

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



**Scuola Politecnica e Delle Scienze di Base
Dottorato di ricerca in Biologia
XXXI ciclo**

Tesi di dottorato

*ANALYSIS OF A RARE GENETIC DISEASE DUE TO PROTEIN
INSTABILITY: STUDY AND CHARACTERIZATION OF
CONGENITAL DISORDER OF GLYCOSYLATION TYPE IA*

Coordinatore

Ch.mo prof. Salvatore Cozzolino

Candidata

Chiara Cimmaruta

Tutor

Ch.ma prof.ssa Maria Vittoria Cubellis

ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1 CDG-IA.....	6
1.1.1 <i>Caratteristiche biochimiche</i>	6
1.1.2 <i>Sintomi</i>	7
1.1.3 <i>Diagnosi</i>	8
1.1.3.1 <i>Analisi della transferrina ipoglicosilata</i>	8
1.1.3.2 <i>L'attività fosfomannomutaseica nei fibroblasti e nei leucociti</i>	10
1.1.3.3 <i>Analisi delle mutazioni</i>	10
1.1.3.4 <i>Analisi della strutture degli LLO</i>	11
1.1.3.5 <i>Diagnosi prenatale</i>	12
1.1.4 <i>Terapie</i>	12
1.2 N-GLICOSILAZIONE.....	14
1.3 PMM2 E PMM1.....	19
1.4 I MUTANTI DI PMM1 E PMM2.....	23
2. SCOPO DEL PROGETTO	25
3. MATERIALI E METODI	27
3.1 CONFRONTO BIOCHIMICO E FUNZIONALE TRA I DUE ENZIMI PARALOGHI PMM1 E PMM2 PER DELUCIDARE IL RISPETTIVO RUOLO NELLA CDG-IA.....	27
3.1.1 <i>Espressione delle proteine e purificazione proteica</i>	27
3.1.2 <i>Saggi di attività enzimatica</i>	27
3.1.3 <i>Spettroscopia NMR ³¹P</i>	29
3.1.4 <i>Thermal Shift Assay</i>	30
3.2 DELEZIONE DELLA PMM1 IN FIBROBLASTI DERIVATI DA UN PAZIENTE CDG-IA MEDIANTE IL SISTEMA CRISPR/CAS9.....	30
3.2.1 <i>Culture cellulari</i>	30
3.2.2 <i>KO della PMM1 in fibroblasti CDG-Ia mediante Crispr/Cas9</i>	30
3.2.3 <i>Screening dei cloni ko-PMM1 per qPCR</i>	31
3.2.4 <i>Screening dei cloni ko-PMM1 per western blotting</i>	32
3.3 GENERAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA CELLULARE MODELLO MEDIANTE IL SISTEMA CRISPR/CAS9 PER INTRODURRE UNA MUTAZIONE IPOMORFA NEL GENE <i>PMM2</i>	32
3.3.1 <i>Hepg2 genome editing attraverso il sistema Crispr/Cas9</i>	32
3.3.2 <i>Culture cellulari</i>	34
3.3.4 <i>Analisi per qPCR dell'espressione della PMM2</i>	34
3.3.5 <i>Analisi per western blotting dell'espressione della PMM2</i>	34
3.3.6 <i>Saggi di attività fosfomannomutaseica</i>	35
3.3.7 <i>Determinazione dell'attività fosfomannomutaseica mediante spettroscopia ³¹P-NMR</i>	35
3.4 DETERMINAZIONE DI POTENZIALI BIOMARCATORI N-GLICOSILATI NELLA NUOVA LINEA DI HEPG2 CDG-IA.....	36
3.4.1 <i>Analisi secretoma per SDS-PAGE</i>	36
3.4.2 <i>Microscopia confocale e quantizzazione della fluorescenza emessa dalle lectine</i>	36
4. RISULTATI	37
4.1 CONFRONTO BIOCHIMICO E FUNZIONALE TRA I DUE ENZIMI PARALOGHI PMM1 E PMM2 PER DELUCIDARE IL RISPETTIVO RUOLO NELLA CDG-IA.....	37
4.1.1 <i>Caratterizzazione funzionale mediante spettroscopia ³¹P-NMR</i>	37
4.1.2 <i>Caratterizzazione funzionale mediante saggi convenzionali di attività enzimatica</i>	41
4.2 KO DELLA PMM1 IN FIBROBLASTI CDG-IA MEDIANTE CRISPR/CAS9.....	47
4.3 CARATTERIZZAZIONE DEL NUOVO SISTEMA MODELLO CELLULARE HEPG2-F119L.....	50
4.4 DETERMINAZIONE DI POTENZIALI BIOMARCATORI N-GLICOSILATI NELLA NUOVA LINEA DI HEPG2 CDG-IA.....	53
4.4.1 <i>Analisi del secretoma</i>	53
4.4.2 <i>Analisi delle lectine per immunofluorescenza</i>	55

5. DISCUSSIONE.....	56
6. PUBBLICAZIONI.....	58
7. BIBLIOGRAFIA.....	60

ABSTRACT

Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia) is an autosomal recessive disease caused by mutations in PMM2 gene encoding phosphomannomutase 2. In humans two PMM enzymes exist, PMM1 and PMM2; both of them catalyze the interconversion of mannose-6-phosphate into mannose-1-phosphate but only PMM1 can also hydrolyze bis-phosphate hexoses after stimulation with inosine monophosphate (IMP). Although no mutation in PMM1 gene has been associated with the disease, the role of the paralogous enzyme in CDG-Ia should be clarified. PMM1 and PMM2 were analyzed by conventional enzymatic assays as well as by novel techniques such as ³¹P-NMR and thermal shift assay. In order to evaluate the role of IMP in regulating mannose-1-phosphate production and ultimately protein glycosylation, it was performed the characterization of a triple mutant of PMM1 that retains mutase and phosphatase activity, but not sensitive to IMP.

For the purpose of developing a therapeutic approach for CDG-Ia, for which there is no cure at the moment, it was generated a new cell model in order to identify biomarkers for cell-based screening, such as glycosylated proteins. A cancer cell line HepG2 was edited by Crispr/Cas9 system to introduce the hypomorphic PMM2 mutation, *F119L*, that has been observed in CDG-Ia patients in homozygosity. Hypo-glycosylated forms of α -1-anti-trypsin (AAT) was detected by Western blot in HepG2-F119L similarly to the serum from CDG-Ia patients. Furthermore, a difference in the amount of a secreted protein, alpha-fetoprotein (AFP), which is N-glycosylated, was found in HepG2-F119L secretome compared to the control cells. These results suggest that HepG2-F119L represent a good cell model for CDG-Ia and a useful tool for drug screening since they are defective in N-glycosylation of serum proteins that are found altered in patients. Further studies will be performed to propose AFP as a suitable biomarker.

1. INTRODUZIONE

1.1 CDG-IA

Le glicoproteine giocano un ruolo chiave nelle cellule eucariotiche, essendo responsabili del riconoscimento, dell'adesione, dello sviluppo e dell'omeostasi cellulare. Difetti nella glicosilazione proteica determinano una varietà di disordini conosciuti collettivamente come disordini congeniti della glicosilazione (CDG). La forma più frequente, il disordine congenito della glicosilazione di tipo Ia (CDG-Ia) è caratterizzato da difetti nello sviluppo del sistema nervoso. Essa è una patologia causata da mutazioni a carico del gene codificante l'enzima fosfomannomutasi-2 (PMM2) che catalizza l'isomerizzazione del mannosio-6-fosfato (Man-6-P) in mannosio-1-P (Man-1-P), necessario alla biosintesi del GDP-mannosio e della molecola di LLO (Lipid-Linked Oligosaccharides).

I primi pazienti furono descritti dal pediatra belga Jaak Jaeken nel 1980 (J. Jaeken et al. 1980) e furono necessari 15 anni affinché la base biochimica venisse svelata e fosse identificato l'enzima difettoso, la fosfomannomutasi (PMM) (E. Van Schaftingen et al. 1995). Si comprese che una carenza di questo enzima citosolico porta ad un'interruzione precoce dell'assemblaggio degli N-glicani delle glicoproteine. Altri due anni più tardi, il gene fu clonato e la diagnosi della CDG-Ia (OMIM # 212065) fu confermata da studi mutazionali (Matthijs et al. 1997).

1.1.1 Caratteristiche biochimiche

Nella CDG-Ia, un gran numero di glicoproteine del siero sono glicosilate anormalmente, hanno concentrazioni o attività ridotte. L'ipoglicosilazione coinvolge proteine di trasporto, ormoni, fattori di coagulazione e trombotici, enzimi lisosomiali e inibitori enzimatici. Gli enzimi lisosomiali sono frequentemente elevati nel siero ma presenti in quantità ridotte nei leucociti, probabilmente a causa di un'insufficiente *uptake*. Rispetto ai controlli sani, i fibroblasti CDG-Ia contengono una maggiore quantità di glicosfingolipidi totali (GSLs) e una degradazione più lenta dei GLSs, il che suggerisce che il sistema metabolico cellulare potrebbe essere in grado di riequilibrare

parzialmente l'ipoglicosilazione proteica con una maggiore biosintesi dei glicosfingolipidi (Sala et al. 2002).

1.1.2 Sintomi

La maggior parte dei sottotipi di CDG incluso la CDG-Ia presenta una trasmissione autosomica recessiva ed è caratterizzata da un quadro clinico altamente variabile. La tabella 1 riporta i segni clinici e i sintomi associati alla patologia.

Neurology	Axial hypotonia; peripheral neuropathy; hyporeflexia; developmental delay; seizures; stroke-like events; micro- and macrocephaly; myopathy
Gastroenterology/hepatology	Failure to thrive; vomiting; protein-losing enteropathy; liver dysfunction; hepatomegaly; chronic diarrhoea
Neonatology	Hydrops; ascites; pleural effusions; multiorgan failure; failure to thrive; floppy baby
Haematology	Thrombocytopenia; coagulopathy; thrombosis; anaemia; leukocytosis
Endocrinology	Hyperinsulinaemic hypoglycaemia; hypothyroidism; hypergonadotropic hypogonadism; growth retardation
Clinical genetics	Mild dysmorphic facial features; inverted nipples
Orthopaedics	Osteopenia; joint contractures; kyphosis/scoliosis; short limbs; arthrogryposis
Ophthalmology	Abnormal eye movements; squint; cataract; retinitis pigmentosa; nystagmus; (transient) cortical blindness
Radiology	Small cerebellum, olivopontocerebellar hypoplasia; delayed myelinisation
Histology	Liver fibrosis; liver cirrhosis; lamellar inclusions in hepatocytes; renal microcysts
Dermatology	Abnormal fat distribution
Nephrology	Nephrotic syndrome; tubulopathy; cystic kidneys, enlarged kidney
Immunology	Recurrent infections; hypogammaglobulinaemia
Cardiology	Cardiomyopathy; pericardial effusions, cardiac ischemia, cardiac tamponade
Biochemistry	Hypoalbuminaemia; elevated transaminases; low cholesterol, triglycerides; decreased antithrombin III; decreased factor VIII, IX and XI; decreased protein C and S; elevated FSH, LH and prolactin; low free T4, increased ferritinaemia

Tabella I: Caratteristiche cliniche dei pazienti CDG-Ia (Stephanie Grünewald, 2001).

Spesso la diagnosi avviene nel periodo neonatale o infantile precoce sulla base di sintomi caratteristici quali strabismo, ipotonia assiale e iporeflessia. Una caratteristica molto comune è l'ipoplasia cerebellare, che può essere documentata alla nascita o poco dopo la nascita. La mortalità infantile è all'incirca pari al 20% ed è causata da infezioni gravi o insufficienza d'organo (Matthijs et al. 2000).

In età più avanzata, la compromissione del sistema neurologico diventa più evidente, con un grado variabile di ritardo mentale, disfunzione cerebellare e retinite pigmentosa (Fiumara et al. 1994).

Alcuni bambini sviluppano crisi convulsive e/o episodiche simili a ictus, probabilmente a causa della particolare coagulopatia con marcata diminuzione del fattore XI, antitrombina e proteine C e S. (Jaeken et al. 1993).

Nell'età adulta, l'ataxia non progressiva, il ritardo mentale stabile e la neuropatia periferica sono le principali caratteristiche della malattia (Stibler et al. 1994). I pazienti

adulti di sesso femminile presentano tipicamente ipogonadismo ipergonadotropo (de Zegher et al. 1995).

1.1.3 Diagnosi

1.1.3.1 Analisi della transferrina ipoglicosilata

Il test di screening più comunemente utilizzato per i disordini congeniti della N-glicosilazione è ancora l'isoelettrofocalizzazione (IEF) della transferrina. Le glicoforme della transferrina o di altre N-glicoproteine possono essere separate e visualizzate per IEF o per Western blotting/immunoprecipitazione. La glicoforma predominante della transferrina contiene quattro rami di oligosaccaridi (tetrasiyalotransferrina) su due glicani N-linked. L'ipoglicosilazione della transferrina provoca un deficit parziale dell'acido sialico terminale, carico negativamente e quindi uno spostamento catodico. Nei pazienti con CDG-I, c'è un aumento della glicoforma disialo- e asialotransferrina e una riduzione della tetrasiyalotransferrina (fig 1.1).

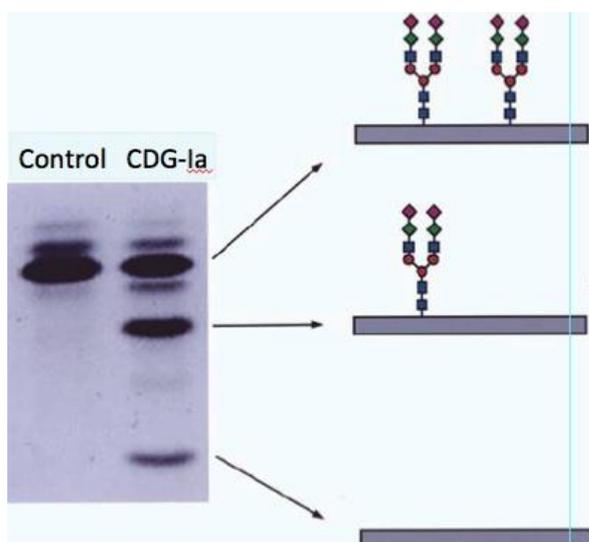


Fig. 1.1 Isoelectric focusing (IEF) della siero transferrina (T. Marquardt et al, 1999). Nei controlli la banda predominante è la tetrasiyalotransferrina. Nei pazienti CDG-Ia sono evidenti bande addizionali, corrispondenti alle isoforme disialo- e asialotransferrina. Come si vede dai diagrammi sulla destra, l'IEF non rivela il cambiamento strutturale dell'oligosaccaride legato. Poiché solo i residui terminali di acido sialico sono carichi, una anormale migrazione può

essere provocata da differenti alterazioni strutturali. Quadrati blu, GlcNAc; cerchi rossi, mannosio; rombi verdi, galattosio; rombi rosa, acido sialico; barra grigia, core proteico.

L'IEF della transferrina può differenziare tra CDG di tipo I (provocate da mutazioni a carico di uno degli enzimi implicati nella biosintesi di oligosaccaridi dolicol-lipidici) e pattern CDG di tipo II, quest'ultime dovute a difetti di processamento ed elaborazione dell' N-glicoproteina. Un pattern IEF falso positivo si può osservare nei disturbi secondari della glicosilazione come nella galattosemia non trattata, nell'intolleranza ereditaria al fruttosio, nella sindrome emolitico-uremica o nell'abuso di alcool. Sostituzioni amminoacidiche della transferrina possono anche alterare il pattern IEF. Le varianti proteiche in un individuo con sospetto di CDG possono essere escluse eseguendo l'IEF del sangue parenterale e/o la predigestione dei campioni di sangue con neuraminidasi (Marklova et al, 2007). Il pattern IEF in pazienti CDG-Ia può variare con l'età e può diventare meno ovvio. Inoltre un pattern IEF normale è stato riportato in alcuni pazienti con CDG-Ia confermata enzimaticamente e geneticamente (T. Dupre et al, 2000).

È importante sottolineare che l'IEF della transferrina ha dimostrato di essere inaffidabile nei neonati prematuri e nei neonati nelle prime settimane di vita, poiché sono stati osservati falsi negativi (P. Clayton et al., 1993).

La determinazione quantitativa dell'ipoglicosilazione della transferrina (carboidrato-deficienza-transferrina, CDT) è un metodo alternativo per rilevare i rapporti anormali di di-, mono- e asialotransferrina. Anche test immunoenzimatici (EIA) e dosaggi radioimmunologici (RIA) sono stati utilizzati per lo screening. Per ottimizzare il processamento dei campioni nei test di screening vengono utilizzati metodi semi-automatici come HPLC ed elettroforesi capillare (CE). La spettrometria di massa SELDI-TOF della transferrina immunoimmobilizzata su matrici di chip proteici si è dimostrata un metodo altamente sensibile, che potenzialmente potrebbe essere completamente automatizzato (K. Mills et al., 2006). Un test di screening positivo per CDG deve essere comunque seguito da test enzimatici e/o di genetica molecolare per confermarne il sottotipo specifico.

1.1.3.2 L'attività fosfomannomutasica nei fibroblasti e nei leucociti.

Dal 1995 è noto che un deficit della fosfomannomutasi è responsabile della CDG-Ia. Una ridotta attività di PMM può essere misurata nei fibroblasti, nei leucociti, negli amniociti e/o nel tessuto epatico dei pazienti come descritto da Van Schaftingen et al., 1995. Il deficit di PMM comporta dunque una forte riduzione del mannosio-1-P e quindi del pool di GDP-mannosio. I fibroblasti tuttavia non accumulano mannosio-6-fosfato ed è stato suggerito che la fosfomannosioisomerasi, l'enzima che agisce appena a monte della PMM, mantiene un equilibrio tra mannosio-6-P e fruttosio-6-P (C. Korner et al., 1998).

Per confermare la diagnosi è preferibile saggiare l'attività fosfomannomutasica nei leucociti, poiché i livelli enzimatici nei fibroblasti di pazienti CDG-Ia spesso si sovrappongono ai valori dei fibroblasti sani di controllo (S. Grunewald et al., 2001). Tuttavia l'attività fosfomannomutasica nei leucociti dei pazienti con mutazioni moderate della PMM2 può comunque sovrapporsi all'attività misurata nei portatori sani (A. Barnier et al., 2002).

1.1.3.3 Analisi delle mutazioni

L'identificazione del gene responsabile della CDG-Ia è stata complicata dalla somiglianza tra due geni, PMM2 e PMM1, che hanno un'omologia nella sequenza del 66%. Oggi è noto che solo le mutazioni a carico della PMM2 sono associate alla malattia.

L'incidenza di CDG-Ia è stata riportata come 1: 20.000 (E. Schollen et al., 2000), tuttavia è certamente ancora sottostimata. Il gene PMM2, si trova sul cromosoma 16p13.2, ha 8 esoni, una open reading frame di 738 coppie di basi che codificano per una proteina di 246 aminoacidi (G. Matthijs et al., 1997).

L'analisi molecolare ha rivelato un gran numero di mutazioni nei pazienti con CDG-Ia. Ci sono hot spot mutazionali nell'esone 5 e 8. Mutazioni missenso, delezioni, mutazioni di splicing e nonsense sono state tutte identificate. (F. Imtiaz et al., 2000; G. Matthijs et al., 2000).

In particolare sono state descritte più di 85 mutazioni *missense* per il gene che codifica per la PMM2 (J. Jaeken et al., 1984).

La mutazione più frequente è *R141H* nella quale l'arginina in posizione 141 viene sostituita da un'istidina. È presente in circa il 75% degli alleli dei pazienti dell'Europa centrale ed è ricorrente in alcune popolazioni, la frequenza dei portatori è 1 su 60 e 1 su 79 nelle popolazioni danesi e olandesi, rispettivamente (Le Bizec C et al., 2005). La mutazione in istidina, che inattiva l'enzima completamente, non è mai stata osservata in omozigosi probabilmente perché la totale assenza di PMM2 non è compatibile con la vita (Matthijs G et al., 1998 a). I portatori eterozigoti per la mutazione sono sani indicando così che il 50% di attività residua dell'enzima è sufficiente a prevenire i sintomi. La seconda mutazione più frequente, *F119L* (fenilalanina 119 in leucina) è comune nei paesi Scandinavi e del Nord Europa, e la sua incidenza diminuisce passando dal Nord al Sud del continente. F119L è stata osservata in pazienti omozigoti, ma è di gran lunga più comune in associazione con R141H (Matthijs G et al., 1998, b).

Alcune popolazioni hanno mutazioni predominanti come i pazienti scandinavi CDG-Ia che sono solitamente eterozigoti composti per le mutazioni R141H / F119L, invariabilmente associata ad un'attività PMM molto bassa e fenotipo malattia severo (Andreotti G et al., 2014). La mutazione D65Y ad esempio sembra essere limitata ai pazienti portoghesi e spagnoli CDG-Ia.

1.1.3.4 Analisi della struttura degli LLO

Attraverso l'analisi strutturale dell'oligosaccaride lipidico (LLO) è possibile individuare cambiamenti del pattern di glicosilazione e facilitare una diagnosi di CDG. I disordini congeniti della glicosilazione (CDG) sono infatti disordini ereditari in cui la sintesi degli LLO è difettiva. Poiché gli N-glicani derivano dalla molecola di LLO, mediante una particolare tecnica elettroforetica che prevede una marcatura degli oligosaccaridi per fluorescenza (*Fluorophore- assisted Carbohydrate Electrophoresis, FACE*) è possibile evidenziare un differente pool di N-glicani tra fibroblasti di controlli sani e pazienti CDG-Ia (N Gao et al., 2005).

