Titolo: Studi molecolari in cellule viventi: in-cell NMR applicato a mutanti SLA di SOD1

Molecular studies in living cells: in-cell NMR applied to SLA mutants of SOD1

Candidato: Matteo Bartolini

Relatore: Prof.ssa Roberta Pierattelli [pierattelli@cerm.unifi.it]

Correlatore: Prof.ssa Lucia Banci [banci@cerm.unifi.it]

Abstract:

In questo lavoro di tesi ci siamo avvalsi della tecnica *in-cell NMR* per analizzare il comportamento di forme mutate dell'enzima SOD1 correlate alla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) di tipo familiare. Questo approccio, che permette lo studio delle molecole necessarie alla vita in condizioni del tutto simili a quelle fisiologiche, offre la possibilità di osservare il comportamento e le interazioni delle proteine all'interno di cellule viventi.

È noto che le mutazioni patologiche legate all'insorgere della SLA interferiscono col processo di maturazione della proteina SOD1, impedendo a quest'ultima di assumere una stabile struttura quaternaria. Il nostro studio si è concentrato sul mutante V7E-SOD1 e sulle sue interazioni col metallo-chaperone CCS. In particolare sono stati analizzati i processi necessari al *folding* dell'enzima: la formazione dell'eterodimero SOD1-CCS, l'*uptake* degli ioni Zn(II) e Cu(II) e la formazione del ponte disolfuro tra i residui cisteina in posizione 57 e 146.

Il protocollo di espressione seguito prevede l'inserimento del gene di interesse in un plasmide vettore, il clonaggio del DNA tramite tecnica PCR e la trasfezione in cellule di mammifero. Queste sono state lasciate esprimere la proteina in terreno arricchito isotopicamente. Sono stati analizzati due campioni di V7E-SOD1: nel primo l'enzima è stato espresso in un terreno uniformemente arricchito in ¹⁵N in presenza di Zn(II); nel secondo è stato effettuato un arricchimento selettivo in ¹⁵N delle sole Cys in presenza di Zn(II), Cu(II) e CCS.

Dalle analisi effettuate tramite *in-cell NMR* è stata osservata la presenza contemporanea di forma ossidata e ridotta della proteina, indice di una difficoltà nel completamento del processo di *folding* e nel raggiungimento di una struttura quaternaria stabile. Poiché i valori che si discostano dal comportamento della SOD1-*wt* sono stati registrati solo nel campione espresso in presenza di entrambi i gli ioni metallici e del metallo-chaperone CCS, le perturbazioni dalla normale maturazione biologica dell'enzima sono attribuibili ad una interferenza della mutazione con la formazione dell'eterodimero SOD1-CCS.