

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE

XXII CICLO

SYMI, l'ortologo di lievito del gene umano MPV17, codifica
per una proteina indotta da stress che modula lo stato
bioenergetico e morfogenetico del mitocondrio

Coordinatore:

Prof. Nelson Marmioli

Docente guida:

Prof.ssa Claudia Donnini

Dottoranda:

Cristina Dallabona

INDICE

1. <u>INTRODUZIONE</u>	1
1.1 Mitochondri: struttura e funzione	2
1.2 Il DNA mitocondriale (mtDNA)	10
1.3 Interazione nucleo-mitocondrio	16
1.4 Caratteristiche genetiche del mitocondrio	17
1.5 Patologie mitocondriali	19
1.6 Sindromi da deplezione del mtDNA (MDDS)	29
1.7 Identificazione di un nuovo gene che mutato determina una forma epatocerebrale di MDDS: MPV17	33
1.8 MPV17: quale funzione?	38
1.9 Ricerca di geni nucleari implicati in patologie mitocondriali	43
1.10 Il lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> come organismo modello	45
1.11 Il gene <i>SYM1</i> di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
1.12 Scopo della ricerca	58
2. <u>MATERIALI E METODI</u>	59
2.1 Ceppi di lievito utilizzati	60
2.2 Ceppi batterici utilizzati	61
2.3 Terreni di crescita	61
2.4 Vettori plasmidici	62
2.5 PCR	63
2.6 Sequenziamento	66
2.7 Manipolazione del DNA	67
2.8 Trasformazioni	68
2.9 Ricerca di soppressori multicopia	68
2.10 Estrazione di DNA	69
2.11 Estrazione di RNA da lievito e <i>Northern blot</i>	69
2.12 Estrazione di mitocondri e saggi enzimatici	70
2.13 Determinazione dell'attività GDH attraverso zimogramma	72
2.14 Analisi di Proteine	72
2.15 Analisi fenotipiche	73
2.16 Marcatura dell'mtDNA con DAPI	75

3. <u>RISULTATI (I parte)</u>	76
3.1 Analisi fenotipica	77
3.2 Analisi trascrizionale	85
3.3 Identificazione di soppressori chimici	87
3.4 Identificazione di soppressori multicopia	93
3.5 Analisi dei doppi mutanti $\Delta sym1 \Delta cit1$ e $\Delta sym1 \Delta cit2$	104
3.6 Analisi degli enzimi del ciclo di Krebs	109
3.7 Analisi dei complessi respiratori	110
3.8 Analisi del contenuto cellulare di glicogeno	113
3.9 Analisi dell'over-espressione di <i>AAC2</i>	114
3.10 Ruolo dei ROS nella mutabilità mitocondriale	116
3.11 MIC del valproato	119
3.12 Costruzione e analisi di un ceppo che esprime una variante di <i>sym1</i> recante un <i>tag</i> per l'immunorivelazione	121
	128
4. <u>RISULTATI (II parte)</u>	
4.1 Analisi del paralogo di <i>SYM1:YOR292C</i>	129
4.2 Analisi di complementazione dei geni umani	133
5. <u>RISULTATI (III parte)</u>	136
Analisi dell'ORF ipotetica <i>YLR252W</i>	137
6. <u>CONCLUSIONI</u>	140
7. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	147
8. <u>APPENDICE</u>	169
A.1 Repressione da glucosio	170
A.2 Gluconeogenesi e accumulo di glicogeno	171
A.3 Conversione di aminoacidi in intermedi del ciclo di Krebs	172
A.4 Glutammato deidrogenasi	174
A.5 RTG – regolazione retrograda	175
A.6 I complessi OXPHOS	181
A.7 Organizzazione in supercomplessi degli enzimi della fosforilazione ossidativa	196
A.8 Formazione delle <i>cristae</i>	198

1. INTRODUZIONE

1.1 MITOCONDRI: STRUTTURA E FUNZIONE

I mitocondri sono organelli presenti nel citoplasma delle cellule eucariotiche che derivano, secondo la teoria endosimbiontica, da batteri. Sembra infatti che più di un miliardo di anni fa, batteri aerobi abbiano colonizzato cellule eucariotiche primordiali che non erano in grado di usare l'ossigeno per i processi metabolici. Da questo evento si è poi instaurata una relazione di simbiosi che è divenuta permanente. I batteri si sono evoluti nei mitocondri che oggi conosciamo, e così hanno dotato le cellule ospiti del metabolismo aerobico che è molto più efficiente nella produzione di energia rispetto alla glicolisi anaerobica (Margulis, 1970; Margulis 1975).