1.1.3.5 Diagnosi prenatale

A causa di molteplici risultati conflittuali ottenuti per IEF noti in letteratura medica (M. Edwards et al., 2006) la diagnosi prenatale dovrebbe essere eseguita mediante analisi mutazionale con studi di linkage, utilizzando appositi marcatori polimorfici affiancati, utili anche alla rilevazione di un eventuale contaminazione del campione. L'analisi enzimatica della PMM in cellule di villi coriali o cellule amniotiche viene solitamente utilizzata come test prenatale (G. Matthijs et al., 2004).

1.1.4 Terapie

Ad oggi vi sono terapie disponibili solo per due dei sottotipi CDG, CDG- Ib e CDG-IIc. Per la CDG-Ib, l'addizione alimentare (300 -750 mg / kg / giorno) di mannosio elude la fase difettosa (conversione di F6P in M6P) consentendo la formazione di M6P tramite l'azione di esochinasi. Questi bambini, i cui sintomi principali sono la mancata crescita, le coagulopatie, l'enteropatia proteica e la fibrosi epatica, mostrano un notevole miglioramento quando iniziano la terapia. (Zimmer KP et al., 2002.)

La CDG-IIc deriva da un trasporto difettoso di membrana del GDP-L-Fucosio. Oltre al numero di leucociti ematici elevati e le infezioni batteriche ricorrenti, questi pazienti soffrono anche di ritardo mentale, possiedono una bassa statura e anomalie facciali caratteristiche.

L'integrazione alimentare con fucosio ha corretto il difetto immunologico in un paziente e ne ha migliorato anche i sintomi neurologici (Marquardt T. et al.,1999).

Il trattamento col mannosio è stato provato anche nei pazienti CDG-Ia, poiché i fibroblasti CDG-Ia adottano un normale fenotipo LLO quando incubati con alte concentrazioni di mannosio nel terreno di coltura (Panneerselvam K. et al.,1996).

Tuttavia la sperimentazione clinica ha subito una battuta d'arresto poiché non sono stati osservati miglioramenti clinici in questi bambini durante il trattamento (Mayatepek E. et al., 1998; Mayatepek E. et al., 1997; Kjaergaard S. et al., 1998,a).

La spiegazione probabile è che la PMI, l'enzima difettoso nella CDG-Ib, converte efficientemente l'M6P in fruttosio-6-fosfato, impedendo un aumento del pool di M6P, ostacolando una maggiore biosintesi di GDP-Man e Dol-Man.

L'integrazione alimentare diretta con M1P non è possibile poiché non è in grado di essere trasportato attraverso la membrana cellulare. Per superare questo problema, diversi gruppi di ricerca, hanno tentato di sintetizzare chimicamente composti M1P permeabili alla cellula e che sarebbero stati poi convertiti in M1P libero nella cellula (figura 1.2).

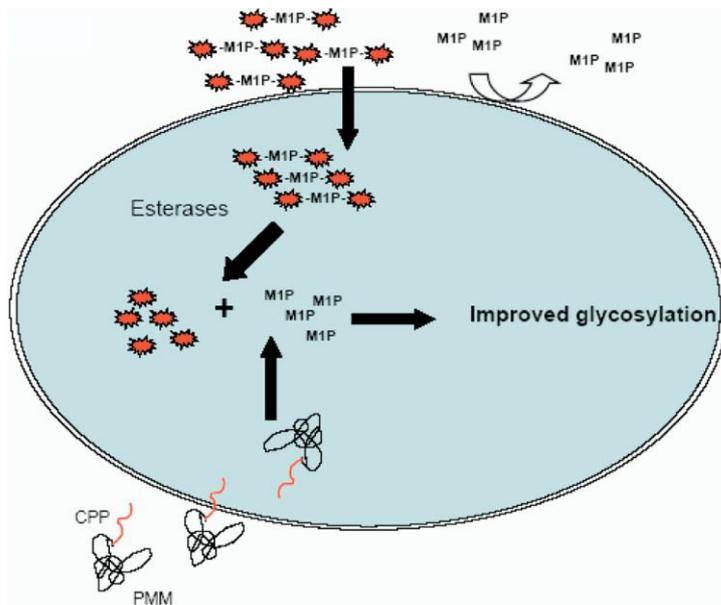


Fig.1.2. Strategie teoriche per trattare la CDG-Ia (Erik A. Eklund et al, 2006). Il M1P libero non è in grado di attraversare la membrana cellulare. Una strategia recentemente proposta per aumentarne la concentrazione intracellulare nei pazienti CDG-Ia prevede che il gruppo fosfato ed i gruppi ossidrilici siano mascherati mediante gruppi protettivi idrofobici. Il mannosio-6-fosfato così derivatizzato è in grado di attraversare la membrana e dopo l'entrata nelle cellule, esso viene idrolizzato dalle esterasi endogene rilasciando M1P libero, il quale potrebbe migliorare la glicosilazione difettiva. Un'altra strategia consiste nell'esprimere la PMM con un peptide cell-penetrating terminale (CPP), che ne permetterebbe l'ingresso nelle cellule. Se la PMM mantiene la sua attività catalitica, il pool di M1P potrebbe essere ristabilito.

Tutti i composti sintetizzati fino ad oggi sono troppo instabili per essere utili nella pratica clinica. Il composto migliore ha un'emivita nel siero di circa 2,5 minuti e richiederebbe pertanto l'integrazione continua di grandi quantità per mantenere i livelli terapeutici. Ciò è ulteriormente complicato dalle concentrazioni relativamente alte necessarie per ottenere un assorbimento sufficiente attraverso la membrana cellulare. Un terzo problema è infatti la tossicità di questi composti. Il composto più efficace sintetizzato finora mostra effetti negativi sulla sintesi proteica e sulla vitalità cellulare a concentrazioni superiori a 100 μM , cioè nello stesso intervallo della concentrazione terapeutica. Pertanto è necessario realizzare e testare più derivati del M1P.

Un'altra possibile cura potrebbe essere la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). Le proteine possono essere direttamente trasportate attraverso la membrana mediante l'aggiunta di peptidi segnale, piccoli frammenti cationici come evidenziano diversi risultati ottenuti in modelli murini (Schwarze SR et al., 1999). Pertanto una possibile strategia sarebbe trattare i pazienti direttamente con la PMM2 legata ad un peptide *cell-penetrating* (CPP) che ne consente l'entrata nelle cellule. Se la PMM2 preservasse la propria attività catalitica, potrebbe sopperire alla mancata funzionalità della proteina endogena mutata.

Non è noto se una quantità sufficiente di PMM2 sia in grado di entrare nelle cellule con una sequenza cationica attaccata, tuttavia questo potrebbe rivelarsi il trattamento di elezione se la terapia a base di composti M1P sintetici si dimostrasse impossibile.

Al momento quindi non è nota una terapia efficace.

1.2 N-glicosilazione

L'N-glicosilazione è una delle modifiche post-traduzionali delle proteine più comuni e importanti nelle cellule eucariotiche, la cui interruzione è alla base dei disordini congeniti della glicosilazione (CDG). Essa si verifica quando un oligosaccaride ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) viene aggiunto all'azoto di un residuo laterale di asparagina di una catena polipeptidica nascente nel ER. Tale modifica coinvolge principalmente proteine di secrezione e proteine di membrana e avviene nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi. È un processo co-traduzionale che migliora il *folding* proteico (figura 1.3), aumenta la

stabilità delle proteine rendendole meno suscettibili all'azione delle proteasi o determina la degradazione delle glicoproteine in caso di difetti di *folding*.

Diversi studi (Hanson SR et al, 2009) suggeriscono che i primi due o tre zuccheri di un N-glicano (quelli che sono direttamente adiacenti alle proteine) svolgono un ruolo intrinseco nell'accelerare il ripiegamento delle proteine e nello stabilizzarne la struttura risultante. Questi tre zuccheri prossimali, due residui di N-acetilglucosamina e un residuo di mannosio, formano un oligosaccaride *core* che è strettamente conservato fra gli N-glicani eucariotici. La natura altamente conservata di Asn-GlcNAc₂Man suggerisce che l'N-glicosilazione sia parte di una strategia generale per accelerare e stabilizzare intrinsecamente il ripiegamento delle proteine.

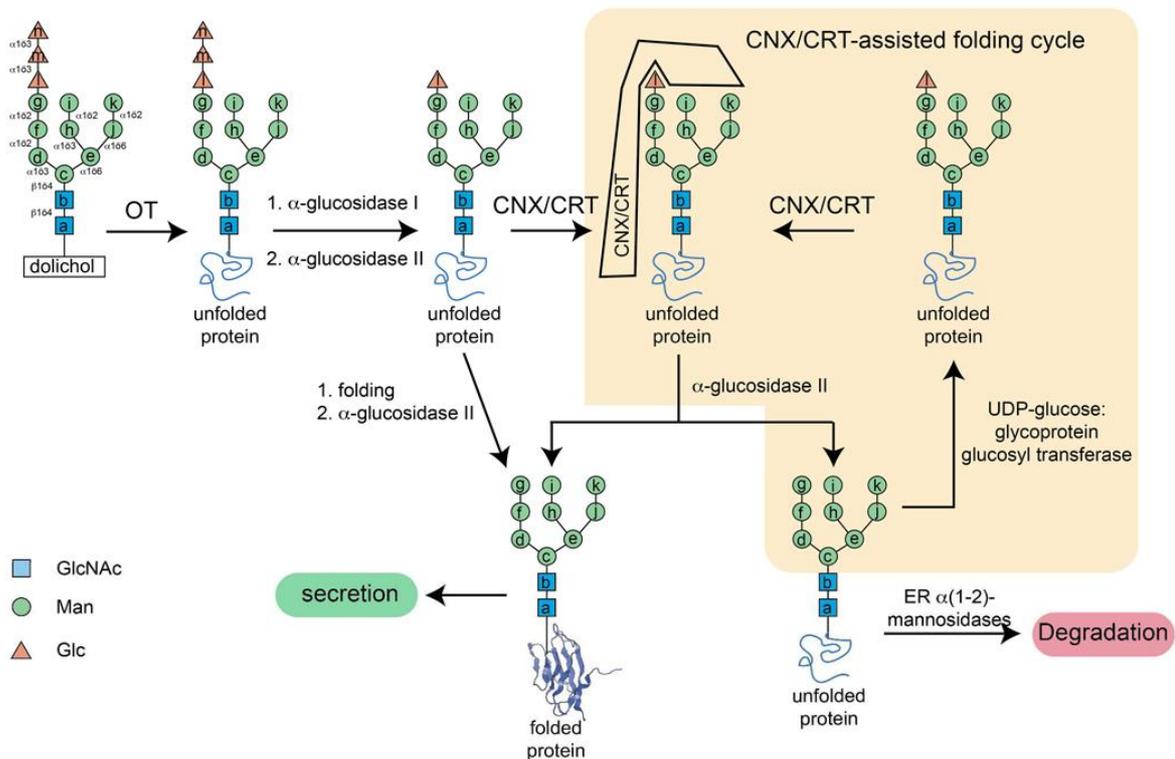


Fig. 1.3 Effetti estrinseci della N-glicosilazione: L'N-glicosilazione permette ad una glicoproteina di entrare nel ciclo di folding assistito da calnexina/calreticulina nel ER, che le permette di ripiegarsi ed essere secreta o di essere un bersaglio della degradazione se i tentativi di un corretto folding non hanno avuto successo.

L'oligosaccaride implicato in questo processo di N-glicosilazione è costituito da 14 zuccheri, in particolare:

- 3Glc (glucosio) terminali
- 9 Man (mannosio)
- 2 GlcNAc (N-acetilglucosamina) terminali

Si possono distinguere tre fasi: in primo luogo, il precursore oligosaccaridico Glc3Man9GlcNAc2 si lega alla membrana del reticolo endoplasmatico tramite un lipide fosforilato di membrana, conosciuto come dodicolo fosfato (un terpenoide) che funge da carrier lipidico. Così legati, l'oligosaccaride e il dodicolo, costituiscono il dodicol-lipide legato a l'oligosaccaride (dodicholLipid- LinkedOligosaccaride: LLO, in figura 1.4).

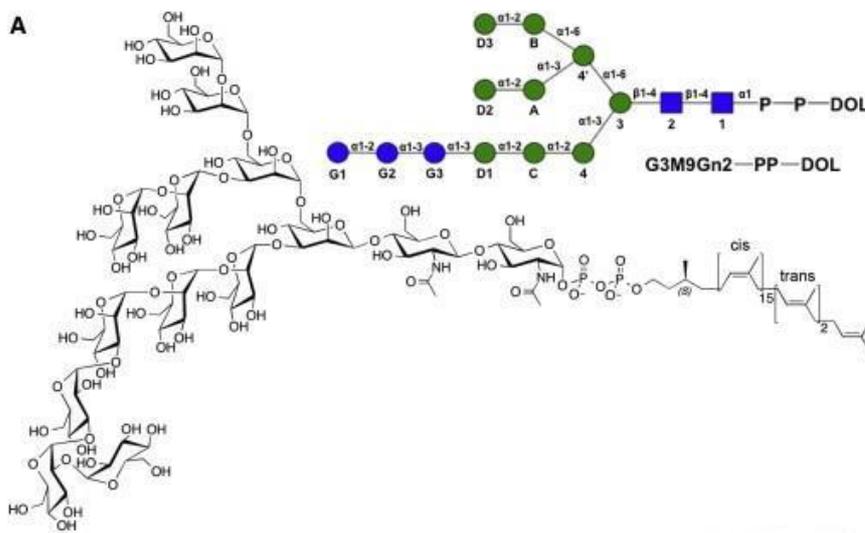


Fig. 1.4 Rappresentazione schematica e struttura chimica della molecola di LLO. (Kern et al. 2014) La molecola di LLO ($Glc_3Man_9GlcNAc_2-P-P$ -dolicolo) è un lipo-oligosaccaride ramificato, che lega una molecola di GlcNAc al fosfato terminale del lipide dolicolo. Il primo residuo di GlcNAc è legato ad un altro residuo di GlcNAc, a cui viene legato un mannosio. Il primo mannosio legato rappresenta il punto di ramificazione da cui partono le due ramificazioni di mannosio, una delle quali presenta 3 residui di Glc terminali.

In particolare l'oligosaccaride *core* si lega al dolicolo fosfato che lega a sua volta ad esempio il GDP-mannosio che funge da donatore di zucchero al dolicolo fosfato. Il complesso quindi si sposta, mediante "*flipping*" sul versante del lume e le altre molecole di mannosio sono aggiunte.

A questo punto, l'oligosaccaride complesso viene trasferito ai residui di asparagina target di glicoproteine nascenti. In questa reazione, il complesso enzimatico

oligosaccaril-transferasi (OligoSaccharyl-Trasferase: OST) riconosce la sequenza bersaglio (Asn-X-Ser; Asn-X-Thr; dove X rappresenta qualunque aminoacido tranne la prolina) e catalizza il trasferimento del precursore glicano in blocco dal carrier lipidico alla proteina.

Infine, il glicano N-linked viene ulteriormente modificato da una serie di reazioni di elongazione che iniziano nel reticolo endoplasmatico e continuano nel Golgi. Il dodicilo lipidico ha quindi un ruolo importante nel processo di sintesi dei precursori dell'oligosaccaride. Esso si realizza sulla membrana del ER e consta di 14 tappe, le prime sette sul lato citoplasmatico della membrana, mentre le ultime sette sul lato luminale della membrana. Quando si forma il prodotto intermedio del processo (man5GlcNAc2-PP-dodicolo o M5-DLO) avviene un "flip"(reversione) dell'oligolipide (figura 1.5) che dal citoplasma si affaccia al lume reticolare. Non è un meccanismo ben noto, tuttavia si sa che la proteina che media la traslocazione è diversa da quella implicata nella traslocazione di LLO. Ciò spiega come possa avvenire la glicosilazione all'interno del reticolo sebbene parte della sintesi dei precursori dell'N-glicano cominci nel citosol.

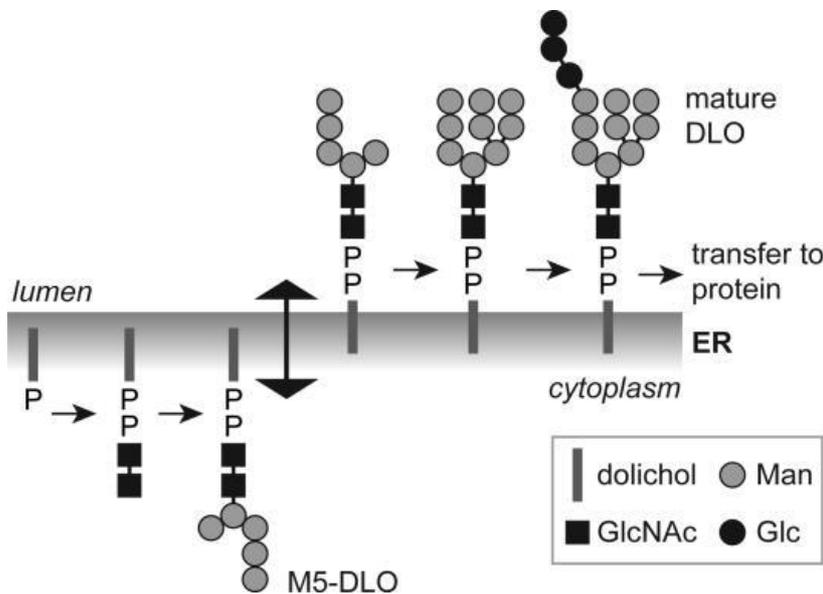
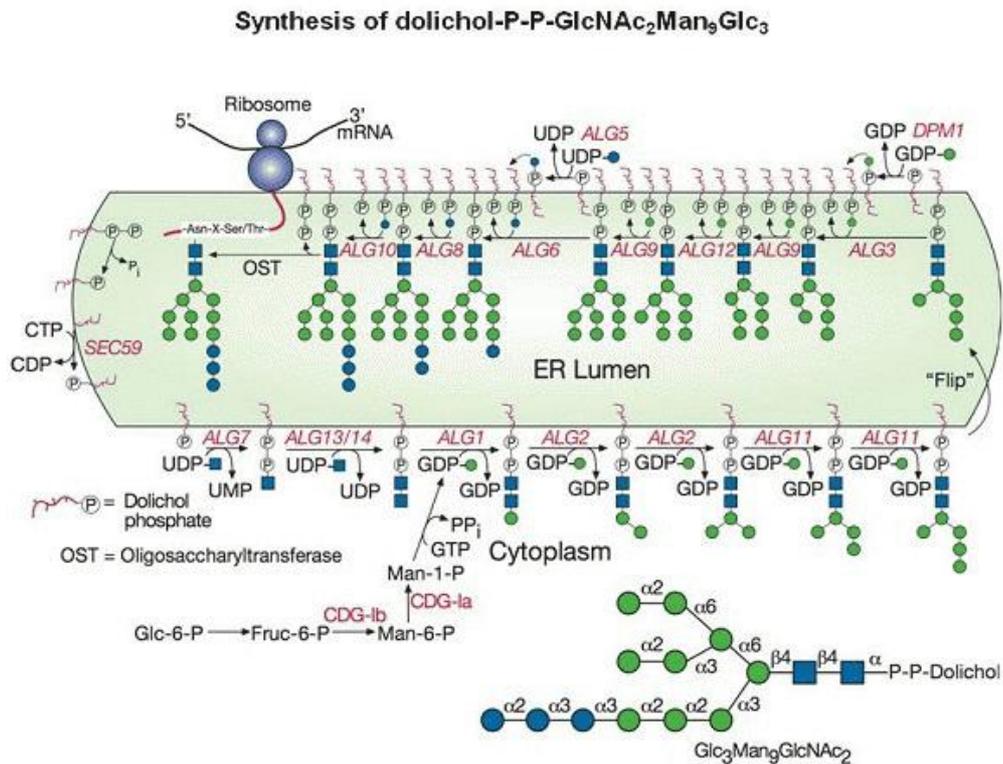


Fig. 1.5 Flipping dell' M5-DLO: Il lipide Dolicholo presenta una parte trans-membrana e due porzioni extramembrana, una rivolta verso il lume reticolare e l'altra verso il citoplasma. A quest'ultima si legheranno i due fosfati e poi gli zuccheri precursori (man5GlcNAc2). Le due porzioni extramembrana vengono riorientate a metà processo di sintesi dei precursori, per cui

la porzione con i fosfati e gli zuccheri precursori legati (M5-DLO) si ritroveranno sul lato luminale dove procede la sintesi della molecola di LLO

La sintesi della molecola LLO (Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-dolicolo) è schematizzata nella figura 1.6 La maggior parte degli zuccheri (tranne i primi due che sono legati a UDP) che vengono legati alla catena nascente, sono tutti zuccheri legati a GDP, quindi per ogni reazione di addizione sarà rilasciato GDP (UMP e UDP, rispettivamente nella prima e seconda reazione). Particolare interesse merita la terza reazione nella quale è implicato l'enzima responsabile del disturbo congenito della glicosilazione di tipo Ia (CDG-Ia), nonché l'enzima su cui si basa il progetto di ricerca, ovvero la fosfomannomutasi (PMM) descritta in maniera approfondita nel paragrafo 1.3.



