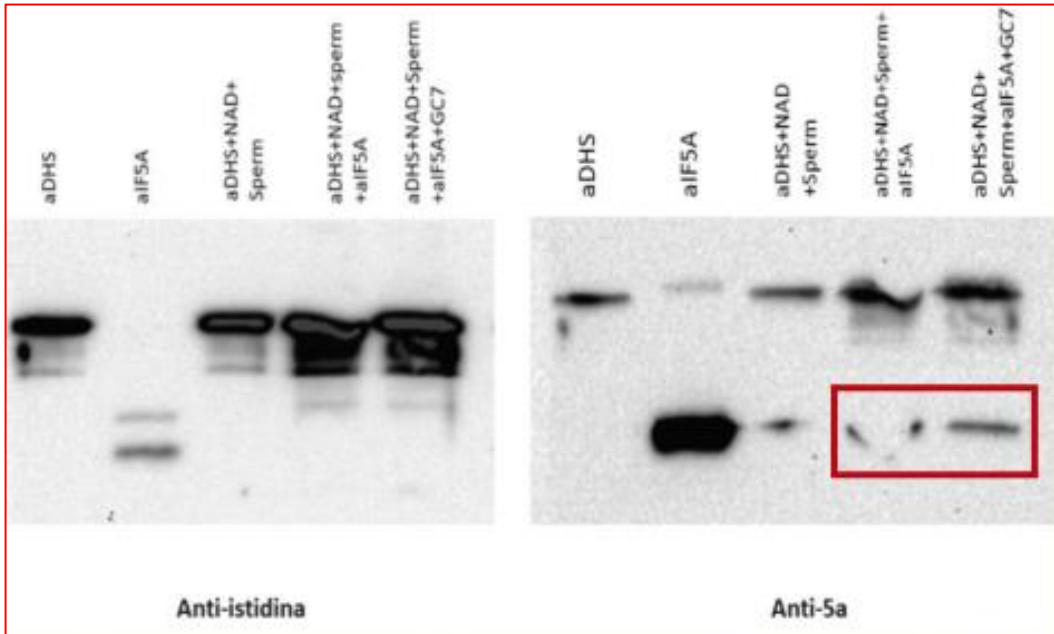


Figura 17. Western blot delle frazioni da HPLC.

La presenza delle bande di aIF5A (rettangolo rosso) nelle due corsie corrispondenti alla frazione del complesso e alla frazione del complesso aggiunto di GC7 confermano che non interferisce con l'interazione delle due proteine ma potrebbe comunque non rendere ottimale l'interazione mediata con il DHS.

4.4 Studio della denaturazione del complesso

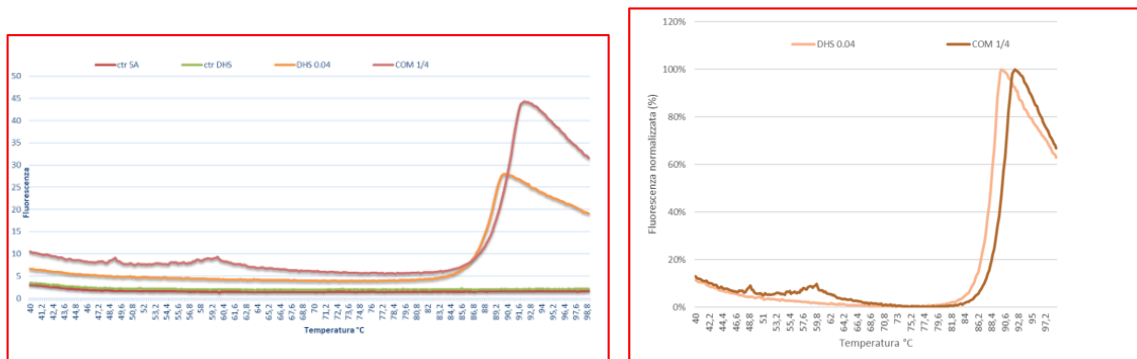


Figura 18. Thermal shift assay utilizzando come colorante il SYBRO ORANGE. A destra la fluorescenza normalizzata, lo shift mostra la maggiore stabilità del complesso rispetto all'enzima preso singolarmente.

Accertata l'interazione delle due proteine, nella mia tesi si è voluto andare a testare se effettivamente il legame con il DHS stabilizzasse il complesso. Per far ciò sfruttando il colorante SYBRO ORANGE si è osservato a che temperatura avvenisse la denaturazione sia del complesso che dell'enzima caricato singolarmente, come descritto in materiali e metodi (figura 18).