I mitocondri sono intimamente implicati nell'omeostasi cellulare. Hanno un ruolo nella segnalazione intracellulare e nell'apoptosi, nella biogenesi dei *cluster* ferro-zolfo (Fe-S), nell'ossidazione del piruvato, nel ciclo di Krebs, nel metabolismo degli aminoacidi, degli acidi grassi, del colesterolo, degli steroidi, e dei nucleotidi (Scheffler, 2000). Ma probabilmente la funzione più importante è quella di produrre energia sotto forma di adenosina trifosfato (ATP), attraverso la respirazione e la fosforilazione ossidativa (la catena respiratoria) (Figura 1.1).

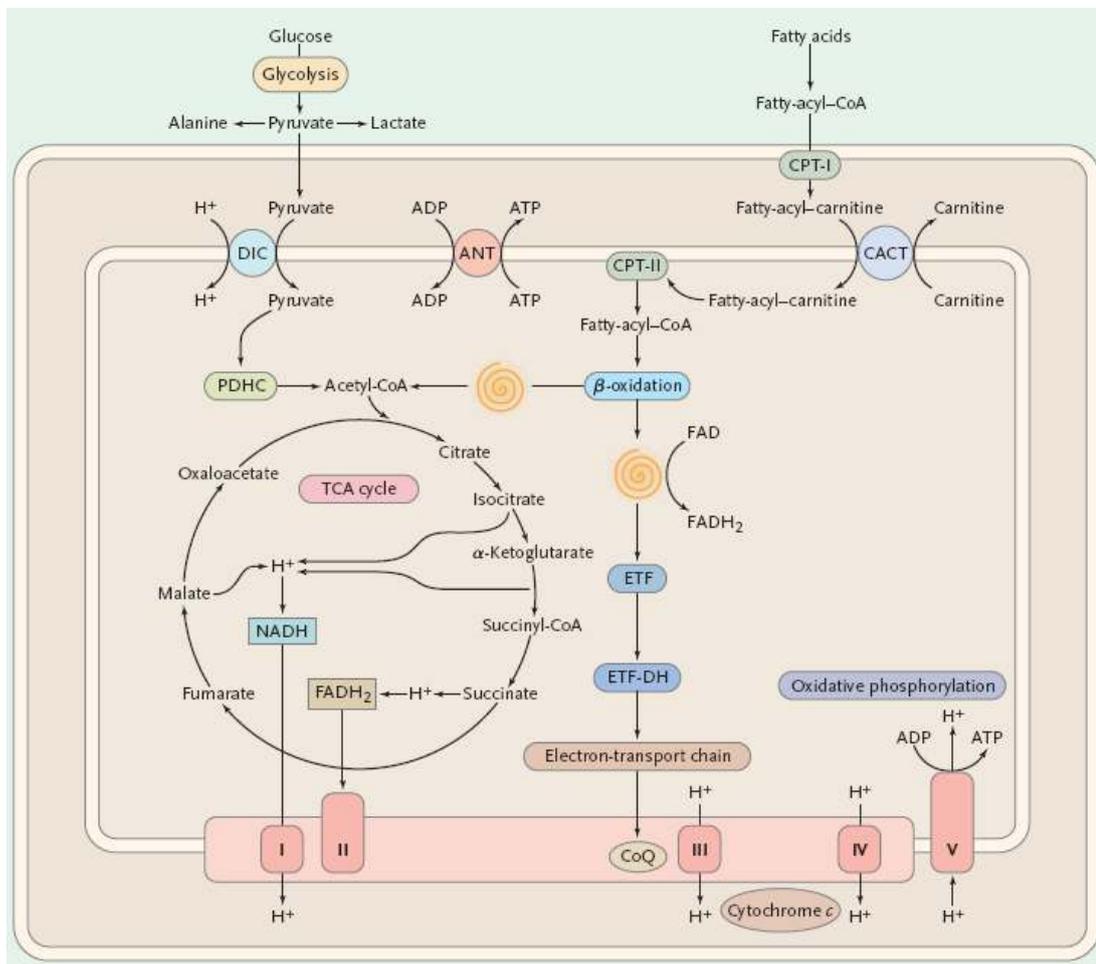


Figura 1.1 Alcuni *pathway* metabolici del mitocondrio. (Da DiMauro and Schon, 2003)