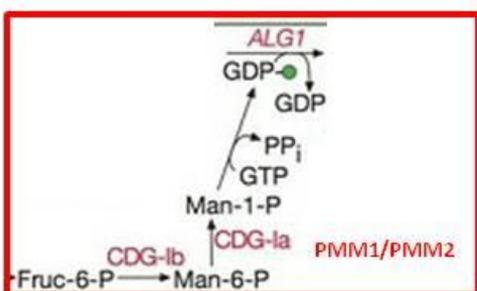


Fig. 1.6: Sintesi di LLO con particolare riferito alla PMM

1.3 PMM2 e PMM1

La fosfomannomutasi umana (PMM) è un'isomerasi che in presenza di uno zucchero bisfosfato attivatore, catalizza la conversione del D-mannosio 6-fosfato (Man-6-P) in α -D-mannosio 1-fosfato (α -Man-1-P), richiesto per la sintesi del GDP-mannosio e dei dolicol fosfati (figura 1.7).

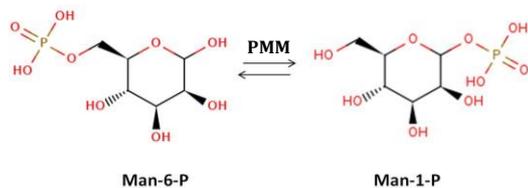
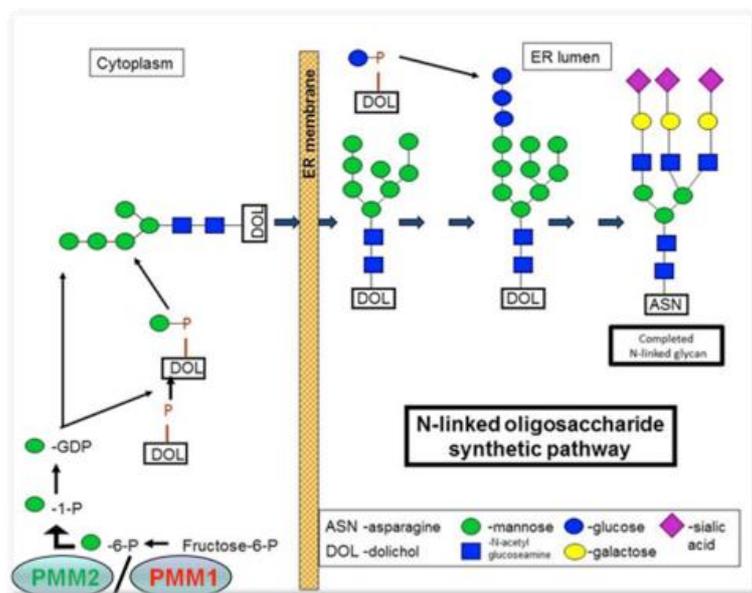


Fig. 1.7 Ruolo biologico della PMM e reazione catalizzata dall'enzima.

Sono state individuate due isoforme di PMM; la PMM1 e la PMM2, che possiedono un'identità di sequenza del 65%. Sebbene entrambi gli isoenzimi catalizzino la stessa reazione, la PMM2 è molto più specifica per il substrato (M. Pirard et al., 1999). e la sua distribuzione tissutale è diversa (K. Cromphout et al., 2005). La PMM2 è espressa in tutti i tessuti, mentre l'espressione della PMM1 è limitata al cervello, polmoni, fegato, pancreas e ghiandole endocrine. Il ruolo della PMM1 deve ancora essere chiarito (Pirard M et al., 1999).

PMM2 e PMM1 si sono evoluti per duplicazione genica e si trovano sui cromosomi 16p13 (Kjaergaard S et al., 1998,b) e 22q11-13 rispettivamente mentre sul cromosoma 18 è presente uno pseudo-gene processato simile a PMM2 (Quental R. et al; 2010).

La struttura a raggi X della PMM1 è stata determinata in assenza di ligandi (2FUC) e in presenza di Man-1-P (2FUE), quella della PMM2 (2AMY) è stata determinata in assenza di ligandi, tuttavia un modello della proteina complessata con Glc-1,6-P₂ è stata recentemente ottenuta (Van Schaftingen E. et al, 1995).

Entrambi gli enzimi richiedono uno zucchero bisfosfato come attivatore, il glucosio 1,6 bifosfato (Glc-1,6-P₂) o il mannosio 1,6 bifosfato (Man-1,6-P₂) e catalizzano la conversione *in vitro* di glucosio 1-fosfato (Glc-1-P) in glucosio 6-fosfato (Glc-6-P), *in vivo* di Man-1-P in Man-6-P (figura 1.8).

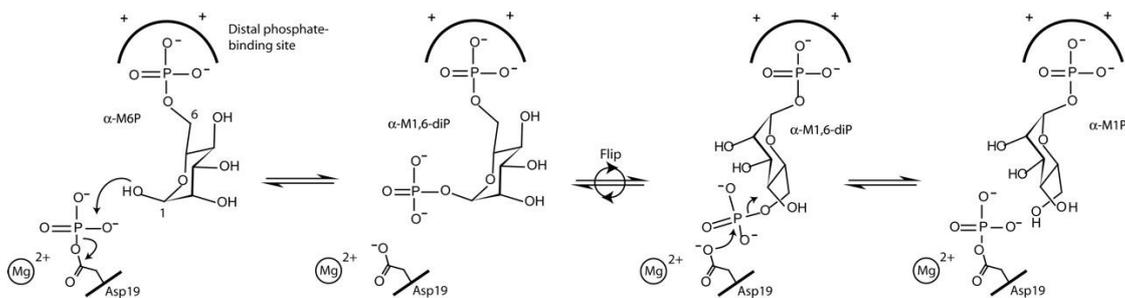


Fig. 1.8 Meccanismo della reazione di isomerizzazione del mannosio-6-fosfato in mannosio-1-fosfato catalizzata dalla PMM2 (Silvaggi et al. 2006). Le posizioni C-1 e C-6 sullo zucchero esoso sono evidenziate nel primo step.

Solo la PMM1 possiede un'ulteriore attività fosfatase con la quale è in grado di idrolizzare il Glc-1,6-P₂ e il Man-1,6-P₂. Quest'ultima attività risulta potenziata da

concentrazioni crescenti di inosina monofosfato (IMP) (Veiga-da-Cunha M. et al, 2008).

La PMM appartiene alla superfamiglia delle *haloalkanoic acid dehalogenase* (HADSF), che si distinguono sia strutturalmente che funzionalmente dagli enzimi fosfomanno/fosfoglucosidasi della superfamiglia di fosfoesomutasi che sono parte integrante della glicolisi nei procarioti e negli eucarioti (Dai, J. B. et al.,1992) e della biosintesi di alginato nei batteri Gram-negativi (Naught, L. E. et al., 2001).

La **PMM-1** presenta una struttura dimerica; ciascun monomero di 29.7 kDa, analogamente alla maggior parte dei membri della superfamiglia delle HADSF, consiste di due domini, un dominio *core* e un dominio *cap* più piccolo (fig 1.9).

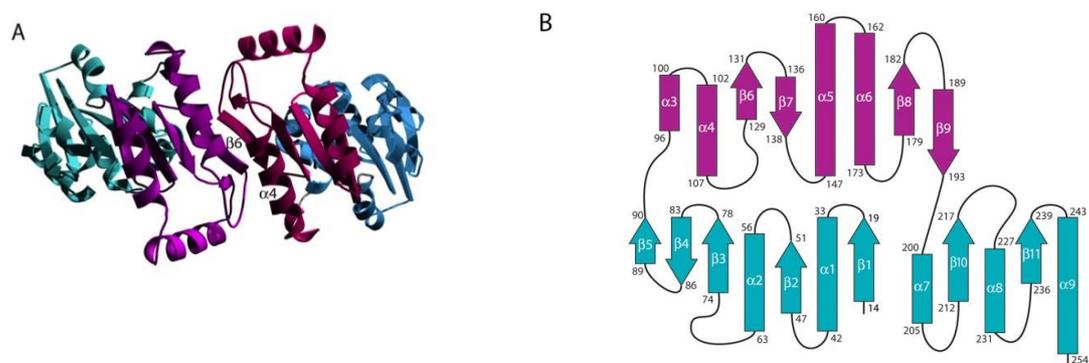


Fig 1.9 (Silvaggi et al, 2006): A, struttura della PMM1; il cap domain è colorato in magenta, il core domain in azzurro per il monomero A, il cap domain è colorato in rosso, il core domain in blu per il monomero B. B, rappresentazione schematica dell'arrangiamento della struttura secondaria di un monomero della PMM1.

Il dominio *core* (aa1-90 e 198-262) consiste di 6 foglietti β paralleli affiancati da 5 α -eliche con tipiche connessioni β - α - β . Il dominio *cap* (aa 95-194) si inserisce tra il foglietto β 5 e l'elica α 7 del dominio *core*. Gli elementi della struttura secondaria sono disposti in modo tale da formare un foglietto β antiparallelo a 4 filamenti (β 6- β 7 e β 8- β 9), sovrastato da 3 α -eliche (α 4- α 6). La proteina forma un omodimero con l'interfaccia costituita esclusivamente da interazioni tra i domini *cap* (Figura 1.9 A). Le due maggiori interazioni dell'interfaccia del dimero sono: un'interazione *helix-helix* tra le prime alpha-eliche (α 4) e un'interazione foglietto β -antiparallelo tra i primi foglietti β antiparalleli (β 6) dei due domini *cap*. La stessa interfaccia di dimerizzazione può essere osservata nella struttura della **PMM2** umana, dimostrando che questa è una caratteristica conservata nelle due fosfomannomutasi dell'uomo. Sulla base di

precedenti studi sul processo catalitico in altri enzimi HADSF, è noto che il dominio *cap* deve dissociarsi dal dominio *core* per consentire al substrato di legarsi, per poi associarsi nuovamente al fine di proteggere il sito attivo dal solvente acquoso (Lu, Z. et al.,2005). Una delle mutazioni malattia più frequenti a carico della PMM2, F119L (Phe128 in PMM1), si trova al livello dell'interfaccia del dimero (Figura 1.10), evidenziando l'importanza potenziale della struttura quaternaria per la funzione e / o la stabilità della proteina).

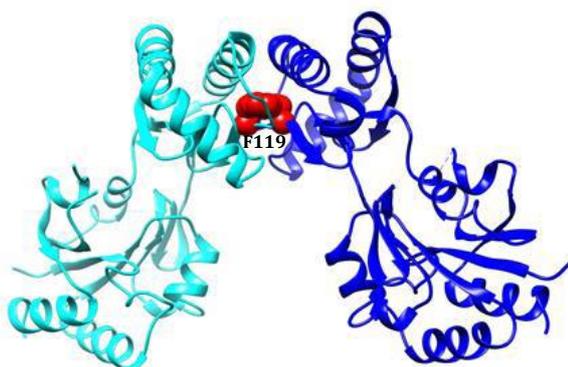


Fig 1.10: Struttura tridimensionale della PMM2 determinata per diffrazione a raggi X: *In blu e in azzurro i due monomeri, in rosso il residuo F119.*

Una porzione del dominio *cap* che dovrebbe contattare il dominio *core* nella PMM possiede un gran numero di residui caricati positivamente. Questi includono i tre residui conservati Arg150, Arg143 e Arg132 nella PMM1 e Arg141, Arg134 e Arg123 nella PMM2. Ci si potrebbe aspettare che sulla superficie del dominio *core* vi siano residui con carica negativa complementare; tuttavia, la corrispondente superficie del *core* conserva una carica complessiva positiva fornita dai residui conservati Arg28 e Lys58 nella PMM1 e Arg21 e Lys51 nella PMM2. Quindi, piuttosto che agire come un "gancio", queste due superfici possono agire come un cuneo elettrostatico che mantiene il corretto orientamento interdominio. Infatti l'importanza di questi residui nella funzionalità proteica è evidenziata dal fatto che la mutazione R141H (Arg150 nella PMM1) è stata classificata come una delle principali mutazioni malattia della PMM2. Il sito catalitico è situato nell'interfaccia tra il dominio *cap* e il dominio *core*. È stato dimostrato che per la PMM1 il substrato fosforilato Man-1-P interagisce principalmente con il dominio *cap* e non con la porzione del dominio *core* nel sito attivo. Una volta che

il substrato si è legato, in virtù di un attacco nucleofilo all'Asp19, si forma l'intermedio bisfosfato Man-1,6-P₂ e si ha una variazione conformazionale nella regione di cerniera che spinge il substrato nel sito catalitico, mentre il *cap* si lega al *core*. Le strutture complessive dei due isoenzimi sono molto simili; l'interfaccia dimerica, i motivi del sito attivo, e le regioni cerniera sono altamente conservate.

1.4 I mutanti di PMM1 e PMM2

Mutazioni a carico della PMM2 sono associate alla CDG-Ia. I pazienti sono generalmente omozigoti per una mutazione ipomorfa o eterozigoti composti per una mutazione ipomorfa e una amorfa. L'attività enzimatica residua è sempre misurata nei pazienti. (Yuste-Checa P et al., 2015).

Mutazioni inattivanti non sono mai state osservate in omozigosi probabilmente perché la totale assenza dell'attività della PMM2 non è compatibile con la vita (Matthijs G et al., 1998).

Al contrario mutazioni nella PMM1 non sono mai state associate a patologie umane né alla CDG-Ia. Queste osservazioni sono state confermate da studi compiuti in modelli murini, nei quali il knock-out della PMM2 ha causato una mortalità embrionale precoce (Thiel C et al., 2006) mentre il knock-out della PMM1 non ha avuto effetti deleteri. (Cromphout K et al., 2006). Sfortunatamente il ruolo della PMM1 nonché il suo effetto sulle mutazioni ipomorfe della PMM2 non è stato ancora studiato.

I numerosi siti mutazionali della PMM2, noti per essere associati alla CDG-Ia, non sono localizzati in una particolare regione della struttura proteica, bensì sono distribuiti in tutta la struttura. Sulla base della loro localizzazione, le mutazioni clinicamente rilevanti possono essere classificate sulla base del legame del substrato e della catalisi, della dimerizzazione o della stabilità della proteina. Le varianti più severe, R141H e D188G appartengono alla prima categoria, così come R123G. Arg141 è una parte cruciale del sito di legame al fosfato distale e la perdita della carica positiva in questa posizione compromette il legame del substrato. Infatti il valore della costante di Michaelis-Menten per il Man-1-P è aumentato di circa 10 volte nel mutante R141H che pertanto si definisce amorfo. L'effetto della mutazione D188G è altrettanto drammatico.

Tale residuo è adiacente al motivo 3 lisina, che è necessario per il corretto orientamento dell'aspartato nucleofilo.

È anche probabile che la mutazione R123G influisca sul legame del substrato, poiché interagisce con l'ossidrilico C-2 del Man-1-P.

Delle mutazioni che sembrano destabilizzare il dimero, F119L determina l'effetto deleterio massimo, dato che questo residuo è localizzato nell'interfaccia tra i due monomeri e una sua mutazione rende il dimero maggiormente debole.

Le mutazioni che influenzano il folding e / o la stabilità della proteina sono V129M, V44A , D65Y e V231M. Queste mutazioni cadono all'interno del dominio *cap* o del dominio *core* e quindi risultano particolarmente dannose per la conformazione nativa. Infine, una mutazione, F183S sembra essere unica in quanto è in grado di alterare l'interazione interdominio richiesta per la variazione conformazionale necessaria per il legame del substrato e dunque il processo catalitico. In particolare sono state descritte più di 85 mutazioni *missense* per il gene che codifica per la PMM2, alcune delle quali sono riportate in (tabella 2).

Mutation	Description
C241S	the mutant shows 60% residual activity the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
D209G	inactive, the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
D65Y	the mutant shows 20% residual activity the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
E197A	the mutant has wild type activity
F157S	inactive, the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
F207S	inactive, the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
L32R	the mutant shows 45% residual activity the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
P113L	the mutant shows 43% residual activity, the mutation is associated with

	phosphomannomutase 2 deficiency
P184T	inactive, the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
R123Q	inactive, the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
R141H	inactive, the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
T118S	the mutant shows 1% residual activity the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
T237M	the mutant shows 48% residual activity the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency
V44A	the mutant shows 16% residual activity the mutation is associated with phosphomannomutase 2 deficiency

Tabella 2: alcune delle mutazioni *missense* del gene PMM2 associate a PMM2-CDG.

2. SCOPO DEL PROGETTO

Sebbene nessuna mutazione a carico della PMM1 sia mai stata associata alla patologia, il primo obiettivo di questo progetto consiste nel chiarire il ruolo della proteina nella CDG-IA. La PMM1 potrebbe infatti avere da un lato un effetto benefico contribuendo all'isomerizzazione del Man-6-P grazie alla sua attività fosfomannomutasi, dall'altro un effetto deleterio a causa dell'idrolisi dell'attivatore bisfosfato della PMM2. Inoltre questa attività fosfatasi è aumentata dall'inosina monofosfato (IMP) che potrebbe giocare dunque un ruolo chiave nella sintesi del man-1-P e nella glicosilazione delle proteine. Allo scopo di comprendere la relazione tra la PMM1 e la PMM2, le due proteine sono state purificate da *E.coli* e caratterizzate dal punto di vista funzionale mediante convenzionali saggi di attività spettrofotometrici e tecniche innovative quali la spettroscopia di risonanza magnetica ^{31}P -NMR, che ci ha permesso di studiare per la prima volta la reazione enzimatica nella direzione biologica, e il thermal shift assay

(TSA) che ci ha consentito di confrontarne la stabilità. Inoltre per indagare sul ruolo dell'IMP, sono stati identificati i residui della PMM1 responsabili del legame alla molecola e per validare tale ipotesi abbiamo prodotto un triplo mutante M186Q-N218D-E219K-PMM1 (QDK-PMM1), il quale è risultato possedere sia l'attività fosfomannomutasi che l'attività fosfatasi, tuttavia non è risultato essere sensibile all'IMP. Data la difficoltà di un'inibizione selettiva della PMM1 in virtù dell'analogia strutturale con la PMM2, per valutare l'effetto di una riduzione dell'attività fosfatasi della PMM1 su un mutante ipomorfo della PMM2, è stata prodotta attraverso la metodica del CRISPR-CAS9 una linea cellulare di fibroblasti di paziente CDG-IA knockout per la PMM1.

La seconda parte del presente progetto di ricerca è incentrata invece sullo sviluppo di un nuovo sistema cellulare modello per la CDG-IA e la ricerca di nuovi potenziali biomarcatori. Finora le cellule più frequentemente utilizzate per lo studio della CDG-IA sono state i fibroblasti derivati dai pazienti. Queste linee cellulari possiedono sempre una mutazione ipomorfa in quanto la completa assenza di attività fosfomannomutasi risulta incompatibile con la vita. Tuttavia, gli effetti di una ridotta N-glicosilazione dovuta a mutazioni ipomorfe a carico della PMM2 risultano quasi sempre meno evidenti nei fibroblasti (Marquardt et al.,1995; Gao et al.,2005) rispetto alle cellule caratterizzate da una elevata secrezione proteica. Gli epatociti infatti producono proteine del siero che sono state trovate ipoglicosilate nei pazienti e pertanto potrebbero rappresentare un modello cellulare migliore per il *drug discovery* e per la ricerca di un biomarcatore. Dunque nella seconda parte di questo lavoro, la linea cellulare di epatocarcinoma umano HepG2 è stata modificata geneticamente attraverso il sistema di Crispr/Cas9 allo scopo di introdurre una mutazione ipomorfa a carico della PMM2 per produrre un modello cellulare utile alla scoperta di farmaci e di un potenziale biomarcatore.

3. MATERIALI e METODI

3.1 Confronto biochimico e funzionale tra i due enzimi paraloghi PMM1 e PMM2 per delucidare il rispettivo ruolo nella CDG-IA.

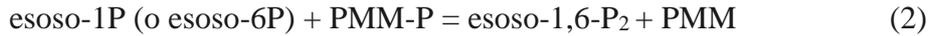
3.1.1 Espressione delle proteine e purificazione proteica

Gli enzimi wild type PMM2 e PMM1 e il triplo mutante QDK-PMM1 sono stati espressi in *E. coli* BL21(DE3), ceppo cresciuto a 37°C in brodo LB contenente ampicillina 0.2 mg/ml. L'espressione e purificazione delle proteine wild type è stata realizzata come descritto (Silvaggi NR et al, 2006; Andreotti G et al, 2013) con lievi cambiamenti. La purificazione del triplo mutante QDK-PMM1 è stata messa a punto. Le colture cellulari sono state poi centrifugate e i risultanti pellet sono stati prima lavati in PBS, poi enzimaticamente lisati in presenza di lisozima 1 mg/ml (in Hepes 50 mM pH 7.5 contenente 2-mercaptoetanolo 0.1 mM, EDTA 1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 mM, glicerolo 5%). L'estratto grezzo è stato trattato con DNAsiI 0.005 mg/ml, poi l'ammonio solfato è stato aggiunto all'omogenato fino al 50% di saturazione. Il precipitato è stato recuperato, risospeso in buffer, dializzato in Hepes 50 mM pH 7.1 contenente MgCl₂ 5 mM, 2-mercaptoetanolo 1 mM, glicerolo 1%, e caricato su colonna DEAE-Sepharose equilibrata col medesimo tampone. È stato applicato poi un gradiente (0–0.7 M NaCl). Sono stati eseguiti saggi funzionali per isolare specifiche frazioni cromatografiche, le quali dopo l'aggiunta di ammonio solfato al 20%, sono state caricate su colonna Butyl-Sepharose equilibrata con Tris 50 mM pH 7.1 contenente MgCl₂ 5 mM, 2-mercaptoetanolo 1 mM, ammonio solfato 20%, glicerolo 5%. Un gradiente (20–0% ammonio solfato) è stato applicato e le frazioni attive, valutate anche mediante SDS-PAGE, sono state riunite, dializzate (in tampone contenente glicerolo 5%), concentrate e conservate a -20°C.