Sono stati caricati varie concentrazioni del complesso incubato a 65° per 30 minuti che dell'enzima. Come mostrato in figura, lo shift termico ci suggerisce che il complesso 1:4 (rapporto molare DHS/5A) presenta una maggiore resistenza alla denaturazione termica rispetto all'enzima da solo 0.04 µg/µl, confermando sia l'interazione tra le due proteine che la maggior stabilità del complesso rispetto all'enzima preso singolarmente.

4.5 Purificazione del complesso

Una volta confermata la formazione del complesso si è pensato di purificarlo in modo da consentire studi strutturali in Cryo-Em e Cristallografia. Per la purificazione si è ipotizzato di sfruttare la coda di Histidine e fare avvenire il tutto in colonna con resina Ni-Nta. Per far sì che possa funzionare una delle due proteine deve essere privata della coda di istidine. Si è preferito il 5A, perché il DHS manca del sito di taglio per la TEV. Si è utilizzato una concentrazione di 5A di 0,8mg/ml (1ml) , di DHS 1,2 mg/ml (830µl) e per raggiungere i 100mM di sale nella soluzione si è aggiunto 50 µl di KCL, portando, con acqua Milliq, a un volume finale di 4 ml. Il campione è stato incubato per 30minuti a 65°C per favorire la formazione del complesso e a 1 ora con la resina a 4°C, messo in colonna e raccolto il FT. Gli eluati sono stati recuperati e caricati su SDS page (figura 19), successivamente si è effettuato il bradford del pool per calcolare quanti mg di complesso purificato. Alle condizioni descritte si è riuscito a purificare 1 mg di complesso. Per ulteriore conferma è stato effettuato anche un western blot e un'elettroforesi in gel nativo (figura 20 e 21).

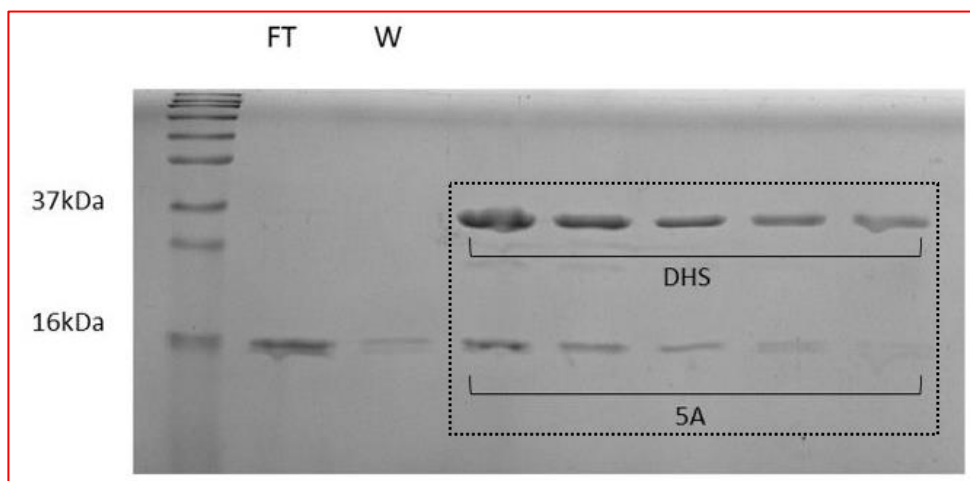


Figura 19. SDS page degli eluati.

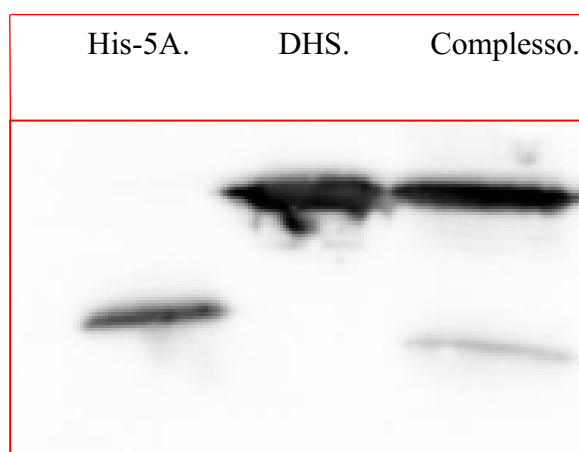


Figura 20. Western blot con anticorpi anti-His per evidenziare i controlli His-5A e DHS. Anti-5A per evidenziare la banda della proteina nella lane del complesso.