I mitocondri sono organelli di forma elissoidale, generalmente con un diametro di 0,2-1 μm e una lunghezza di 1-4 μm circondati da una doppia membrana: la membrana esterna e la membrana interna (figura 1.2). La membrana mitocondriale esterna (OMM) ha una composizione simile a quella del reticolo endoplasmatico e in essa sono presenti dei pori proteici con la funzione di facilitare il passaggio bidirezionale di metaboliti con peso molecolare inferiore a 10 kDa. La membrana mitocondriale interna (IMM), invece, ha una permeabilità molto limitata e quindi possono attraversarla solo molecole per le quali esistono trasportatori specifici. Queste caratteristiche di permeabilità consentono la formazione di gradienti ionici attraverso questa barriera e la separazione delle funzioni metaboliche tra citoplasma e mitocondrio. Una caratteristica dell'IMM è quella di essere priva di colesterolo e ricca di un fosfolipide caratteristico: la cardiolipina (Scheffler, 1999).

Lo spazio compreso fra le due membrane è chiamato spazio intermembrana, mentre lo spazio racchiuso dalla membrana interna è chiamato matrice mitocondriale.

L'IMM si ripiega più volte all'interno della matrice, formando strutture che vengono chiamate *cristae* dove si concentrano la maggior parte degli enzimi respiratori. Questa particolare organizzazione in *cristae* ha l'effetto di aumentare la superficie della membrana interna e, di conseguenza, di ottimizzare i processi di produzione di energia.

La suddivisione in compartimenti è molto importante e in ognuno di questi avvengono specifiche reazioni.

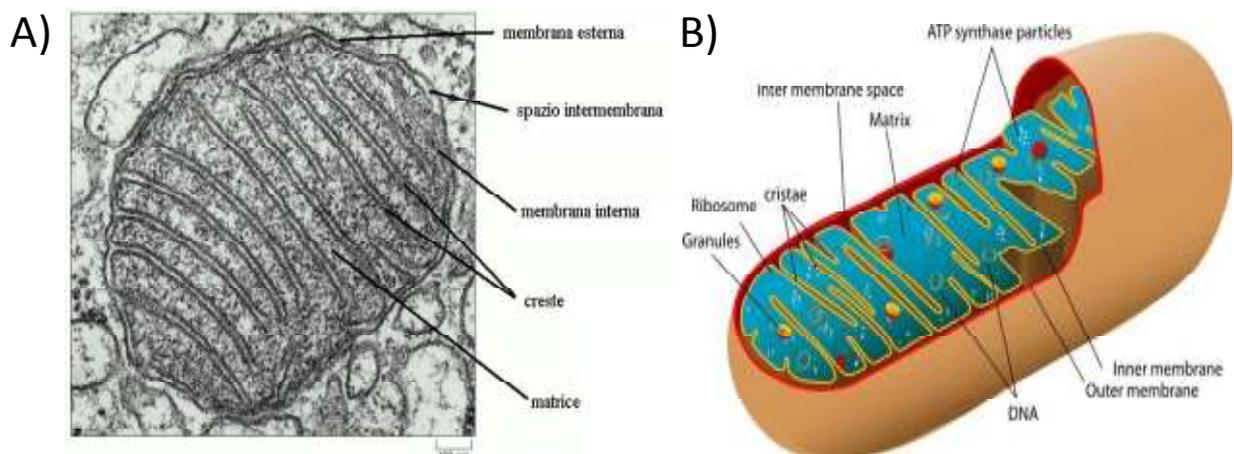


Figura 1.2 A) Immagine al microscopio elettronico di un singolo mitocondrio di epatocita; B) Rappresentazione grafica di un mitocondrio.

Sebbene i mitocondri vengano spesso rappresentati come unità singole, in realtà è più corretto descriverli come un *network* dinamico con continui eventi di fissione e fusione analogamente a quanto avviene per il reticolo endoplasmatico (Nunnari *et al.*, 1997; Preiss *et al.*, 1995).

Il mitocondrio è un organello che non viene generato *de novo*; la sua morfologia e la sua distribuzione intracellulare dipendono da un trasporto mediato dal citoscheletro e, come detto, da continui eventi di fusione e fissione (Bereiter-Hahn and Voth, 1994; Yaffe, 1999a; Griparic and van der Bliik, 2001; Yaffe, 1999b; Hermann and Shaw, 1998).