3.1.2 Saggi di attività enzimatica

La PMM1 e la PMM2 possiedono tre attività enzimatiche:





Attività fosfomannomutaseica: (1) + (2), esoso = mannosio

Attività fosfoglucomutaseica: (1) + (2), esoso = glucosio

Attività fosfataseica: (1) + (3), esoso = mannosio o glucosio

Tutte le attività enzimatiche sono state determinate spettrofotometricamente a 340nm seguendo la riduzione del NADP⁺ a NADPH in una miscela di reazione incubata a 32°C e contenente Hepes 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, NADP⁺ 0.25 mM, BSA 0.1 mg/ml in presenza di un'appropriata concentrazione di substrati/attivatori (specificata volta per volta) e gli enzimi ancillari necessari.

In particolare, l'attività fosfomannomutaseica (fig 3.1) (utilizzando Man-1-P come substrato e Man-1,6-P₂ o Glc-1,6-P₂ come attivatore) è stata misurata in presenza di 2.6 U/ml di glucosio 6-fosfato deidrogenasi, 3.7 U/ml di fosfoglucomutaseica e 0.003 mg/ml di fosfomannosio isomerasi.

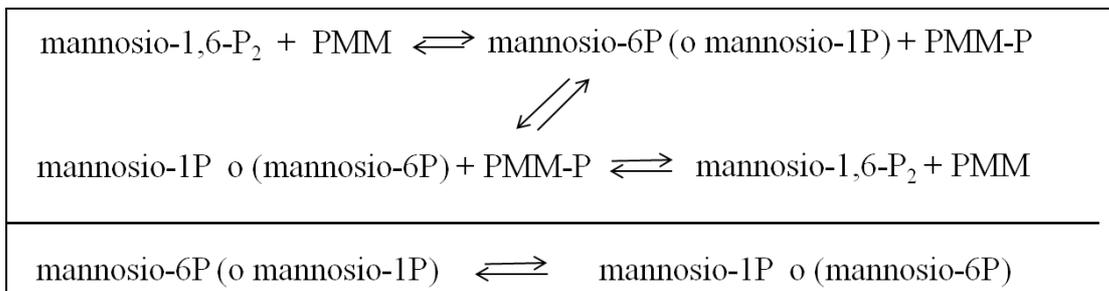


Fig. 3.1 Attività fosfomannomutaseica

L'attività fosfoglucomutaseica in fig 3.2 (usando Glc-1-P come substrato e Glc-1,6-P₂ come attivatore) è stata misurata in presenza di 2.6 U/ml di glucosio 6-fosfato deidrogenasi.

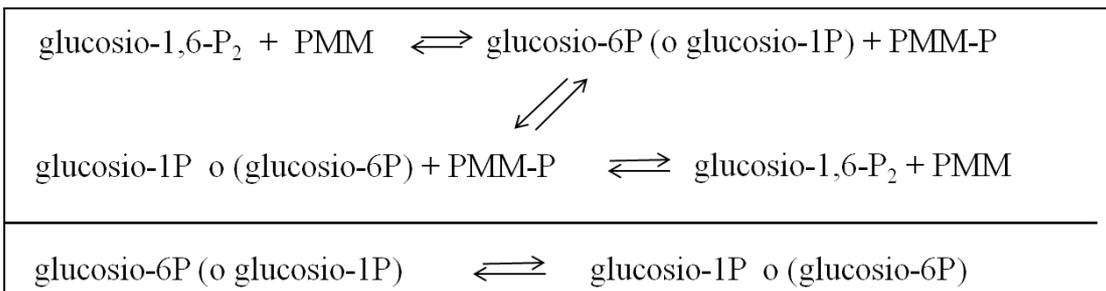


Figura 3.2 Attività fosfoglucomutastica

L'attività fosfatase (fig 3.3) è stata misurata in presenza di Man-1,6-P₂ aggiungendo 2.6 U/ml di glucosio 6-fosfato deidrogenasi, 3.7 U/ml di fosfoglucoisomerasi e 0.003 mg/ml di fosfomannosio isomerasi. Alternativamente l'attività fosfatase è stata misurata in presenza di Glc-1,6-P₂ aggiungendo 2.6 U/ml di glucosio 6-fosfato deidrogenasi e 0.034 U/ml di fosfoglucomutasi. In entrambi i casi, l'attività è stata misurata anche in presenza di IMP 0.17 mM.

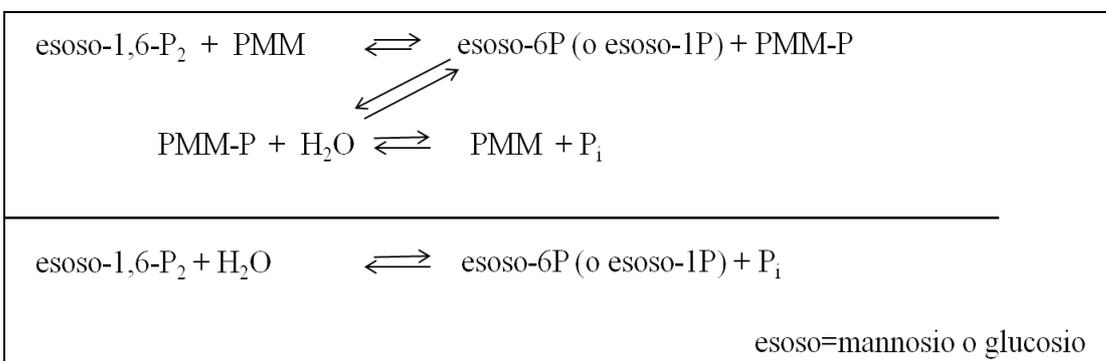


Fig. 3.3 Attività fosfatase

3.1.3 Spettroscopia NMR ³¹P

Gli spettri del ³¹P monodimensionali, ¹H-disaccoppiati, sono stati registrati a 161.976 MHz con uno spettrometro Bruker AVANCETMIII HD 400MHz, dotato di una sonda BBO BB-H&F-D CryoProbeTM Prodigy con un gradiente lungo l'asse Z, ad una temperatura della sonda di 27°C. Questa temperatura, più bassa di quella utilizzata nei saggi spettrofotometrici, è stata scelta allo scopo di minimizzare l'inattivazione degli enzimi durante l'accumulazione degli spettri. Sono stati utilizzati un'ampiezza degli

spettri di 120 ppm, un tempo di *delay* di 1.2 s, un'ampiezza degli impulsi di 12.0 μ s. La fosfocreatina e 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ al 10% sono stati aggiunti ai campioni come controlli interni (0 ppm). Tali esperimenti sono stati eseguiti in collaborazione con il servizio NMR dell'istituto ICB-CNR [Institute of Biomolecular Chemistry – National Research Council, Pozzuoli (NA) Italy].

3.1.4 Thermal Shift Assay

I profili di melting sono stati registrati in differenti condizioni mediante thermal shift assay con il sistema StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems). Le proteine (PMM2, PMM1 o QDK-PMM1, 0.5 mg/mL concentrazione finale) sono state equilibrate in Hepes 20 mM pH 7.5, MgCl_2 1 mM, NaCl 150 mM, dithiothreitol 1 mM, Sypro Orange 2.4x, poi aliquotate in PCR-strip da 0.2 ml (compatibili con lo strumento). L'appropriata soluzione del ligando (in acqua) è stata aggiunta (volume finale di 0.025 ml per campione) e i campioni una volta sigillati sono stati riscaldati 20 a 90° ad 1°C/min con incrementi di 0.6°C. L'esperimento è stato eseguito per la PMM1 e la PMM2 in presenza di Glc-1,6-P₂ in un range da 0 a 1 mM. La PMM1 e il triplo mutante QDK-PMM1 sono stati analizzati in presenza di: nessun ligando, Glc-1-P 0.5 mM, Glc-1-P 0.5 mM più vanadato 0.5 mM, vanadato 0.5 mM, Glc-1,6-P₂ 0.5 mM, IMP 0.17 mM.

3.2 Delezione della PMM1 in fibroblasti derivati da un paziente CDG-IA mediante il sistema Crispr/Cas9

3.2.1 Colture cellulari

La linea cellulare di fibroblasti derivati da un paziente CDG-IA è stata cresciuta in RPMI implementato con FBS 10%, streptomina (100ug/ml) e penicillina (100U/mL) a 37°C in atmosfera umidificata al 95% e al 5% di CO₂.

3.2.2 KO della PMM1 in fibroblasti CDG-Ia mediante Crispr/Cas9

Fibroblasti umani omozigoti per la mutazione ipomorfa della PMM2 (*F119L/F119L*)

sono stati cotrasfettati per elettroporazione con gRNA1/gRNA2/scramble e il vettore donatore seguendo il protocollo fornito dall' OriGene. Dopo la selezione in puromicina (0,3µg/mL), le cellule resistenti sono state analizzate per PCR per validare l' inserzione genomica della cassetta funzionale. Per l' amplificazione sono stati utilizzati i seguenti primer: PCR F: 5'- AGAGATGGCCACAAACCTTG-3', PCR R: 5'- GCTGCCATCCAGATCGTTAT -3'. La PCR è stata condotta a: 95 °C × 5 min, 40 cicli a 95 °C × 30 s, 63 °C × 30 s, e 72 °C × 30 s.

E' stato poi eseguito uno screening per PCR per verificare la corretta integrazione della cassetta funzionale. Per l' amplificazione sono stati utilizzati i seguenti primer: PCR F: 5'- CGAGGTTTCTCCATGTTGGT -3', PCR R: 5'- GCCTTTGGTGCTCTTCATCT -3'. La PCR è stata condotta come descritto precedentemente.

3.2.3 Screening dei cloni ko-PMM1 per qPCR

I campioni risultati positivi dall' analisi per PCR sono stati propagati, sono stati isolati singoli cloni per diluizioni seriali e successivamente sono stati analizzati per qPCR allo scopo di misurare l' efficienza del knock-out della *PMM1*.

Il reagente TRizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) è stato utilizzato per estrarre l' RNA totale dalle cellule. Un kit di retrotrascrizione (FastLane Cell cDNA kit, QIAGEN) è stato utilizzato per retrotrascrivere il cDNA a partire da 1µg di RNA. La Quantitative real-time PCR (qPCR) è stata eseguita utilizzando il SYBR Green Supermix Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) ed i seguenti primer: *PMM1* F: 5'- GTGGGCGGCTCTGACTACT -3', R: 5'- TTCTGGATGGTCTGCTTGGAGAG -3'; *RPLP0* F: 5'- GACGGATTACACCTTCCCACTT-3', R: 5'- GGCAGATGGATCAGCCAAGA-3'.

I relativi livelli di mRNA sono stati calcolati dai *cycle threshold* (numero di Ct) mediante il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Livak et al, 2001). *RPLP0* è stato utilizzato per normalizzare i dati di espressione genica.

3.2.4 Screening dei cloni ko-PMM1 per western blotting

I campioni sono stati analizzati per western blotting allo scopo di validare l'assenza della PMM1 nei cloni scelti.

Le cellule sono state raccolte e lisate in RIPA buffer (1x) in presenza di inibitori di proteasi. L'estratto proteico è stato separato per SDS-PAGE al 12% e trasferito su membrana PVDF. Le membrane sono state saturate in una soluzione di latte in polvere senza grassi al 5% in T-TBS 0.05% per 30 minuti e successivamente incubate con un anticorpo policlonale anti PMM-1 prodotto in coniglio (ab202058 abcam) e un anticorpo IgG HRP-coniugato anti-rabbit prodotto in capra (Bio-Rad 1706515). Le membrane sono state poi opportunamente lavate e sviluppate per chemiluminescenza intensificata (ECL, *Enhanced ChemiLuminescence*); lo sviluppo è avvenuto al *ChemiDoc™ MP System* della Biorad.

L' α -tubulina (T6074, Sigma) è stata rivelata mediante un anticorpo monoclonale IgG HRP-coniugato anti-mouse (115-035-062, Jackson ImmunoResearch). Tutti gli altri reagenti utilizzati provengono dalla Bio-Rad.

3.3 Generazione di un nuovo sistema cellulare modello mediante il sistema Crispr/Cas9 per introdurre una mutazione ipomorfa nel gene *PMM2*.

3.3.1 Hepg2 genome editing attraverso il sistema Crispr/Cas9

Allo scopo di modificare il genoma delle Hepg2 e introdurre una mutazione ipomorfa (c.357 C>A , F119L) nel gene codificante per la PMM2, una singola guida di RNA (gRNA) per la regione bersaglio adiacente al codone F119, è stata disegnata utilizzando il Design tool (<http://tools.genome-engineering.org>) e la piattaforma Dharmacon Edit-R CRISPR-Cas9. La sequenza del gRNA gRNA-GAATTCAATGAAAGTACCCC è stata clonata nel vettore plasmidico pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459). Il donatore stampo per il sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HDR), contenente la sostituzione nucleotidica richiesta (c.357 C>A) e una mutazione silente C>T nella sequenza PAM (*Protospacer adjacent motif*), necessaria ad impedire che la nucleasi Cas9 continui a tagliare anche dopo la riparazione HDR e che introduce un sito di restrizione per *DdeI*, è

stato sintetizzato come DNA a singolo filamento (ssDNA, 5'CGTTCTTCTTGGCTGCAGCTTCTTCCAATAGGGGACACGTTTAAACA TCCCATTTTCGGAATTCAATTAAGTACCCCTGAGAATGAAAGGGTGACAGA GTTTCTCCAAAACACGTTATTC-3'). Il risultante vettore plasmidico CRISPR/Cas9 e il donatore stampo a singolo filamento sono stati elettroporati nelle cellule HepG2 mediante il sistema *Neon transfection* (1200 V, 1 pulse, 50 ms width; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dopo 48 ore dalla trasfezione, è stata aggiunta puromicina 0,75 ng/ml per selezionare le cellule. Completata la selezione, sono stati isolati singoli cloni, propagati ed è stato poi eseguito uno screening per PCR. Per l'amplificazione sono stati utilizzati i seguenti primer: PCR F: 5'-GCACAGAGCTGAGAAACATT-3', PCR R: 5'-TGC GTTCTTCTTGGCTGCAGC-3'. La PCR è stata condotta a: 95 °C × 5 min, 40 cicli a 95 °C × 30 s, 63 °C × 30 s, e 72 °C × 30 s. Gli amplificati ottenuti sono stati analizzati per digestione enzimatica con DdeI allo scopo di validare l'inserzione del donatore su gel d'agarosio.

Successivamente è stata controllata l'introduzione della mutazione puntiforme mediante sequenziamento di Sanger.

Una valutazione dei possibili siti *off-target* generati dalla metodica CRISPR/Cas9 è stata eseguita utilizzando lo strumento MIT CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu>). Sono stati scelti tutti i potenziali siti *off-target*, presenti nelle regioni codificanti per proteine, con punteggi più elevati e le regioni geniche sono state amplificate per PCR utilizzando i primer riportati di seguito (fig 3.4) a: 95 °C × 5 min e 35 cicli di 95 °C × 30 s, 63 °C × 30 s, 72 °C × 30 s. La regione amplificata è stata poi controllata mediante sequenziamento di Sanger.

Off target sites present in coding regions.

off target candidate	5'- Target sequence-3'	UCSC gene	mismatches	score	primer for	rev
	GAATTC AATGAAAGTACCCCTGG		X			
1	GAATTGATGACAGTACCCCGG	NM_001042404	3	0.5	ccaagcaagttgaggaacaa	tgccatcattcctgtTTGAA
2	GATTTTAATGTAAGTACCTCAGG	NR_073040	4	0.2	cattgatgaatcagcgaagg	gctgatcaagtaacttggaa
3	GACTTCAAGAAAGTAAACATGG	NR_045127	4	0.2	cgggcagatgccagtaaat	tccagaccaagaggtggaag
4	GAATTCATGTAAGTACCCAAAG	NM_005045	4	0.1	tgtgatgccatgataggaaga	ttttggcaacaaaattagtga
5	GAAGTCAATAAAGTTGCCCTGG	NM_000297	4	0.1	ttaccctccttctatcc	ctgggaatcattgcaactT
6	GAAATCATGAAATATCCCGG	NM_001243203	4	0.1	ctcgcactgactctctc	cctcaaacccagaGGACAAA
7	GAATTAATAAACTACCTCCAG	NM_012397	4	0.0	cacatacttgggccccttt	tctcaaaaaccCGAGGTAA
8	GAGTTCAATGGAACCCCAAG	NM_001130850	4	0.0	gcccctggTAAACTCCTGT	cactcctgcttcttcaaca
9	GAATTC AATTAAGTGGCTCAGG	NM_001123	4	0.0	tttgtgcaactCACAGAAGG	tcaagcttaaccaataaccaagaa
10	GAATCAATGAAAACGCTCGG	NM_177531	4	0.0	agaagccattgaggcattg	tggaagtcagcttgctgtaaa
11	GAATTCATGAAACTCCCTGG	NR_045208	4	0.0	gggaatgaacagagggcaaa	ccagctggGTGAGAAGAAAG

Fig3.4 Siti off-target nelle regioni codificanti per proteine

3.3.2 Colture cellulari

Le cellule di epatocarcinoma umano (HepG2) e la linea modificata mediante il sistema Crispr-Cas9 (HepG2-F119L) sono state cresciute in DMEM implementato con FBS 10%, streptomina (100ug/ml) e penicillina (100U/mL) a 37°C in atmosfera umidificata al 95% e al 5% di CO₂.

3.3.4 Analisi per qPCR dell'espressione della PMM2

Il reagente TRizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) è stato utilizzato per estrarre l'RNA totale dalle HepG2 e le HepG2-F119L. Un kit di retrotrascrizione (FastLane Cell cDNA kit, QIAGEN) è stato utilizzato per retrotrascrivere il cDNA a partire da 1ug di RNA. La Quantitative real-time PCR (qPCR) è stata eseguita utilizzando il SYBR Green Supermix Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) ed i seguenti primer: *PMM2* F: 5'-AAGAAGCTGCAGCCAAGAAG-3', R: 5'-GCCACCTGGCATAGTTTTGT-3'; *RPLP0* F: 5'-GACGGATTACACCTTCCCACTT-3', R: 5'-GGCAGATGGATCAGCCAAGA-3'.

I relativi livelli di mRNA sono stati calcolati dai *cycle threshold* (numero di Ct) mediante il metodo del 2^{-ΔΔCt}. (Livak et al, 2001). *RPLP0* è stato utilizzato per normalizzare i dati di espressione genica.

3.3.5 Analisi per western blotting dell'espressione della PMM2

Le cellule sono state raccolte e lisate in RIPA buffer (1x) in presenza di inibitori di proteasi. L'estratto proteico è stato separato per SDS-PAGE al 12% e trasferito su membrana PVDF. Le membrane sono state saturate in una soluzione di latte in polvere senza grassi al 5% in T-TBS 0.05% per 30 minuti e successivamente incubate con un anticorpo policlonale anti PMM-2 prodotto in coniglio (*10666-IAP* Proteintech) e un anticorpo IgG HRP-coniugato anti-rabbit prodotto in capra (Bio-Rad 1706515). Le membrane sono state poi opportunamente lavate e sviluppate per chemiluminescenza

intensificata (ECL, *Enhanced ChemiLuminescence*); lo sviluppo è avvenuto al *ChemiDoc™ MP System* della Biorad.

L' α -tubulina (T6074, Sigma) è stata rivelata mediante un anticorpo monoclonale IgG HRP-coniugato anti-mouse (115-035-062, Jackson ImmunoResearch). Tutti gli altri reagenti utilizzati provengono dalla Bio-Rad.

3.3.6 Saggi di attività fosfomannomutastica

Le cellule HepG2 e le HepG2-F119L sono state raccolte e lisate in buffer *cOmplete™ Lysis-M* (Roche) come da protocollo e gli estratti proteici ottenuti, opportunamente quantizzati attraverso un *Bio-Rad Protein Assay*, sono stati saggiati in presenza di Man-1-P 0.2mM e Man-1,6-P2 10 μ M allo spettrofluorimetro *Cary Eclipse* per attività fosfomannomutastica (exc 340nm, em 445nm; slit 10/20; t.a.; 120'). I dati ottenuti ($\Delta F/min$) sono stati normalizzati per i μ g di proteine saggiate.