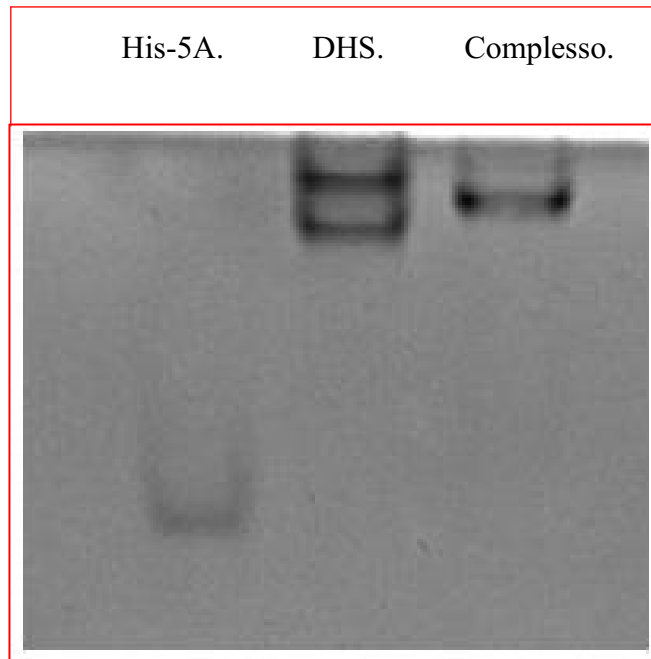


Figura 21. Gel nativo sempre con il complesso purificato, Abbastanza evidente la differenza nella migrazione.

Capitolo Quinto

DISCUSSIONE

In questa tesi si è voluto dimostrare l'interazione tra il fattore di traduzione 5A e l'enzima deossi-ipusina sintasi (DHS) di *Sulfolobus solfataricus*. La proteina svolge un ruolo fondamentale nel meccanismo di sintesi proteica infatti promuove la traduzione di proteine caratterizzate da residui di proline in successione. Quest'ultime possono portare a un blocco del ribosoma, andando a bloccare i processi necessari alla sintesi proteica che può portare a una ridotta o assente proliferazione cellulare. L'ipusinazione del residuo di lisina in posizione 50 è una modifica post-traduzionale unica di questo fattore. Negli eucarioti tale modifica è possibile grazie a due enzimi che catalizzano i due step fondamentali nel processo di ipusinazione: il trasferimento del gruppo 4-amino butilico della sperimidina al gruppo ϵ -amino del residuo di lisina in posizione 50 della proteina precursore per formare il residuo deossi-ipusina da parte dell'enzima DHS. La seconda reazione enzimatica è mediata dall'enzima 51 deossi-ipusina idrossilasi (DOHH) che attraverso l'idrossilazione del precursore intermedio forma il residuo di ipusina e il fattore 5A in forma attiva. Attraverso lo studio di vari tumori in cui è stata trovata un'over espressione di questo fattore è stato sviluppato un notevole interesse e uno studio più approfondito sulla proteina. Considerando che la

modifica post-traduzionale di l'ipusinazione è necessaria per la corretta funzione di 5A e una sua mancata modifica indirizza la cellula verso l'apoptosi, sono stati effettuati studi su dei possibili inibitori capaci di bloccare il processo di ipusinazione. Nella mia tesi è stato testato il GC7, ma alle concentrazioni testate di 0.1mM e 1mM il complesso risulta non essere alterato. Si è scelto di utilizzare *Sulfolobus solfataricus* come modello di studio dell'interazione tra il fattore 5A e DHS perché le proteine sono decisamente conservate tra i due domini invece negli organismi eucariotici la complessità dei modelli è più notevole. Grazie ai vari processi di purificazione, dopo che le proteine sono state espresse nell'ospite procariotico *E.coli*, è stato possibile effettuare analisi di elettroforesi in gel nativo, HPLC e thermal shift assay e confermare la formazione del complesso in un rapporto molare di 1 a 4 a favore di 5A e la maggiore stabilità rispetto all'enzima DHS preso singolarmente. Il passo successivo auspicabile risiede nello studio strutturale del complesso attraverso la cristallografia o cryo-em grazie alla possibilità dell'HPLC di purificare abbastanza velocemente grandi quantità del complesso in esame.

Capitolo sei

PROSPETTIVE FUTURE

Negli ultimi anni, i vari gruppi di ricerca si sono concentrati sui possibili inibitori della modifica post traduzione di l'ipusinazione, necessaria per la corretta funzione di eIF5A, dovuto al collegamento della proteina 5A con vari casi di carcinogenesi. La scelta di utilizzare un organismo Archaea termofilo come *Sulfolobus solfataricus* non è stata dovuta solo alla relativa semplicità del modello in esame ma anche al fatto che le proteine presentano proprietà strutturali evidentemente differenti rispetto alle controparti eucariotiche, dovute proprio alla capacità di resistere ad elevate temperature. Purtroppo, per effettuare studi di cristallografia a raggi X è necessario grandi quantità di complesso purificato e contrariamente alla produzione delle proteine prese singolarmente è più difficoltoso. Ad oggi grazie allo sviluppo di avanzati approcci computazionali e di simulazioni di dinamica molecolare (MetaD) è possibile studiare, all'interno dei siti di legame, le interazioni che avvengono scegliendo dei parametri impostati precedentemente. Recenti studi si sono concentrati sul legame del GC7 con DHS sia appartenente al microrganismo Archaea che all'uomo, dimostrando che l'inefficacia di GC7 sul aDHS può essere dovuta dalla diversa composizione amminoacidica del sito di legame rispetto al sito presente nell'Sapiens. Tra le mutazioni più importanti abbiamo

