RIASSUNTO ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA DURANTE LA TESI

Tesi svolta presso il laboratorio universitario di Genetica Molecolare

Titolo tesi: Studio di mutazioni nel gene *CAT5* in *Saccharomyces cerevisiae* e analisi dei potenziali effetti benefici dell'overespressione di *COQ8* e/o della supplementazione della molecola 2,4-DHB

Laureanda: Pettenuzzo Debora 326038

Relatore: Prof.ssa Dallabona Cristina

Correlatore: Dott.ssa Magistrati Martina

Le patologie mitocondriali sono un gruppo eterogeneo di patologie causate spesso da un deficit nelle attività di fosforilazione ossidativa. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un organismo modello ampiamente utilizzato per la presenza nel suo genoma di geni omologhi a geni umani, tra cui proteine coinvolte nella biogenesi mitocondriale, e per questo è utilizzato per studiare le mutazioni associate alle malattie mitocondriali. Nel tirocinio da me svolto è stato utilizzato il lievito *S. cerevisiae* per la validazione di mutazioni identificate in pazienti con caratteristiche cliniche compatibili con la disfunzione mitocondriale. In particolare, la validazione ha riguardato mutazioni identificate nel gene umano *COQ7*, il cui ortologo nel lievito è *CAT5*; questi codifica per l'enzima 5-demetossiubichinone idrossilasi responsabile del penultimo passaggio della biosintesi del coenzima Q. Nei pazienti sono state identificate mutazioni missenso che portano a sostituzioni amminoacidiche, e pertanto sono stati costruiti modelli di lievito con le mutazioni di interesse. Una volta ottenuti i ceppi mutanti, è stata eseguita un'analisi tramite Spot assay per valutare le differenze di crescita ossidativa tra i ceppi; successivamente è stata analizzata l'attività respiratoria misurando il consumo di ossigeno, e infine è stato fatto il Western blot, con un anticorpo che riconosce la proteina Cat5, al fine di caratterizzare l'effetto molecolare delle mutazioni sulla stabilità proteica. I risultati ottenuti dalle diverse analisi hanno permesso di validare le mutazioni in esame, e hanno dimostrato come le mutazioni alterano le funzioni del gene *CAT5.* È stata osservato un difetto di crescita ossidativa, una diminuzione dell'attività respiratoria, e un aumento dell'instabilità proteica nei ceppi mutati. Nella seconda parte dello studio è stata testata l'acido 2,4-diidrossibenzoato (2,4-DHB) come molecola potenzialmente benefica, dal momento che in letteratura è stato osservato il bypass della funzione del gene *COQ7* quando il gene *COQ8* è overespresso, portando al rispristino della biosintesi di CoQ. Per poter analizzare gli effetti della somministrazione del 2,4-DHB è stato necessario costruire ceppi con *COQ8* overespresso. È stato valutato l'effetto della molecola sia sulla crescita ossidativa mediante Spot assay, sia sull'attività respiratoria misurando il consumo di ossigeno dei ceppi. Infine, è stata valutato l'effetto delle mutazioni sulla stabilità dei complessi respiratori mitocondriali, e successivamente è stata testata la molecola per vedere che effetto avesse sulla stabilità delle subunità dei complessi. I risultati ottenuti suggeriscono che la supplementazione del 2,4-DHB potrebbe essere un'opzione terapeutica per i pazienti.