3.3.7 Determinazione dell'attività fosfomannomutastica mediante spettroscopia ^{31}P -NMR

L'uso della spettroscopia ^{31}P -NMR permette di misurare l'attività fosfomannomutastica nella direzione biologica. Infatti il mannosio-6-fosfato risulta distinguibile dal mannosio-1-fosfato. L'attività enzimatica è stata misurata utilizzando come substrato Man-1-P 1 mM e Glc-1,6-P2 0.01 mM come attivatore a 27°C in HEPES 20 mM pH 7.5 MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM, fosfocreatinina 1 mM come standard interno, 2H_2O 10%. 90 μ g di estratto proteico di HepG2 e HepG2-F119L sono stati incubati con la miscela di reazione per 120 minuti. La reazione è stata interrotta per aggiunta di EDTA 0.5M e gli enzimi sono stati inattivati per riscaldamento a 60°C per 5 minuti. Gli spettri del ^{31}P monodimensionali, 1H -disaccoppiati sono stati acquisiti come descritto nel paragrafo 3.1.3. L'assegnazione dei picchi è stata condotta attraverso il confronto con le molecole isolate. L'integrazione dei picchi è stata eseguita per un'analisi quantitativa. Tali esperimenti sono stati eseguiti in collaborazione con il servizio NMR dell'istituto ICB-CNR [Institute of Biomolecular Chemistry – National Research Council, Pozzuoli (NA) Italy].

3.4 Determinazione di potenziali biomarcatori N-glicosilati nella nuova linea di HepG2 CDG-Ia

3.4.1 Analisi secretoma per SDS-PAGE

Le cellule HepG2 e le HepG2-F119L cresciute come descritto nel paragrafo 3.3.2, dopo essere state accuratamente lavate in PBS, sono state incubate per 24 ore in DMEM senza FBS (#31053-028, Gibco). Il mezzo condizionato è stato poi raccolto e centrifugato per 5' a 500g allo scopo di allontanare i detriti cellulari. 700ng dei secretomi sono stati separati per SDS-PAGE al 10% e le proteine sono state rilevate mediante l'utilizzo del colorante SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen), secondo il protocollo. Le immagini sono state acquisite al *ChemIDoc™ MP System* della Biorad utilizzando il *SYPRO® photographic filter* (S6656).

3.4.2 Microscopia confocale e quantizzazione della fluorescenza emessa dalle lectine

Le cellule HepG2 e le HepG2-F119L sono state seminate alla densità di 50000 cellule per pozzetto in una 24-multiwell. Dopo 24 ore le cellule sono state lavate 3 volte in PBS e fissate in paraformaldeide al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS le cellule sono state incubate in concanavalina A (Con-A) (Concanavalin-A, Alexa Fluor™ 594 Conjugate, Invitrogen) o *Ricinus Communis Agglutinin 120* (RCA-120) (biotinylated *Ricinus communis* agglutinin-120, Vector Lab) per 10 minuti a temperatura ambiente, lavate tre volte in PBS e poi fissate su vetrini con 10 µl di moviol. Una soluzione di 4,6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) 10 µg/mL diluita in PBS è stata utilizzata per colorare i nuclei. Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale invertito *Zeiss LSM510* (Carl Zeiss, Gottingen, Germany). L'intensità della fluorescenza totale emessa è stata determinata automaticamente utilizzando la funzione istogramma del software *LSM510-3.2* (Zeiss) e selezionando manualmente l'area corrispondente. I dati sono stati normalizzati per il numero di cellule. I risultati ottenuti provengono da esperimenti condotti in triplicato biologico. La

significatività statistica è stata assegnata utilizzando il test-t di Student. *P values* minori di 0.05 sono stati considerati significativi e identificati con un asterisco (*) nelle figure.

4. RISULTATI

4.1 Confronto biochimico e funzionale tra i due enzimi paraloghi PMM1 e PMM2 per delucidare il rispettivo ruolo nella CDG-IA.

4.1.1 Caratterizzazione funzionale mediante spettroscopia ^{31}P -NMR

L'attività delle proteine PMM1 e PMM2 è stata analizzata registrando spettri ^{31}P -NMR. Tali esperimenti richiedono l'accumulazione di diverse scansioni per ogni spettro ^{31}P -NMR allo scopo di ottenere un buon rapporto S/N. Non possono essere utilizzati per misurare le velocità iniziali, tuttavia possiedono il vantaggio di poter monitorare tutte le molecole contenente il ^{31}P . Gli esperimenti sono stati eseguiti registrando gli spettri dei substrati, aggiungendo l'enzima ai substrati, sigillando il tubo NMR e iniziando l'acquisizione degli spettri.

La figura 4.1 mostra gli esperimenti condotti per monitorare l'isomerizzazione del Man-6-P 1mM in presenza di Glc-1,6-P₂ 0.1 mM: pannello A e C sono gli spettri dei substrati, pannello B e D sono gli spettri accumulati per 40 minuti dopo l'aggiunta della PMM1 o PMM2 rispettivamente.

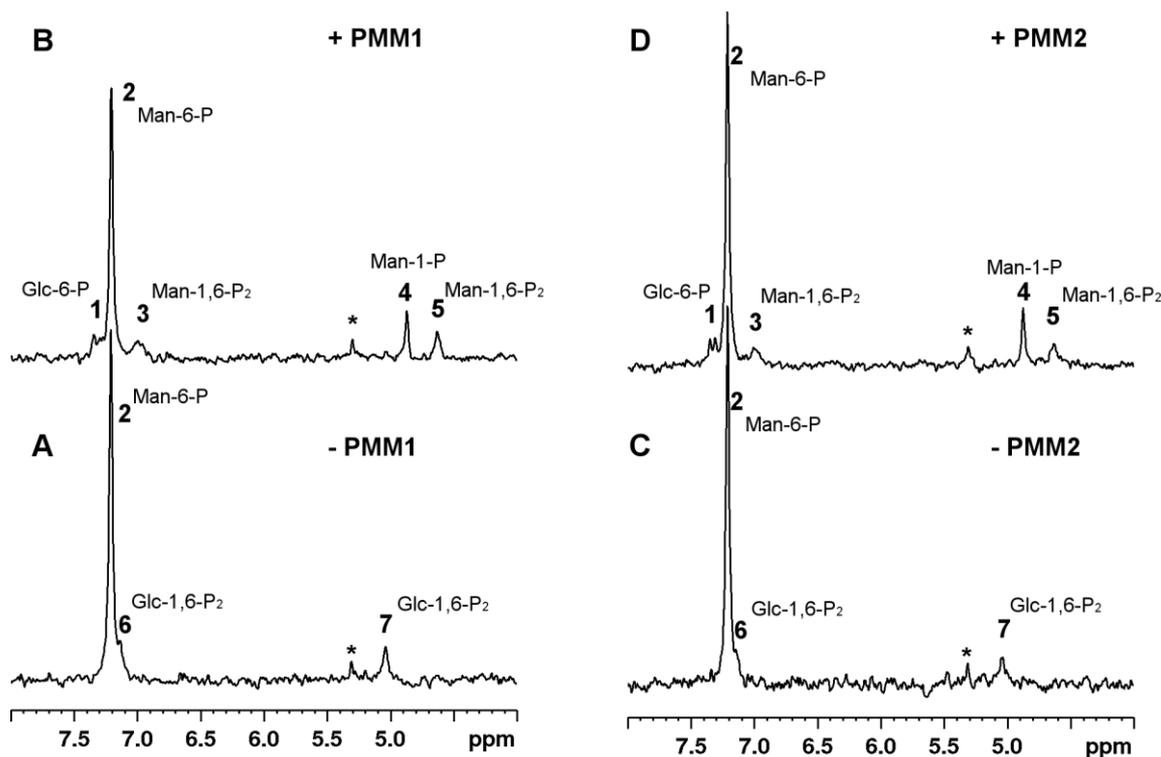


Fig 4.1 Monitoraggio dell'attività fosfomannomutase della PMM1 e PMM2 mediante analisi dei livelli di Man-6-P con spettroscopia ^{31}P -NMR, (Citro V et al, 2017). PMM1 o PMM2 (54 μg) sono stati incubati con Man-6-P 1mM e Glc-1,6-P₂ 0.1 mM at 27°C. Pannello A) Spettro dei reagenti prima dell'aggiunta della PMM1. Pannello B) Spettro dei prodotti dopo l'aggiunta della PMM1. Pannello C) Spettro dei reagenti prima dell'aggiunta di PMM2. Pannello D) Spettro dei prodotti dopo l'aggiunta della PMM2. Gli spettri sono stati accumulati per oltre 40 min. Creatina fosfato (1 mM) è stata aggiunta come standard interno e tutti gli spettri si rapportano ad essa (0 ppm). Le assegnazioni dei picchi sono state ottenute per confronto coi dati delle sostanze pure. 1, Glc-6-P; 2, Man-6-P; 3 and 5, Man-1,6-P₂; 4, Man-1-P; 6 and 7, Glc-1,6-P₂; *, fosfato inorganico.

Quando la PMM1 (Fig 4.1, pannello B) viene aggiunta alla miscela di reazione contenente Man-6-P e Glc-1,6-P₂ (Fig 4.1, pannello A), il prodotto Man-1-P (picco 4, Fig 4.1, pannello B) come anche il Man-1,6-P₂ (picco 3 e 5, Fig 4.1, pannello B) si formano. La formazione del Glc-6-P (picco 1, Fig 4.1 pannello B e D) derivante dal Glc-1,6-P₂ può essere osservata.

Un risultato simile è stato ottenuto con la PMM2: quando la PMM2 (Fig 4.1, pannello D) viene aggiunta alla miscela di reazione (Fig 4.1, pannello C), il prodotto Man-1-P (picco 4, Fig 4.1, pannello D) come anche Man-1,6-P₂ (picco 3 e 5, Fig 4.1, pannello D)

si formano.

I segnali del Man-1-P e Man-6-P sono stati integrati e il loro rapporto è stato calcolato: l'equilibrio risulta spostato verso il Man-6-P ($\text{Man-6-P/Man-1-P} = 8.52 \pm 0.45$). Come atteso, questo valore non dipende dall'enzima impiegato ed è stabile nel tempo. Dopo 40 minuti l'attivatore Man-1,6-P₂, che risulta necessario per la catalisi, è ancora presente assicurando così che una costante concentrazione del substrato e del prodotto sia dovuta al raggiungimento dell'equilibrio dinamico e non al fermarsi dell'azione dell'enzima. Quando l'esperimento è stato eseguito con la PMM1 e dopo un'incubazione più lunga, 330 min, il picco del Man-1,6-P₂ non è stato rilevabile.

La Fig 4.2 mostra l'esperimento eseguito per monitorare l'isomerizzazione del Man-1-P in presenza di Glc-1,6-P₂: pannelli A e C sono gli spettri dei substrati, pannelli B e D sono gli spettri accumulati per 40 minuti dopo l'aggiunzione di PMM1 o PMM2 rispettivamente.

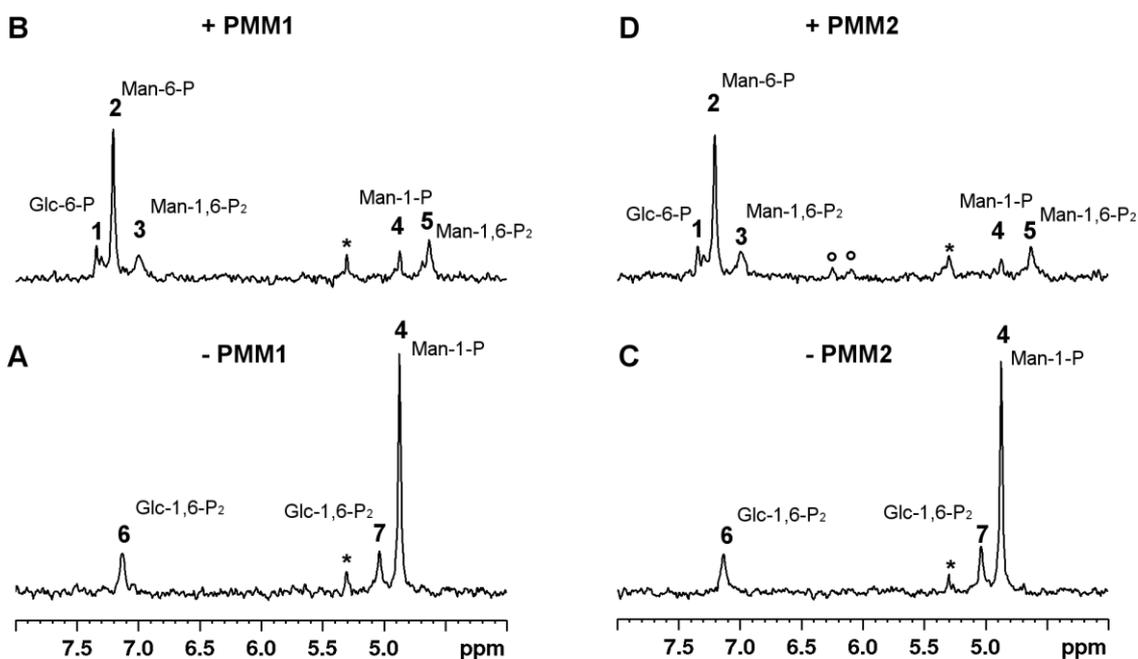


Fig 4.2 Attività fosfomannomutasi di PMM1 e PMM2 con Man-1-P monitorata per spettroscopia ³¹P-NMR (Citro V et al, 2017). PMM1 o PMM2 (54 µg) sono stati incubati con Man-1-P 0.5mM e Glc-1,6-P₂ 0.1 mM a 27°C. Pannello A) Spettro dei reagenti prima dell'aggiunzione della PMM1. Pannello B) Spettro dei prodotti dopo l'aggiunzione della PMM1. Pannello C) Spettro dei reagenti prima dell'aggiunzione di PMM2. Pannello D) Spettro dei

prodotti dopo l'aggiunta della PMM2. Gli spettri sono stati accumulati per oltre 40 min. Creatina fosfato (1 mM) è stata aggiunta come standard interno e tutti gli spettri si rapportano ad essa (0 ppm). Le assegnazioni dei picchi sono state ottenute per confronto coi dati delle sostanze pure. **1**, Glc-6-P; **2**, Man-6-P; **3 and 5**, Man-1,6-P₂; **4**, Man-1-P; **6 and 7**, Glc-1,6-P₂; *, fosfato inorganico, °, picchi indefiniti.

Quando la PMM1 è stata incubata con Man-1-P 0.5 mM e Glc-1,6-P₂ 0.1 mM, il Man-6-P (picco 2, Fig 4.2, pannello B) come il Man-1,6-P₂ (picco 3 e 5, Fig 4.2, pannello B) si sono formati.

Lo stesso è accaduto con la PMM2 (Fig 4.2, pannello D): la formazione del Man-6-P (picco 2) e Man-1,6-P₂ (picco 3 e 5) è stata misurata con l'accumulazione di Glc-6-P (picco 1).

La costante di equilibrio (Man-6-P/Man-1-P = 10.87±1.51) calcolata in questa direzione (M6P→M1P) è comparabile a quella misurata nella direzione opposta come atteso.

L'attività fosfatasica della PMM1 è stata monitorata per ³¹P NMR in presenza o in assenza di IMP. Vale la pena ricordare che i *chemical shift* misurati per il fosfato inorganico (P_i) e per il Glc-1-P sono molto simili tra loro al valore di pH utilizzato per i saggi enzimatici che portano alla coalescenza dei due picchi, per cui verrà utilizzata la notazione Glc-1-P + P_i.

Fig 4.3 mostra gli esperimenti eseguiti per monitorare l'idrolisi del Glc-1,6-P₂ con o senza IMP: pannelli A e C sono gli spettri dei substrati, pannelli B e D sono gli spettri accumulati per 40 minuti dall'aggiunta della PMM1.

Quando la PMM1 viene incubata con Glc-1,6-P₂ in presenza di IMP, il consumo completo di Glc-1,6-P₂ (picco 1 e 2, Fig 4.3, pannello A) accompagnato dalla formazione del Glc-6-P (picco 4, Fig 4.3, pannello B) e Glc-1-P+P_i (picco 3, Fig 4.3, pannello B) è stato misurato. L'esperimento condotto in assenza di IMP (Fig 4.3, pannelli C e D) ha mostrato la formazione di sole piccole quantità di Glc-6-P (picco 4, pannello D, Fig 4.3) e Glc-1-P+P_i (picco 3, Pannello D, Fig 4.3), accompagnato da un consumo appena rilevabile di Glc-1,6-P₂. Nelle stesse condizioni, la PMM2 non ha idrolizzato il Glc-1,6-P₂ sia in presenza che in assenza di IMP.

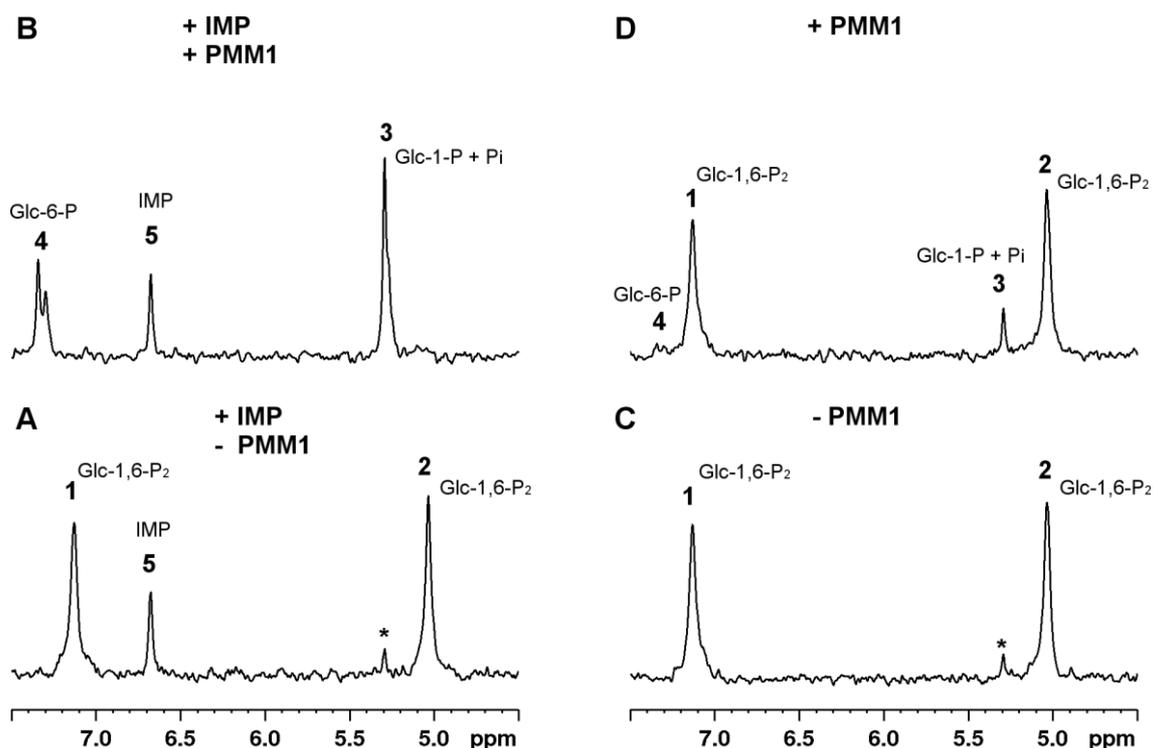


Fig. 4.3 Monitoraggio dell'attività fosfatase della PMM1 mediante analisi dei livelli di Glc-1,6-P₂ con spettroscopia ³¹P-NMR (Citro V et al, 2017). PMM1 (20 µg) è stata incubata con Glc-1,6-P₂ 0.55 mM a 27 °C, in presenza e in assenza di IMP 0.17 mM. Pannello A) Spettro dei reagenti, Glc-1,6-P₂ e IMP, prima dell'aggiunta di PMM1. Pannello B) Spettro dei prodotti e IMP dopo l'aggiunta di PMM1. Pannello C) Spettro dei reagenti, Glc-1,6-P₂, prima dell'aggiunta di PMM1. Pannello D) Spettro dei prodotti dopo l'aggiunta della PMM1. Creatina fosfato (1 mM) è stata aggiunta come standard interno e tutti gli spettri si rapportano ad essa (0 ppm). Le assegnazioni dei picchi sono state ottenute per confronto coi dati delle sostanze pure. 1 and 2, Glc- 1,6-P₂; 3 Glc-1-P+Pi; 4, Glc-6-P; 5, IMP; *, fosfato inorganico.

4.1.2 Caratterizzazione funzionale mediante saggi convenzionali di attività enzimatica

Gli esperimenti NMR provano che sia la PMM1 che la PMM2 convertono il Man-6-P in Man-1-P e confermano che solo la PMM1 possiede un'attività fosfatase rilevante IMP dipendente. Allo scopo di chiarificarne le differenze molecolari, le sequenze della PMM1 e della PMM2 sono state allineate (Fig 4.4) e i residui che appartengono al sito attivo della PMM2 sono stati evidenziati in grigio. I residui che risultano conservati

nella PMM1 e nei suoi omologhi ma non nella PMM2 sono invece in grassetto. Tre residui appartenenti al sito attivo ma non conservati nella PMM1 potrebbero essere responsabili delle differenze funzionali tra le due fosfomannomutasi. Il triplo mutante M186Q-N218D-E219K-PMM1 (QDK-PMM1) è stato prodotto allo scopo di validare questa ipotesi.