il residuo hDHS Asp316 sostituito da Leu272 in aDHS. Le differenze nel sito d'interazione si trovano in corrispondenza del gruppo amminico GC7, infatti Asp243 presente nell'hDHS (formando un ponte salino con GC7) viene sostituito da Thr200 in aDHS che non consente la formazione dell'interazione elettrostatica. Complessivamente, solo 10 residui su 25 cambiano tra hDHS e aDHS; la maggior parte di loro non altera significativamente la forma globale e le proprietà chimiche generali del sito di legame [13]. Grazie a questi risultati si è aperta la strada alla progettazione di nuovi inibitori DHS con lo scopo di garantire maggiore specificità e sensibilità.

Capitolo Sette

BIBLIOGRAFIA

- 1 Doudna J., O'Donnell M. (2013) *Biologia molecolare principi e tecniche*. Zanichelli
- 2 K. Turpaev (2018) Translation Factor eIF5A, modification with Hypusine and role in regulation of gene expression. eIF5A as a target for pharmacological interventions. *Biochemistry (mosc)* 2018;83(8):863-873.
- 3 Dever T., Gutierrez M. and Byung-Sik S. (2014). The hypusine-containing translation factor eIF5A. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 49(5): 413–425.
- 4 Schuller P., Chih-chien C., Dever T., Buskirk A., Green R. (2018). eIF5a functions globally in translation elongation and termination. *Mol cell* 2017; 66(2); 194-205.e5.
- 5 Melnikov S., Mailliot J., Shin B, Rigger L., Yusupova G., Micura R., and Yusupov M. (2016). Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. *J Mol Biol.* 428(18): 3570–3576. 6. 24. Gutierrez E, Shin BS,
- 6 Woolstenhulme C., Kim JR., Saini P., Buskirk A., Dever T. (2013). eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol Cell.* 51: 35–45

- 7 Lee C., PY U., PARK M.(2001) Structure-Function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. *Biochem J* 2001 (pt3):841-9.
- 8 Der-Ing L., Myung Hee P., Davies R. (1997) Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase; an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. *Structure* 15 1998, 6:23-32
- 9 Umland T., Wolff E., Park M., Davies D. (2004) A New Crystal Structure of Deoxyhypusine Synthase Reveals the Configuration of the Active Enzyme and of an Enzyme_NAD_Inhibitor Ternary Complex. *The journal of. biological chemistry* 8697–28705.
- 10 Melnikov S., Mailliot J., Rigger L. (2016) Crystal structure of hypusine-containing translation factor eIF5A bound to a rotated eukaryotic ribosome. *Volume 482, Issue 18, 11 2016, 3570-3576.*
- 11 Lee C., Park M. (2001) Structure-function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. *Biochem J.* 2001 1;355(Pt 3):841-9.

- 12 Jansoon M., Malandrin L. (1999) Cell cycle arrest in Archaea by the Hypusination Inhibitor N-Guanyl-1,7-Diaminoheptane. *Journal of Bacteriology*, Feb 2000,p.1158-1161
- 13 D'Agostino M., Romagnoli A., Orlando P., Tiano L., La Teana A., Di Marino D. (2020) Insights into the Binding Mechanism of GC7 to Deoxyhypusine Synthase in *Sulfolobus solfataricus*: A thermophilic Model for the design of New Hypusination Inhibitors. *Front. Chem.*,17 Decembemer 2020.
- 14 Katarzyna Z., Caceres E., Saw J. (2017) Asgard archae illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 2017 Jan 19;541(7637):353-358.
- 15 Spang A., Saw J., Jorgensen S., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., Lind A., van Eijk ., Schleper C., Ettema T. (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*. 521(7551): 173–179.
- 16 . Quehenberger J., Shen L., Albers S., Siebers B., SPadiut O. (2017) *Sulfolobus* – A potential key organism in future biotechnology. *Front microbiol.* 8: 2474.
- 17 Bassani F., Romagnoli A., Cacciamani T., Amici A., Benelli D., Londei P., Martens B., Blasi U., La Teana A. (2018) Modification of

translation factor aIF5A from *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* (2018) 22:769–780.

- 18 Bassani F., Romagnoli A., La teana A., Resch A. (2019). Indications for moonlighting function of translation factor aIF5A in the crenarchaeum *Sulfolobus solfataricus*. ISSN:1547-6286 (print) 1555-8584 (online)