		10	20	30	40	50
PMM1	MAVTAQAARR	KERVLCLFDV	DGTLT PAR QK	IDPEVA AF LQ	KLRSRVQIGV	
PMM2	MAAPGPA---	----LCLFDV	DGTLT APR QK	IT KEM DDFLQ	KLRQ KI KIGV	
		60	70	80	90	100
PMM1	VGGSD YCKIA	EQLGD GDE VI	EK F DYV FA EN	GT VQ YKHGRL	LSKQTIQ NHL	
PMM2	VGGSD FEK VQ	EQLG ND --VV	EK Y DYV F PEN	GL VAY KDGKL	LCRQNIQ S HL	
		110	120	130	140	150
PMM1	GE LL QDLIN	F CLSY MALL R	LPKKRGT F IE	FRNGMLN I SP	IGR SCT LEER	
PMM2	GE ALI QDLIN	Y CLSY IAKIK	LPKKRGT F IE	FRNGMLN V SP	IGR S CS Q EER	
		160	170	180	190	200
PMM1	IEF S ELDKKE	KIRE E FVEAL	KTEFAGK GLR	FS R G G MISFD	VFP E GW D KRY	
PMM2	IEF Y ELDKKE	NIR Q KFVADL	RKEFAGK GLT	FS I G G QISFD	VFP D GW D KRY	
		210	220	230	240	250
PMM1	CLDS LD QDS F	D T I H FFG NET	SPGGND F EIF	ADPRTV G HSV	V SP QDT V QRC	
PMM2	CLRH V END G Y	K T I Y FFG DKT	MPGGND H EIF	TDPRT M G Y SV	T AP ED T RRIC	
		260				
PMM1	REIFF P E T AH	EA	262			
PMM2	ELL FS-----	---	246			

Fig. 4.4 Allineamento delle sequenze PMM1 e PMM2 (Citro V et al, 2017). I residui del sito attivo sono evidenziati in grigio, i residui che sono conservati negli ortologi della PMM1 ma non nella PMM2 sono in grassetto.

In Tabella 3 abbiamo comparato i parametri funzionali della PMM2, PMM1 e QDK-PMM1. In questo caso le velocità iniziali sono state misurate mediante dei convenzionali saggi accoppiati che permettono di monitorare la conversione del Man-1-P in Man-6-P o del Glc-1-P in Glc-6-P. Abbiamo paragonato l'attività fosfomannomutasi dei due enzimi in condizioni saturanti (200µM Man-1-P, 100µM Man-1,6-P₂): PMM2 67.0 ± 3.1 U/mg, PMM1 17.0 ± 0.9 U/mg, QDK-PMM1 9.6 ± 0.4

U/mg. L'attività fosfomannomutasica della PMM2 eccede largamente quella fosfoglucomutasica approssimativamente 20 volte e questa differenza risulta meno pronunciata sia per la PMM1 che per il triplo mutante QDK- PMM1. La PMM2 non idrolizza Glc-1,6-P₂ o Man-1,6-P₂ diversamente da PMM1 e QDK- PMM1. Fino a questo punto il mutante QDK-PMM1 si comporta analogamente alla PMM1 sebbene questa mostri un'affinità maggiore per i substrati.

parameter	Experimental conditions	PMM2	PMM1	QDK-PMM1
PMM activity	200µM Man-1-P saturating Man-1,6-P ₂	100 ± 9	100 ± 10	100 ± 8
PGM activity	600µM Glc-1-P saturating Glc-1,6-P ₂	5.8 ± 0.6	33.5 ± 3.5	41.7 ± 3.8
phosphatase activity	145µM Glc-1,6-P ₂	0.013 ± 0.002	2.35 ± 0.21	4.59 ± 0.45
phosphatase activity	80µM Man-1,6-P ₂	0.015 ± 0.002	2.03 ± 0.65	1.50 ± 0.31
phosphatase activity	145µM Glc-1,6-P ₂ 170µM IMP	0.014 ± 0.004	40.6 ± 15.9	4.20 ± 1.63
phosphatase activity	80µM Man-1,6-P ₂ 170µM IMP	0.016 ± 0.003	27.2 ± 5.0	1.52 ± 0.33
K _M Man-1-P, µM	10µM Man-1,6-P ₂ variable Man-1P	23.7 ± 4.5 [*]	6.5 ± 1.3	1.6 ± 0.4
K _M Glc-1-P, µM	27µM Glc-1,6-P ₂ variable Glc-1-P	8.2 ± 0.7	7.3 ± 1.7	3.5 ± 1.3
K _a Man-1,6-P ₂ , µM	200µM Man-1-P variable Man-1,6-P ₂	5.4 ± 0.6	17.0 ± 2.3	8.8 ± 1.2
K _a Glc-1,6-P ₂ , µM	600µM Glc-1-P variable Glc-1,6-P ₂	9.0 ± 1.6	81.6 ± 12.4	23.2 ± 4.9
K _M Glc-1,6-P ₂ , µM	variable Glc-1,6-P ₂	nd	3.9 ± 0.3	nd
K _a IMP, µM	150µM Glc-1,6-P ₂ variable IMP	nd	8.6 ± 2.3	nd

Tabella 3: Parametri funzionali della PMM1, PMM2 e QDK-PMM1. Le attività enzimatiche sono state misurate in condizioni specificate e i risultati sono stati espressi come %

dell'attività PMM. K_m e K_a sono stati determinati dal plot Michaelis-Menten (nd =non determinato).

La principale differenza tra il mutante e la PMM1 wild type è osservata quando l'attività fosfataseica viene misurata in presenza di IMP. QDK-PMM1 risulta essere insensibile all'attivazione con l'IMP. (Tabella 3 e in Fig 4.5).

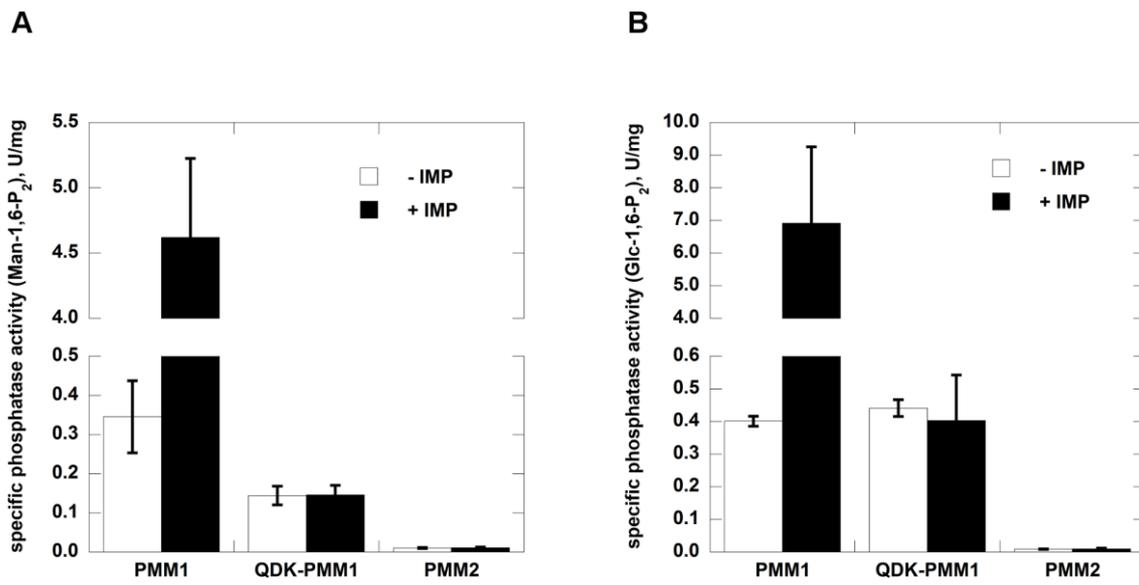


Fig. 4.5 Effetti dell'IMP sull'attività fosfataseica di PMM1, QDK-PMM1 e PMM2 (Citro V et al, 2017). Pannello A) Il substrato utilizzato è il Man-1,6-P₂ 0.08 mM con o senza IMP 0.17 mM. Pannello B) Il substrato utilizzato è stato Glc-1,6-P₂ 0.145 mM con o senza IMP 0.17 mM.

IMP agisce sia come enhancer dell'attività fosfataseica sia come inibitore competitivo dell'attività mutasica della PMM1. (Fig 4.6).

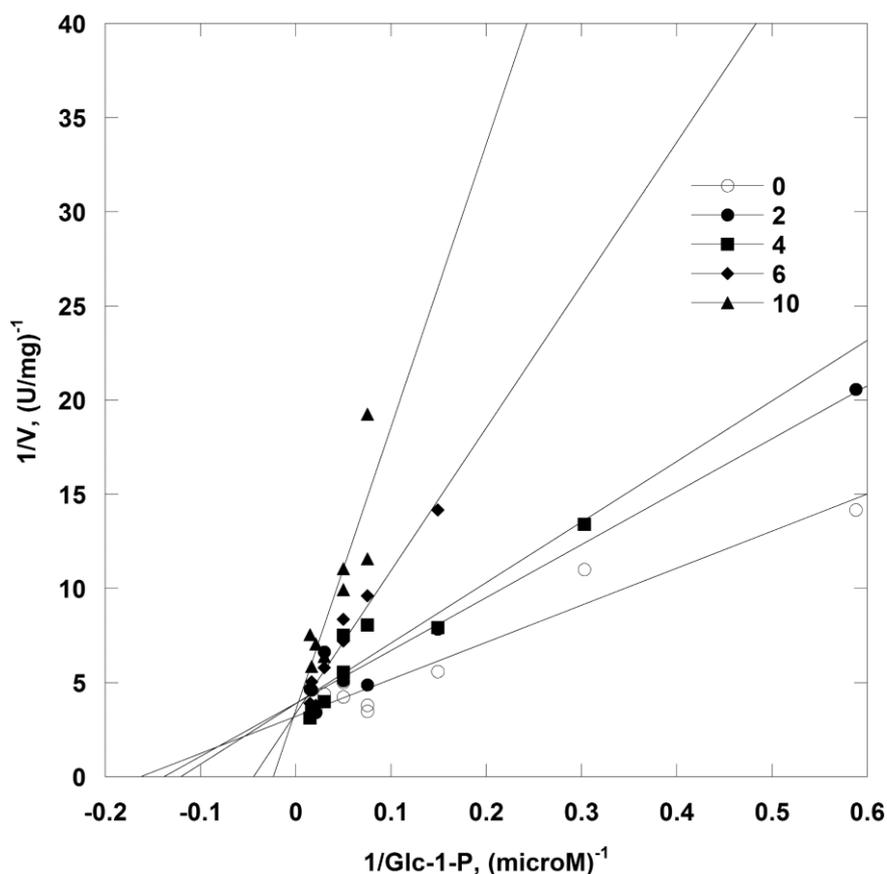


Fig. 4.6. Inibizione competitiva dell'attività mutasica della PMM1 mediata dall'IMP (Citro V et al, 2017). L'attività fosfoglucomutasica della PMM1 ($Glc-1,6-P_2$ $1 \mu M$ e $Glc-1-P$ in un range tra 0 e $60 \mu M$) è stata misurata a 0, 2, 4, 6 e $10 \mu M$ IMP. I dati sono mostrati come Lineweaver-Burk plots.

L'effetto opposto sulle due attività è peculiare e altri inibitori non si comportano allo stesso modo. Abbiamo cercato tra molecole approvate dal FDA (*Food and Drug Administration*) allo scopo di un *drug repositioning* (Hay Mele B et al, 2015) e abbiamo identificato il bisfosfato clonodrato come un nuovo inibitore specifico della PMM1 che diminuisce sia l'attività fosfoglucomutasiche che fosfatasica. Un altro bisfosfonato, il neridronato non inibisce sia la PMM1 che la PMM2 (Fig 4.7).

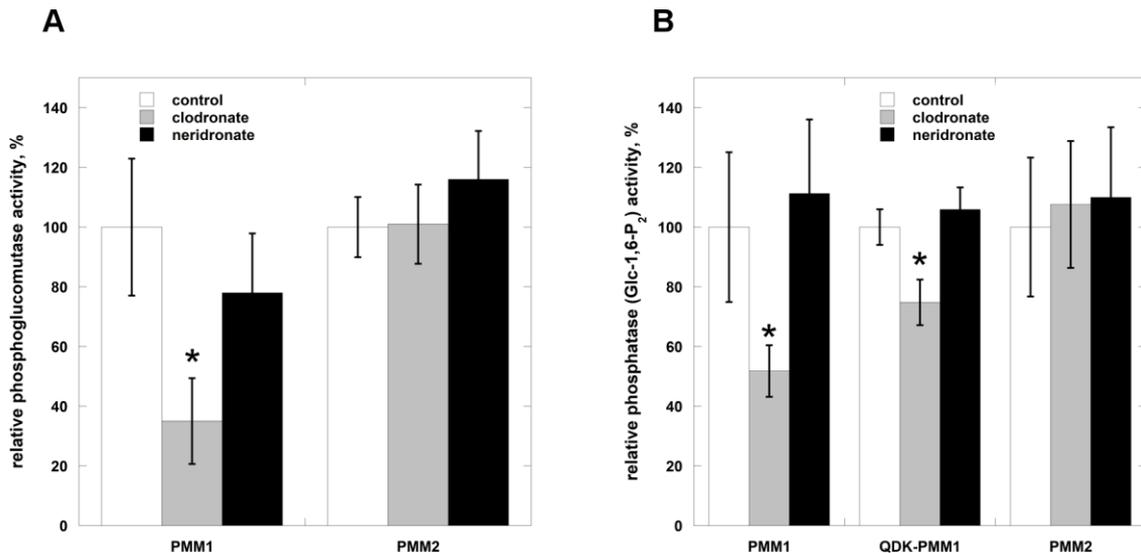


Fig. 4.7. Effetti dei bisfosfonati sull'attività fosfatase e glucomutase della PMM1, QDK-PMM1 e PMM2 (Citro V et al, 2017). *Pannello A*) attività fosfoglucomutase della PMM1 e PMM2 è stata misurata in presenza del Glc-1-P 40 μ M e Glc-1,6-P₂ 27 μ M. *Pannello B*) Attività fosfatase della PMM1, QDK-PMM1 e PMM2 è stata misurata in presenza di Glc-1,6-P₂ 0.145 mM. In entrambi i casi le attività sono state misurate in presenza di clonodrato (2.8 mM) o neridronato (1.5 mM).

Il mutante QDK-PMM1 è una proteina stabile con una temperatura di melting di 43 +/- 0.3°C solo leggermente inferiore al wild type (Fig 4.8, pannello A). L'effetto del Glc-1,6-P₂ sulla temperatura di melting della PMM1 si è visto solo a concentrazioni molto alte del ligando ed è statisticamente significativo per il mutante e meno pronunciato con la PMM1 wild type (Fig 4.8, pannello A) in accordo con le affinità misurate dai saggi enzimatici (Tabella 3). Come confronto abbiamo monitorato la temperatura di melting della PMM2 in funzione della concentrazione di Glc-1,6-P₂ (Fig 4.8, pannello B).

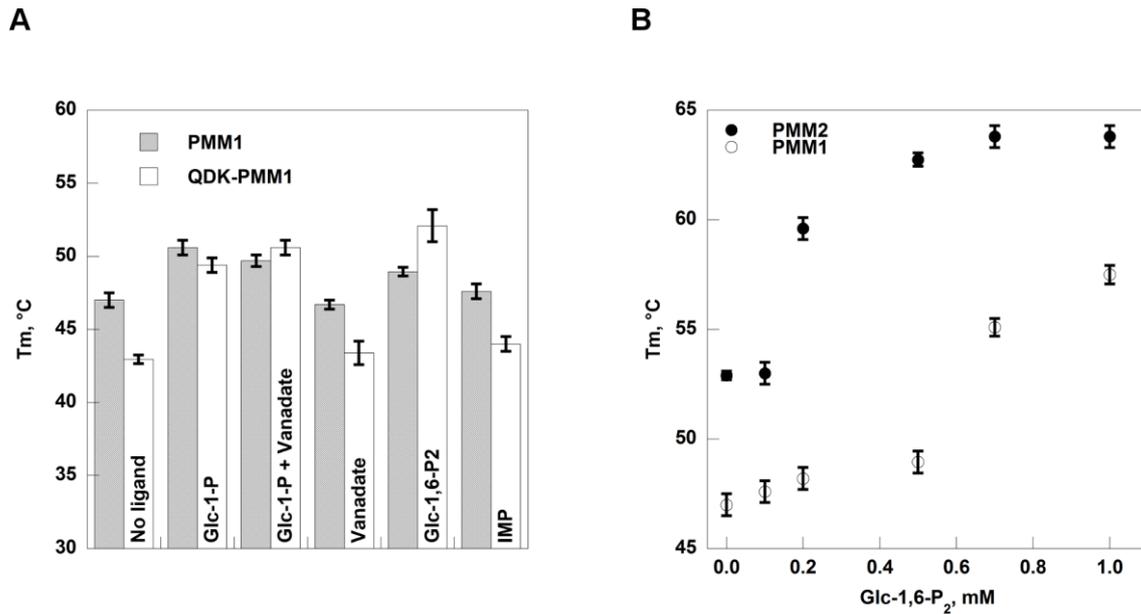


Fig. 4.8. Stabilità termica delle fosfomannosidasi (Citro V et al, 2017). Pannello A) Temperature di melting della PMM1 e QDK-PMM1 (0.5 mg/ml) sono state misurate in presenza di differenti ligandi: Glc-1-P 0.5 mM, Glc-1-P 0.5 mM + vanadato 0.5 mM, vanadato 0.5 mM, Glc-1,6-P₂ 0.5 mM, IMP 0.17 mM. Pannello B) Temperature di melting della PMM1 e QDK-PMM1 (0.5 mg/ml) sono state misurate in presenza di differenti concentrazioni di Glc-1,6-P₂ (da 0 a 1 mM). Gli esperimenti sono stati condotti a pH 7.5 in presenza di 2.4x SyproOrange per Thermal Shift Assay e l'incremento della temperatura è stato di 1 °C / min da 20 a 90 °C.

4.2 KO della PMM1 in fibroblasti CDG-Ia mediante Crispr/Cas9

Per indagare sulla relazione tra i due enzimi, la PMM1 e la PMM2, e studiare l'effetto dell'inibizione della PMM1 su un mutante ipomorfo della PMM2, abbiamo pensato di generare una linea di fibroblasti CDG-Ia (*F119L/F119L*) knock-out per il gene *PMM1* mediante un CRISPR/Cas9 knockout kit fornito dall'OriGene (fig 4.9).

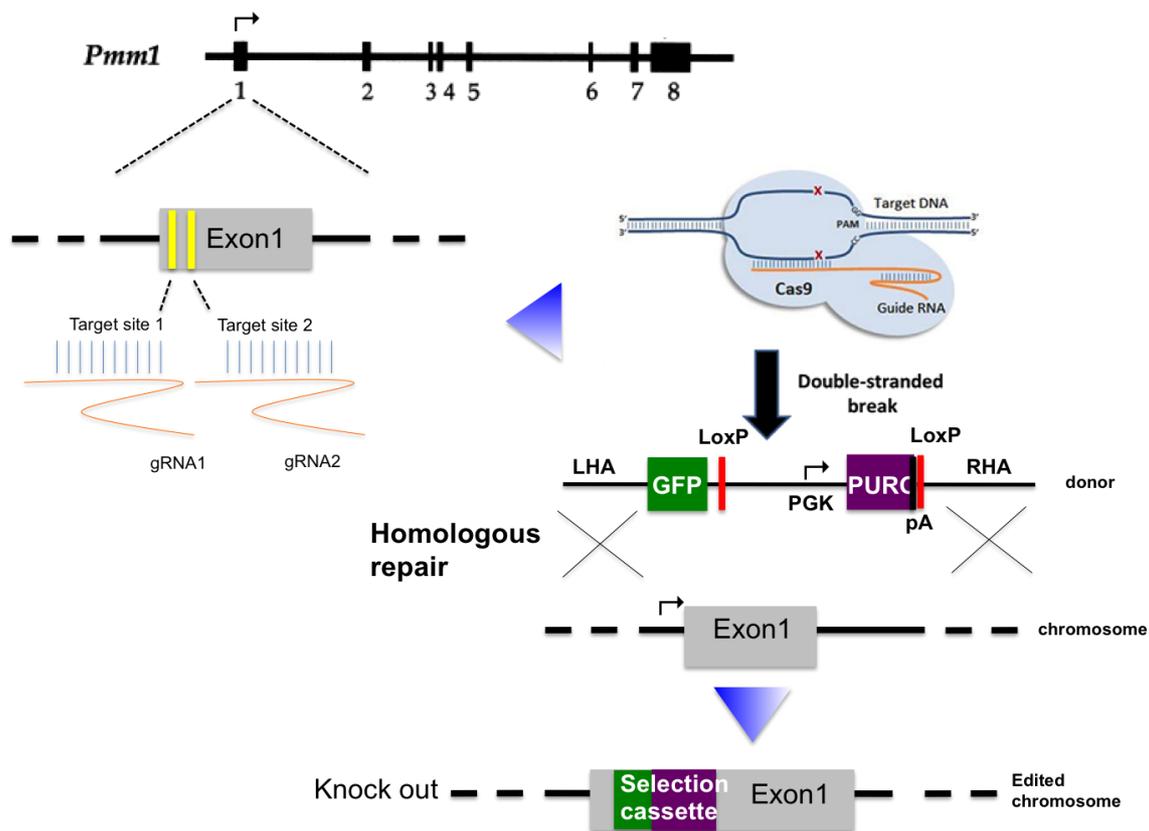


Fig. 4.9: Schema del sistema CRISPR/Cas9 knockout fornito dall’OriGene. *Unitamente ad uno scramble di controllo sono state disegnate due gRNA che hanno due diversi siti di bersaglio nell’esone 1 del gene PMM1. CRISPR/cas9 taglia il ds-DNA nel sito bersaglio. Il donatore fornisce il DNA stampo per la riparazione omologa. La cassetta funzionale contenente il gene GFP ed il gene per la resistenza alla puromicina, viene incorporata nel genoma dopo la cotrasfezione delle cellule con il vettore plasmidico contenente la Cas9 e gRNA1/gRNA2 o lo scramble e con il donatore. Il gene PMM1 viene dunque rotto per inserzione del costrutto.*

Le cellule selezionate in puromicina sono state analizzate per PCR per validare l’inserzione genomica della cassetta funzionale. Per l’amplificazione, condotta come descritto nel paragrafo 3.2.2 è stata disegnata una coppia di primer che si appaia all’interno della cassetta funzionale (fig 4.9 schema pannello A) Come si evince dalla figura relativa ai campioni amplificati corsi su gel d’agarosio, il prodotto dell’amplificazione non risulta visibile nel controllo negativo, ovvero il DNA dei fibroblasti CDG-IA, ma solo nei campioni cotrasfettati con il donore e lo scramble/gRNA1/gRNA2. Sugli stessi campioni è stato eseguito poi uno screening per

PCR per verificare la corretta integrazione della cassetta funzionale utilizzando una coppia di primer che si appaia rispettivamente a monte dell'esone 1 del gene *PMM1*, e a livello del costrutto. Come si vede in figura 4.10 pannello B, l'amplificazione avviene solo per i campioni trasfettati con gRNA1 o gRNA2 ma non con lo scramble o nel controllo negativo. Una volta ottenuti i singoli cloni a partire dai campioni trasfettati con la scramble e i campioni trasfettati con la guida gRNA2, scelta perché l'intensità della banda è più forte, allo scopo di misurare l'efficienza del knock-out della *PMM1* abbiamo scelto di analizzare per qPCR 6 cloni (fig 4.10, pannello C). Come risultato abbiamo ottenuto una riduzione superiore all'80% e 90% della trascrizione del gene *PMM1* rispettivamente nei cloni numero 5 e 6. Unitamente alla scramble, alla *PMM1* purificata da *E. Coli* e ai fibroblasti CDG-Ia (*F119L/F119L*) non elettroporati, utilizzati come controllo, abbiamo dunque analizzato tali cloni per western blotting allo scopo di validare l'effettiva mancata traduzione della *PMM1* (fig 4.10, pannello D). Il clone numero 6 è risultato essere caratterizzato da una totale assenza della proteina, pertanto è stato scelto per gli esperimenti che verranno condotti in futuro.

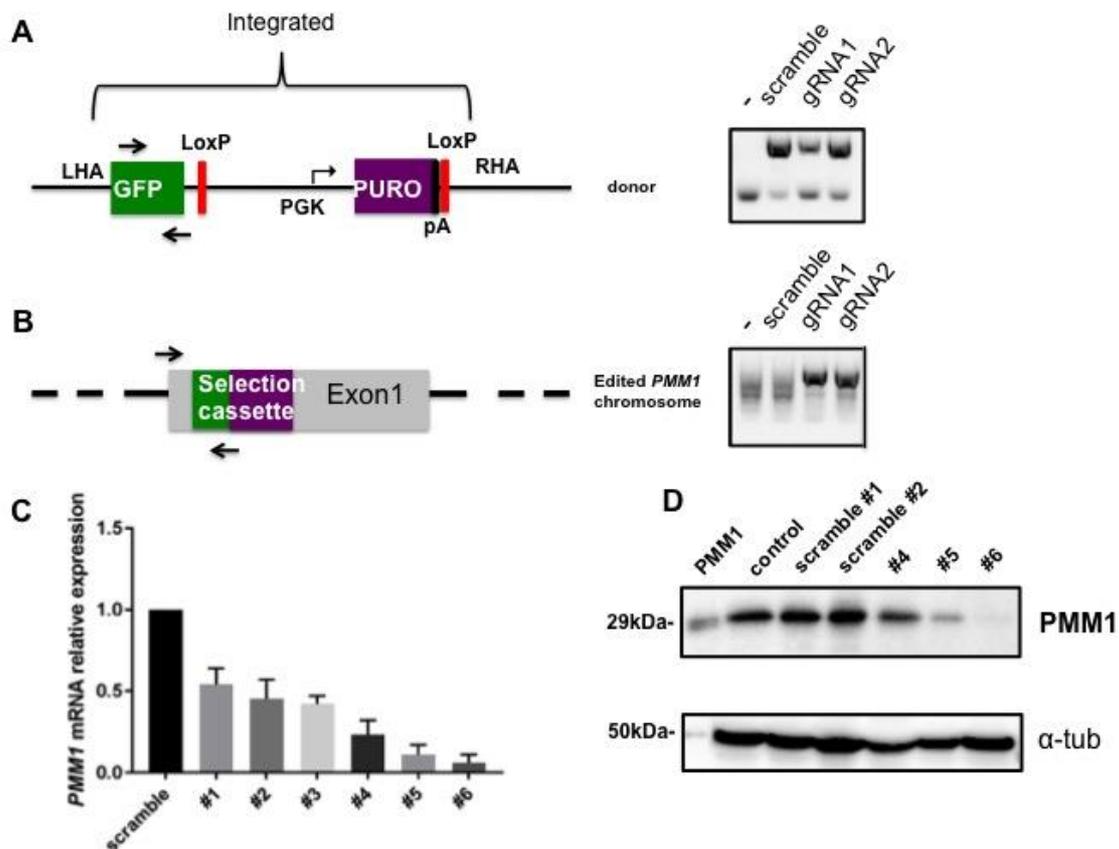


Fig. 4.10. Screening dei cloni ko-PMM1 per PCR, qPCR, western blotting. Pannelli A, B: rappresentazione schematica della coppia di primer disegnata per lo screening per PCR e risultati PCR dei campioni corsi su gel d'agarosio. Pannello C: qPCR per PMM1 dei cloni ko-PMM1; pannello D: analisi per Western blot della PMM1

4.3 Caratterizzazione del nuovo sistema modello cellulare HepG2-F119L

Allo scopo di generare un modello cellulare per lo studio della CDG-IA, abbiamo modificato il genoma delle cellule HepG2, introducendo la mutazione ipomorfa (c.357 C>A, F119L) nel gene codificante la PMM2 mediante il sistema Crispr-Cas9. Come descritto nel paragrafo 3.3.1, i singoli cloni ottenuti sono stati propagati per la caratterizzazione genotipica. Il DNA genomico è stato isolato e la regione modificata è stata amplificata per PCR e controllata per digestione enzimatica con DdeI allo scopo di validare l'inserzione del donatore (fig 4.11). Come si vede dalla figura, diversamente dal controllo, solo nel DNA estratto dalle cellule F119L-HepG2 è presente il sito di restrizione per DdeI. Successivamente per i cloni positivi è stata controllata l'introduzione della mutazione puntiforme mediante sequenziamento di Sanger (fig 4.11). Un clone omozigote per la mutazione c.357 C>A, F119L, è stato scelto per le successive analisi. Per controllare se l'*editing* mediante CRISPR/Cas9 abbia generato delle mutazioni indesiderate nei siti *off target* predetti, tali regioni sono state amplificate per PCR e controllate per sequenziamento. Nessuna mutazione è stata rilevata nel clone scelto.

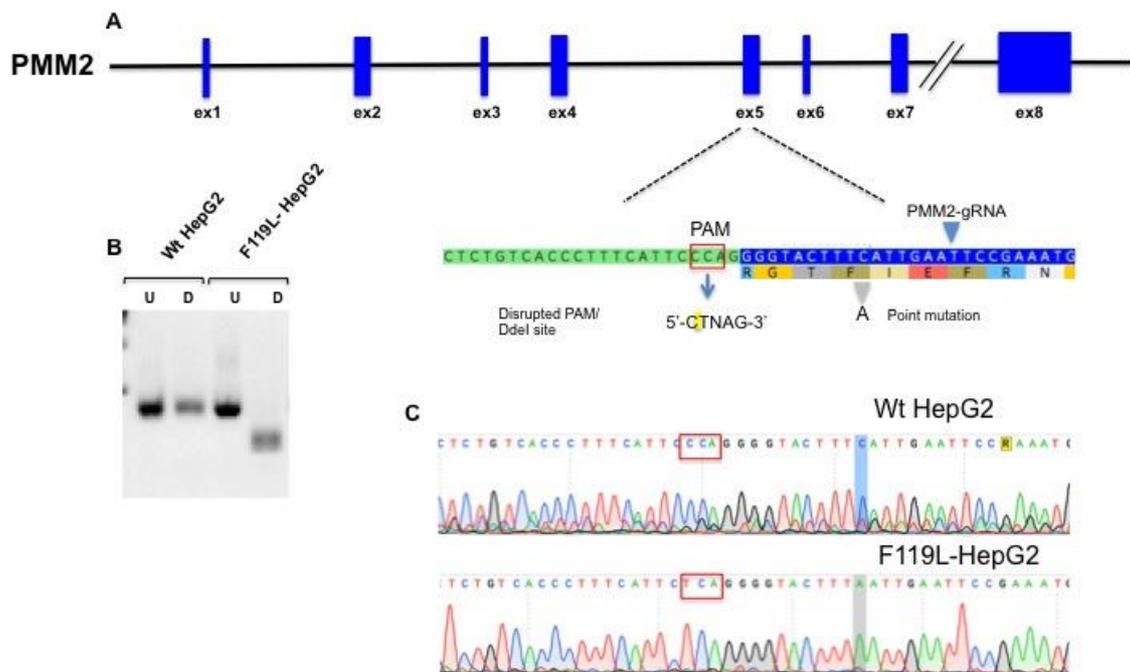


Fig. 4.11. Caratterizzazione genotipica di un clone F119L-HepG2.

Pannello A: schema del gene *PMM2*; l'esone 5 contiene un sito bersaglio per la gRNA utilizzata. CRISPR/cas9 taglia il ds-DNA nel sito bersaglio. Il donatore stampo per il sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HDR), contiene la sostituzione nucleotidica richiesta (c.357 C>A) e una mutazione silente C>T nella sequenza PAM (Protospacer adjacent motif) che introduce un sito di restrizione per *DdeI*. Pannello B: Controllo per digestione enzimatica con *DdeI* della regione genomica modificata amplificata per PCR. Pannello C: elettroferogramma dei campioni controllati per sequenziamento di Sanger.

Per misurare l'espressione della PMM2 a livello trascrizionale nel clone F119L-HepG2, è stata eseguita una qPCR come descritto nel paragrafo 3.3.4. Il campione in esame non ha mostrato differenze significative rispetto alle cellule di controllo HepG2, dimostrando che l'editing mediato dal sistema Crispr-Cas9 non ha interferito in alcun modo con la trascrizione del gene *PMM2*.

Siccome è noto che la PMM2 mutata sia meno stabile *in vitro* e *in vivo* rispetto alla proteina wild-type, la quantità di PMM2 presente nei fibroblasti dei pazienti risulta generalmente molto più bassa rispetto a quella trovata nei soggetti sani. Abbiamo pertanto analizzato per western blotting l'espressione proteica della PMM2 mutata nel clone scelto (paragrafo 3.3.5). Come si vede in figura 4.12, analogamente al paziente

CDG-IA omozigote per la mutazione F119L (lane 3), la quantità di PMM2 nel clone F119L-HepG2 (lane 2) risulta significativamente inferiore rispetto al relativo controllo sano (lane 1 e lane 4). L'esperimento è stato ripetuto almeno tre volte con risultati riproducibili.

Negli estratti proteici è stata misurata anche l'attività fosfomannomutaseca mediante convenzionali saggi enzimatici (paragrafo 3.3.6). L'attività saggiata nelle nel clone in analisi è risultata essere ridotta del 25% rispetto a quella misurata nelle cellule di controllo, come ci si aspetta da una mutazione ipomorfa.

L'attività fosfomannomutaseca negli estratti proteici è stata seguita anche per spettroscopia NMR (paragrafo 3.3.7). Come si vede in figura 4.12 dopo 120 minuti di incubazione, negli estratti di controllo HepG2 si assiste alla formazione del Man-6-P a partire dal Man-1-P, diversamente dal campione F119L-HepG2 in cui non si registra alcuna riduzione significativa del Man-1-P e conseguente formazione del Man-6-P.

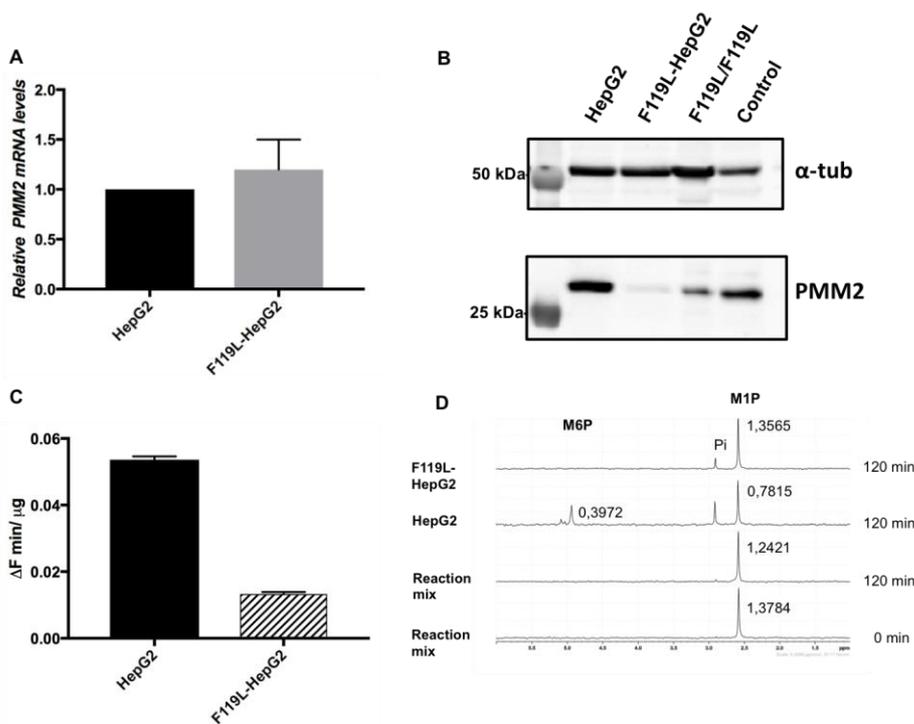


Fig. 4.12: Analisi della PMM2 nella linea cellulare HepG2-F119L per qPCR, western blotting, attività enzimatica e spettroscopia ^{31}P -NMR. Pannello A: Analisi dell'espressione trascrizionale del gene PMM2 per qPCR nelle HepG2 di controllo e in F119L-HepG2.

Pannello B: estratti cellulari (HepG2, F119L-HepG2, fibroblasti primari di un paziente CDG-IA e fibroblasti di un controllo sano) analizzati per western blotting mediante incubazione con anticorpo policlonale anti-PMM2. Pannello C: Saggi di attività fosfomannomutastica in presenza di Man-1-P 0.2mM e Man-1,6-P₂ 10μM allo spettrofluorimetro Cary Eclipse (exc 340nm, em 445nm; slit 10/20; t.a.; 120'). I dati ottenuti (ΔF/min) sono stati normalizzati per i ug di proteine saggiate. Pannello D: Attività fosfomannomutastica in presenza di Man-1-P 1 mM e Glc-1,6-P₂ 0.01 mM misurata per spettroscopia ³¹P-NMR.

4.4 Determinazione di potenziali biomarcatori N-glicosilati nella nuova linea di HepG2 CDG-Ia

4.4.1 Analisi del secretoma

Allo scopo di confrontare il secretoma delle cellule HepG2-F119L con quello delle cellule di controllo HepG2, il mezzo condizionato dei due campioni è stato prelevato dopo 24h in assenza di FBS e analizzato per SDS-PAGE. Le proteine sono state rilevate mediante colorazione con SYPRO ® Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen) come descritto nel paragrafo 3.4.1.

Dalla figura 4.13, pannello A risulta evidente la presenza di una banda molto intensa, con un peso molecolare di 66kDa. Considerato che una proteina molto abbondante nel secretoma delle HepG2 è l'alfafetoproteina (AFP) (Tomonori M et al, 1983) il cui peso molecolare è esattamente 66kDa, abbiamo ipotizzato che la banda di interesse sia relativa proprio a questa proteina. L'AFP è più abbondante nelle cellule di controllo ed è fortemente ridotta nel campione in esame HepG2-F119L. Questo risultato è stato confermato quando l'AFP è stata dosata nel mezzo condizionato per dosaggio immunologico, fig 4.13 pannello B (Elecsys AFP test Roche, Mannaheim, De).

L'alfafetoproteina è una glicoproteina con un singolo sito di N-glicosilazione (Asn-251) ed è prodotta principalmente dalle cellule epatiche. Tale proteina potrebbe rappresentare dunque un potenziale biomarker della CDG-Ia nella linea cellulare generata.

Esperimenti di Western Blot eseguiti sugli estratti cellulari di HepG2-F119L e HepG2 hanno riprodotto lo stesso effetto per l'alfa-1-antitripsina (AAT) osservato nei pazienti CDG-IA e i controlli sani (Dupre et al. 2000). Nelle cellule di controllo si osserva una singola banda relativa alla forma pienamente glicosilata della proteina mentre nelle

cellule mutate si osserva anche una banda a più basso peso molecolare corrispondente ad una forma ipo-glicosilata della AAT (fig 4.13, pannello C).

Sono stati eseguiti esperimenti di Western blot anche per l'alfa-glucosidasi acida (GAA), una proteina lisosomiale, la cui maturazione proteolitica è strettamente correlata al pattern di N-glicosilazione (Rodney J. et al, 2004). La maturazione della GAA prevede la formazione di un prodotto intermedio di 95 kDa e di due forme mature di 76 e 70 kDa a partire da un precursore di 110 kDa con 7 siti N-glicosilati. Diverse glicosidasi capaci di processare strutture glicane complesse intervengono nella conversione del precursore in prodotto intermedio e nella formazione delle forme mature. Come si evince dal risultato del Western blot (fig 4.13, pannello D), nelle cellule mutate si ha una maturazione della proteina alterata con accumulo del prodotto intermedio.

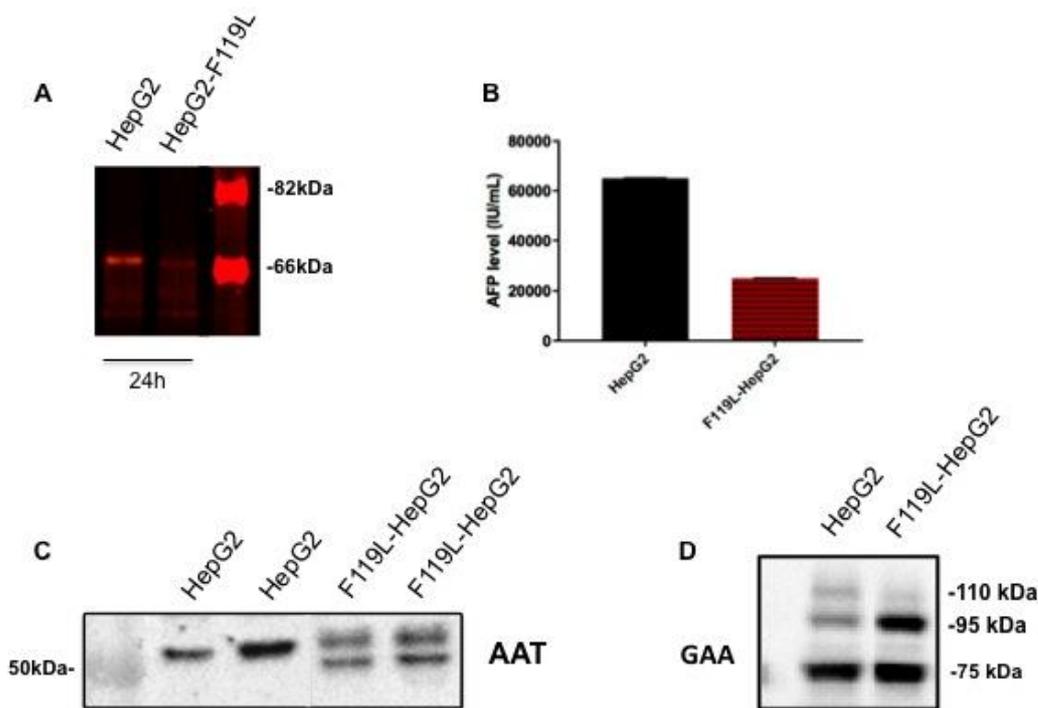


Fig. 4.13: Ricerca di biomarcatori per la CDG-IA in epatociti.

Pannello A: Analisi del secretoma per SDS-PAGE e rilevazione con SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen); pannello B: dosaggio immunologico di alfa-fetoproteina AFP (Elecsys AFP test Roche, Mannheim, De) nel secretoma; pannelli C,D: western blot su estratti cellulari per alfa-1-antitripsina (AAT) e alfa-glucosidasi acida (GAA).

4.4.2 Analisi delle lectine per immunofluorescenza

Una glicosilazione alterata, specialmente a livello della sialilazione terminale, può modificare l'attività delle lectine. I residui di acido sialico, l'ultimo monosaccaride incorporato durante la sintesi degli N-glicani, sono assenti o fortemente ridotti nelle glicoforme aberranti dei pazienti CDG-IA.

L'assenza di acido sialico terminale determina ad esempio una riduzione dell'attività di legame ai residui mannosilati, propria delle lectine. L'analisi delle lectine rappresenta dunque uno strumento per lo studio del differente stato di glicosilazione nelle cellule. Proteine glicosilate come la transferrina e l'alfafetoproteina interagiscono con la concanavalina-A (Con-A). Tuttavia queste legano debolmente la Con-A quando i residui di mannosio sono presenti solo nel *core* centrale e non sono esposti sulla superficie esterna. La Con-A, caratterizzata da un'affinità specifica per i residui terminali di α -D-mannosio e α -D-glucosio, emette infatti un segnale fluorescente significativamente ridotto nelle cellule HepG2-F119L rispetto alle cellule di controllo (figura 4.14). Le glicoproteine contenenti mannosio sono dunque significativamente meno presenti nelle cellule mutate rispetto ai controlli.

Un'altra lectina utilizzata è RCA-120 che lega specificatamente N-acetil-glucosamina (GlcNAc) e residui terminali di galattosio (Gal). Dalla letteratura (M.E. de la Morena-Barrio et al, 2014) è noto che nei pazienti CDG-IA tale lectina presenta un'affinità di legame alle proteine epatiche aumentata rispetto ai controlli sani, in virtù di una differente glicosilazione. Come si vede in figura 4.14 nelle cellule HepG2-F119L, l'intensità del segnale fluorescente emesso da RCA-120 risulta significativamente aumentato rispetto alle cellule di controllo.

L'aumento del legame della lectina RCA-120 potrebbe essere una conseguenza della quantità significativa di proteine epatiche differentemente glicosilate (α 1-antitripsina, transferrina e β -fibrinogeno) legate alla superficie di membrana.

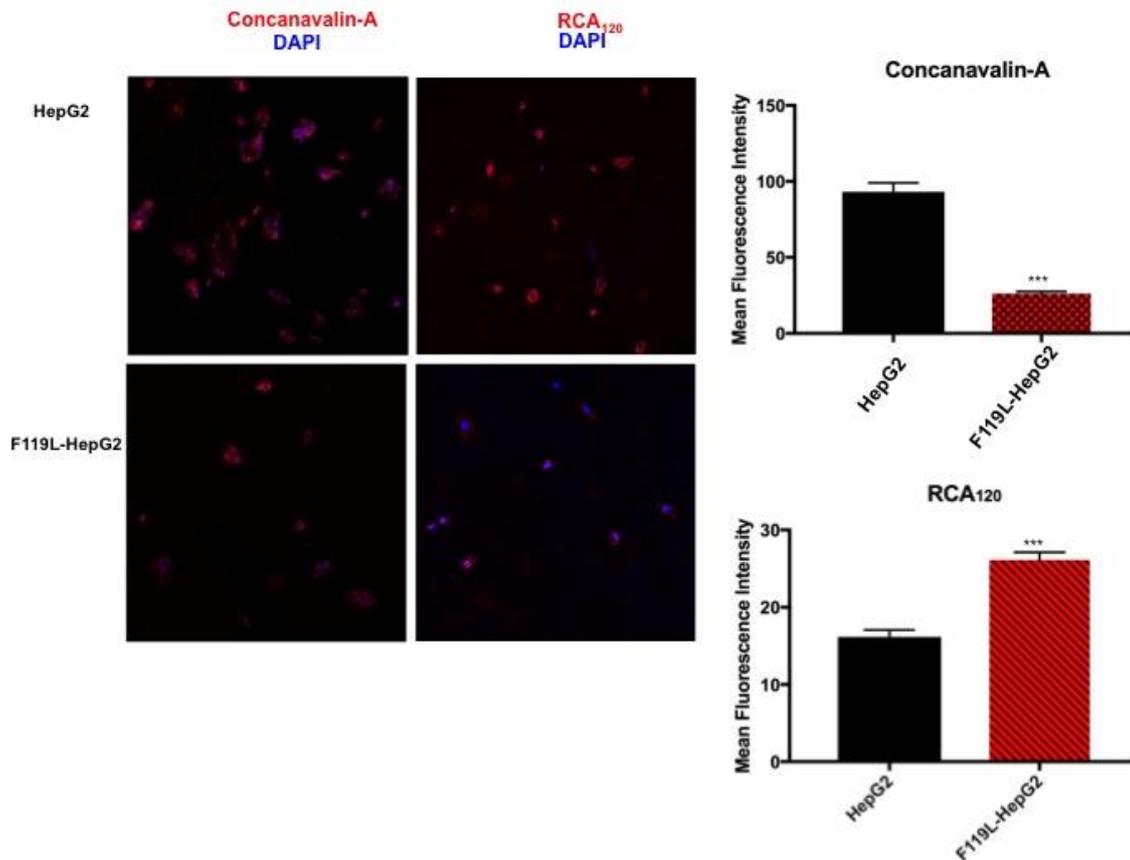


Fig. 4.14. Analisi della fluorescenza emessa dalle lectine Con-A e RCA₁₂₀ : *Le cellule sono state fissate e incubate con Concanavalina-A e RCA₁₂₀ marcate per fluorescenza; una soluzione di 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) è stata utilizzata per colorare i nuclei. Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale invertito Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Gottingen, Germany). L'intensità della fluorescenza totale emessa è stata determinata automaticamente utilizzando la funzione istogramma del software LSM510-3.2 (Zeiss) e selezionando manualmente l'area corrispondente. I dati sono stati normalizzati per il numero di cellule.*

5. DISCUSSIONE

Lo sviluppo di strategie terapeutiche per la CDG-Ia è ostacolato da molte domande fondamentali ancora senza risposta. Una di queste domande riguarda il ruolo della PMM1, un paralogo della PMM2. Utilizzando la spettroscopia ³¹P-NMR abbiamo monitorato per la prima volta l'attività delle fosfomannomutasi nella direzione fisiologica rilevante e abbiamo dimostrato che la PMM1 produce effettivamente Man-1-

P e Man-1,6-P₂ dal Man-6-P e Glc-1,6-P₂ analogamente alla PMM2. Nonostante la sua capacità di produrre il metabolita necessario per la sintesi di proteine N- e C-glicosilate e nonostante la sua espressione in tessuti che sono affetti dalla malattia, come fegato, polmone, pancreas e in particolare nel cervello, la PMM1 non compensa la carenza di PMM2 nei pazienti, anche se l'attività della PMM2 non è mai completamente assente.

L'apparente paradosso di due enzimi paraloghi, parzialmente co-espressi ma non reciprocamente compensatori, potrebbe essere spiegato dalle differenze nelle affinità per i substrati e le relative attività PGM/PMM (Tabella 3). Tuttavia è più probabile che la capacità di idrolizzare gli zuccheri bisfosfati rappresenti la principale differenza fisiologica rilevante tra la PMM1 e la PMM2. Van Schaftingen e colleghi hanno innanzitutto dimostrato che la PMM1, ma non la PMM2, ha un'attività fosfataseica potenziata dall'IMP (Veiga-da-Cunha M. et al, 2008). Se la principale funzione fisiologica della PMM1 fosse la sua attività fosfataseica, potrebbe contrastare la PMM2 idrolizzando il suo attivatore, il Glc-1,6-P₂. Quindi sarebbe opportuno verificare se la riduzione dell'attività fosfataseica, mediante l'inibizione selettiva della PMM1 o agendo sulla concentrazione dell'IMP, risulti benefica nelle cellule con attività della PMM2 ridotta. Abbiamo infatti identificato i residui responsabili per il legame dell'IMP e abbiamo dimostrato che è possibile esprimere un mutante PMM1 stabile, insensibile al nucleotide. Eliminando la PMM1 wild-type ed esprimendo il triplo mutante QKD-PMM1 si potrebbe comprendere il ruolo dell'IMP nella N- e C-glicosilazione,. D'altra parte, il trattamento con molecole che inibiscono selettivamente la PMM1, ma non la PMM2, come il clodronato, potrebbe aiutare a chiarire l'effetto dell'attività fosfataseica sull' N-glicosilazione.

Un altro aspetto legato alla difficoltà di sviluppare strategie terapeutiche riguarda l'assenza di un biomarcatore per la CDG-Ia. Dal momento che i fibroblasti derivati da pazienti si sono rivelati fino ad ora inefficaci come modello cellulare, abbiamo modificato il genoma di una linea cellulare di epatocarcinoma HepG2 attraverso il sistema di Crispr/Cas9 allo scopo di introdurre una mutazione ipomorfa del gene *PMM2*, la quale è stata trovata in omozigosi in diversi pazienti. Gli epatociti infatti producono proteine del siero che sono state trovate ipoglicosilate nei pazienti e pertanto potrebbero rappresentare un modello cellulare migliore per il *drug discovery* e per la ricerca di un biomarcatore. Una volta completata la caratterizzazione genotipica e

misurati i livelli di espressione e attività della PMM2 nella linea HepG2-F119L generata, abbiamo cercato di individuare una correlazione tra la ridotta attività della PMM2 e una difettiva glicosilazione di diverse proteine. Una ridotta N-glicosilazione delle proteine del siero di origine epatica è infatti la principale caratteristica biochimica per la diagnosi di CDG-Ia. Abbiamo innanzitutto individuato una proteina N-glicosilata, l'alfa-fetoproteina, la proteina più abbondante prodotta dagli epatociti, la quale è risultata essere circa tre volte più abbondante nel secretoma delle cellule di controllo. Probabilmente una ridotta N-glicosilazione impedisce una corretta esportazione della proteina. Studi più approfonditi dovranno dunque essere eseguiti allo scopo di analizzare lo stato di glicosilazione dell'AFP nelle cellule mutate, per capire se possa essere considerata un biomarcatore ideale.

Nel siero di pazienti CDG-Ia sono state individuate forme ipoglicosilate dell'alfa-1-antitripsina, la cui origine è principalmente di natura epatica. Abbiamo pertanto analizzato per Western blot l'AAT, la quale è risultata essere ipoglicosilata nelle cellule mutate per la PMM2. Contrariamente ai risultati ottenuti nel siero dei pazienti, non sono mai state individuate forme ipoglicosilate dell'AAT nei fibroblasti o nei leucociti derivati da pazienti; ciò sottolinea l'importanza di utilizzare un nuovo sistema modello cellulare, come la linea modificata di epatocarcinoma che abbiamo generato, allo scopo di testare potenziali farmaci per il trattamento della CDG-IA.

6. PUBBLICAZIONI

L'attività di ricerca che ho svolto durante i tre anni del dottorato in biologia si è incentrata sullo studio e caratterizzazione di malattie genetiche rare. Oltre alla CDG-Ia, oggetto del mio lavoro di tesi, ho partecipato ad un progetto sulla malattia di Fabry che ho svolto in parte presso l'Albrecht Kossel Institute for Neuroregeneration (Akos, Rostock, Germany) . Il lavoro svolto ha portato alle seguenti pubblicazioni:

1. **Cimmaruta C**, Citro V, Andreotti G, Liguori L, Cubellis MV, Hay Mele B.
“Challenging popular tools for the annotation of genetic variations with a real

- case, pathogenic mutations of lysosomal alpha-galactosidase”, BMC Bioinformatics. 2018 Nov 30;19(Suppl 15):433.
2. Citro V., **Cimmaruta C**, Monticelli M., Riccio G., Hay Mele B., Cubellis M.V., Andreotti G., “The Analysis of Variants in the General Population Reveals That PMM2 Is Extremely Tolerant to Missense Mutations and That Diagnosis of PMM2 -CDG Can Benefit from the Identification of Modifiers”, Int J Mol Sci. 2018 Jul 30;19(8).
 3. Citro V, **Cimmaruta C**, Liguori L, Viscido G, Cubellis MV, Andreotti G. A mutant of phosphomannomutase1 retains full enzymatic activity, but is not activated by IMP: Possible implications for the disease PMM2-CDG. PLoS One. 2017 Dec 19;12(12): eCollection 2017.
 4. **Cimmaruta C.**, Liguori L., Monticelli M., Andreotti G., Citro V., "E-Learning for Rare Diseases: An Example Using Fabry Disease", Int J Mol Sci. 2017 Oct; 18(10): 2049.
 5. Citro V, Cammisa M, Liguori L, **Cimmaruta C**, Lukas J, Cubellis MV, Andreotti G. The Large Phenotypic Spectrum of Fabry Disease Requires Graduated Diagnosis and Personalized Therapy: A Meta-Analysis Can Help to Differentiate Missense Mutations. Int J Mol Sci. 2016 Dec 1;17(12). pii: E2010. Review.
 6. Citro V, Peña-García J, den-Haan H, Pérez-Sánchez H, Del Prete R, Liguori L, **Cimmaruta C**, Lukas J, Cubellis MV, Andreotti G. Identification of an Allosteric Binding Site on Human Lysosomal Alpha-Galactosidase Opens the Way to New Pharmacological Chaperones for Fabry Disease. PLoS One. 2016 Oct 27;11(10), eCollection 2016.

7. BIBLIOGRAFIA

Andreotti G et al, (2013). “Biochemical phenotype of a common disease-causing mutation and a possible therapeutic approach for the phosphomannomutase 2-associated disorder of glycosylation”. *Mol Genet Genomic Med.* (1):32-44

Andreotti G et al, (2014). “Conformational response to ligand binding in phosphomannomutase2: insights into inborn glycosylation disorder”, *J Biol Chem.* 289(50):34900-10.

Barnier A. et al., (2002). “Leukocyte phosphomannomutase activity in diagnosis of congenital disorder of glycosylation Ia” *Clin. Chem.* 48 934–936

Clayton P. et al, (1993), “Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: normal glycosylation in the fetus”. *Lancet.* 341(8850):956.

Cromphout K. et al, (2005). “Tissue distribution of the murine phosphomannomutases Pmm1 and Pmm2 during brain development”, *Eur. J. Neurosci.* 22 991–996

Cromphout K. et al. (2006). “The normal phenotype of Pmm1-deficient mice suggests that Pmm1 is not essential for normal mouse development”, *Mol Cell Biol.* 26(15):5621–35.

Dai JB et al. (1992). “The crystal structure of muscle phosphoglucomutase refined at 2.7-angstrom resolution”, *J Biol Chem.* 267(9):6322-37.

De la Morena-Barrio ME et al. (2014), "Proteomic analysis of platelet N-glycoproteins in PMM2-CDG patients", *Thromb Res.* 133(3):412-7.

De Zegher et al. (1995) "Endocrinology of the Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome Type 1 from Birth through Adolescence", *Pediatric Research* 37(4 Pt 1):395-401

Duprè T. et al. (2000). "Defect in N-glycosylation of proteins is tissue-dependent in Congenital Disorders of Glycosylation Ia", *Glycobiology*, 10, 1277–1281.

Edwards M. et al. (2006). "Prenatal diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia) by cordocentesis and transferrin isoelectric focussing of serum of a 27-week fetus with non-immune hydrops", *Prenat. Diagn.* 26 985–988.

Eklund E. A. et al. (2006). "The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes", *NeuroRx.* 3(2):254-63.

Fiumara, A. et al. (1994). "Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I: ophthalmic aspects in four Sicilian patients." *Br J Ophthalmol* 78(11): 845-6.

Gao N. et al. (2005). "Analysis of glycosylation in CDG-Ia fibroblasts by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis: implications for extracellular glucose and intracellular mannose 6-phosphate", *J Biol Chem.* 280(18):17901-9.

Grunewald S. et al., (2001) "High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency)" *Am. J. Hum. Genet.* 68 347–354.

Hanson SR et al. (2009). "The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability", *ETProcNatlAcadSci* 106(9):3131-6

Hay Mele B et al. (2015). “Drug repositioning can accelerate discovery of pharmacological chaperones”, *Orphanet J Rare Dis.* 10: 55.

Imtiaz F. et al, (2000). “Genotypes and phenotypes of patients in the UK with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1”, *J Inherit Metab Dis.* Mar; 23(2):162-74.

Jaeken J. et al., (1980). “Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?” *Pediatr. Res.* 14 179.

Jaeken J. et al, (1984). “Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome”, *Clin Chim Acta.* 144(2-3):245-7.

Jaeken J. et al, (1993). "Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II." *J Inherit Metab Dis* 16(6): 1041.

Kjaergaard S, et al. (1998, a). “Failure of short- term mannose therapy of patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1”, *Acta Paediatr* 87:884 – 888

Kjaergaard S et al. (1998, b). “Absence of homozygosity for predominant mutations in PMM2 in Danish patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1”, *Eur J Hum Genet.* 6(4):331-6.

Körner C, et al. (1998). “Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: correction of the glycosylation defect by deprivation of glucose or supplementation of mannose”, *Glycoconj J.*, 15(5):499-505.

Le Bizec C. et al., (2005). “A new insight into PMM2 mutations in the French population”, *Human Mutation* 25(5):504-5

Livak KJ et al. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods*. 25(4):402-8.

Lu Z et al. (2005). "HAD superfamily phosphotransferase substrate diversification: structure and function analysis of HAD subclass IIB sugar phosphatase BT4131", *Biochemistry*. 44(24):8684-96.

Marklova, Z. et al, (2007). "Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation" *Clin. Chim. Acta* 385 6–20.

Marquardt T et al, (1995). "Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome (CDGS)--glycosylation, folding and intracellular transport of newly synthesized glycoproteins", *Eur J Cell Biol*. 66(3):268-73.

Marquardt T. et al, (1999). "Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose", *Blood* 94:3976 –3985

Matthijs, G. et al. (1997). "Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome)." *Nat Genet* 16(1): 88-92.

Matthijs G. et al, (1998, a). "Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1", *Am J Hum Genet*. 62(3):542–50.

Matthijs G. et al., (1998, b) "Detailed mapping of the phosphomannomutase 2 (PMM2) gene and mutation detection enable improved analysis for Scandinavian CDG type I families", *Eur J Hum Genet*. 6(6):603-11.

Matthijs, G. et al. (2000). "Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia)." *Hum Mutat* 16(5): 386-94.

Matthijs G. et al. (2004). "The prenatal diagnosis of congenital disorders of glycosylation (CDG)", *Prenat. Diagn.* 24 114–11.

Mayatepek E. et al, (1997). "Continuous mannose infusion in carbohydrate-deficient glyco- protein syndrome type I", *Acta Paediatr* 86:1138–1140.

Mayatepek E. et al, (1998). "Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency", *Eur J Pediatr* 157:605–606.

Mills K. et al, (2006). "Diagnosis of congenital disorders of glycosylation type-I using protein chip technology", *Proteomics.* 6(7):2295-304.

Naught LE et al. (2001). "Kinetic mechanism and pH dependence of the kinetic parameters of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannomutase/phosphoglucomutase", *Arch Biochem Biophys.* 396 (1):111-8.

Panneerselvam K. et al, (1996). "Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts", *J Clin Invest* 97:1478 – 1487

Pirard M. et al. (1999). "Kinetic properties and tissular distribution of mammalian phosphomannomutase isozymes" *Biochem. J.* 339 (Pt 1) 201–207.

Sala, G. et al. (2002). "Increased biosynthesis of glycosphingolipids in congenital disorder of glycosylation Ia (CDG-Ia) fibroblasts." *Pediatr Res* 52(5): 645-51.

Schollen E. et al., (2000). "Lack of Hardy–Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia)" *Eur. J. Hum. Genet.* 8 367–371.

Schwarze SR et al. (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse", *Science* 285:1569–1572

Silvaggi NR et al. (2006). "The X-ray crystal structures of human alpha-phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type 1a", *J Biol Chem.* 281(21):14918-26.

Stibler, H. et al. (1994). "Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: clinical expression in adults with a new metabolic disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57(5): 552-6.

Thiel C et al. (2006). "Targeted disruption of the mouse phosphomannomutase 2 gene causes early embryonic lethality", *Mol Cell Biol.* 26(15):5615–20.

Tomonori M. et al. (1983). "Biochemistry Primary structures of human a-fetoprotein and its mRNA (cDNA clones/three-domain structure/molecular evolution", *Proc. NatL Acad. Sci.* 80, 4604-4608

Van Schaftingen E. et al, (1995). "Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I" *FEBS Lett.* 377 318–320.

Veiga-da-Cunha M et al. (2008). "Mammalian phosphomannomutase PMM1 is the brain IMP-sensitive glucose-1,6-bisphosphatase", *J Biol Chem.* 283(49):33988-93

Yuste-Checa P et al. (2015). "The Effects of PMM2-CDG-Causing Mutations on the Folding, Activity, and Stability of the PMM2 Protein", *Hum Mutat.* 36(9):851-60.

Zimmer KP et al. (2002). "Oral mannose therapy persistently corrects the severe clinical symptoms and biochemical abnormalities of phosphomannose isomerase deficiency", *Acta Paediatr* 91:1065–1072