Il numero di mitocondri presenti in una singola cellula è variabile e dipende dalla specie, dal tessuto (nel caso degli eucarioti superiori) e dalla condizione fisiologica in cui si trova la cellula. Inoltre la distribuzione e la morfologia dei mitocondri riflettono la richiesta energetica cellulare (Bereiter-Hahn, 1994; Warren and Wickner, 1996). Ad esempio nei miociti e negli epatociti dei mammiferi, in cui la richiesta energetica è elevata, l'intensa attività respiratoria è sostenuta dall'elevato numero di mitocondri, da centinaia a migliaia di mitocondri per cellula. Una caratteristica peculiare dei mitocondri è che possiedono al loro interno un proprio genoma, il DNA mitocondriale o mtDNA, e un proprio macchinario di sintesi proteica. Ogni mitocondrio possiede più molecole di mtDNA. Ad esempio, nei fibroblasti di topo, nel complesso, ci sono alcune centinaia di mtDNA, nell'ovocita maturo più di 100.000 (Piko and Taylor, 1987), mentre nel caso di cellule di *S. cerevisiae*, il numero di mtDNA varia a seconda del ceppo, dello stato aploide o diploide e delle condizioni di crescita: tipicamente una cellula aploide contiene 20-35 copie di mtDNA (de Zamaroczy and Bernardi, 1985).

1.1.1 Ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)

Il ciclo degli acidi tricarbossilici (o ciclo di Krebs, o ciclo dell'acido citrico) è il processo ossidativo centrale della respirazione, il processo attraverso cui tutti i "combustibili" metabolici (carboidrati, lipidi e proteine) sono catabolizzati negli organismi e nei tessuti aerobi.

La molecola chiave che entra nel ciclo è l'acetil-coenzima A (acetil-CoA). Questa può derivare dalla degradazione dei carboidrati o degli acidi grassi.

I carboidrati entrano nel ciclo attraverso il piruvato che deriva dalle reazioni della glicolisi (processo anaerobico che avviene nel citoplasma) e che, dopo essere stato importato nel mitocondrio, subisce una decarbossilazione ossidativa per dare acetil-CoA (Ochoa, 1954).

Per quanto riguarda i lipidi, l'acetil-CoA deriva dalla loro ossidazione. Negli eucarioti superiori, gli acidi grassi, derivanti principalmente dal processo di mobilizzazione dei trigliceridi, vengono importati nella matrice mitocondriale mediante il sistema di trasporto dell'acil-carnitina. In questo sistema di trasporto le molecole di acido grasso, precedentemente attivate dal legame al coenzima A (acil-CoA), vengono coniugate alla carnitina. L'acil-carnitina viene poi trasportata attraverso la membrana mitocondriale interna da una traslocasi; in seguito il gruppo acilico viene trasferito di nuovo al CoA. Una volta all'interno della matrice mitocondriale, gli acil-CoA vengono ossidati attraverso la β -ossidazione, un processo che comporta un'ossidazione in più passaggi e la rimozione di unità bicarboniose sotto forma di acetil-CoA. Ciascun passaggio comporta quattro reazioni. Gli acidi grassi insaturi e/o a numero dispari di atomi di carbonio richiedono reazioni enzimatiche aggiuntive. Negli eucarioti superiori la maggior parte dell'ossidazione degli acidi grassi ha luogo nei mitocondri, ad eccezione degli acidi grassi a lunghissima catena la cui ossidazione avviene nei perossisomi. Nel lievito, invece, la degradazione degli acidi grassi avviene

prevalentemente nei perossisomi. Solo successivamente i gruppi acetile vengono trasportati, attraverso il sistema acetil-carnitina, nei mitocondri.

Ciascun ciclo dell'acido citrico prevede l'entrata di due unità carboniose sotto forma di gruppo acetile dell'acetil-coenzima A e il rilascio di due atomi di carbonio come CO_2 . I gruppi acetile dell'acetil-CoA, sono trasferiti a un acido organico a quattro atomi di carbonio, l'ossalacetato, formando così un acido tricarbossilico a sei atomi di carbonio, il citrato. Quest'ultimo entra in una serie di sette reazioni nel corso delle quali due atomi di carbonio vengono rilasciati come CO_2 e i rimanenti quattro atomi sono rigenerati come ossalacetato, pronto a ricominciare il processo (Figura 1.3). Dal punto di vista energetico durante il ciclo avvengono quattro reazioni di ossidazione, con il NAD^+ utilizzato come cofattore in tre di queste e il FAD nella quarta. Inoltre viene prodotto un legame fosfato ad alta energia (GTP, che è energeticamente equivalente all'ATP) a livello della reazione catalizzata dalla succinil-CoA sintetasi. La maggior parte dell'energia rilasciata viene pertanto immagazzinata sottoforma di potere riducente, e di conseguenza la maggior parte dell'ATP verrà prodotto nella catena respiratoria attraverso la riossidazione di NADH e FADH_2 .

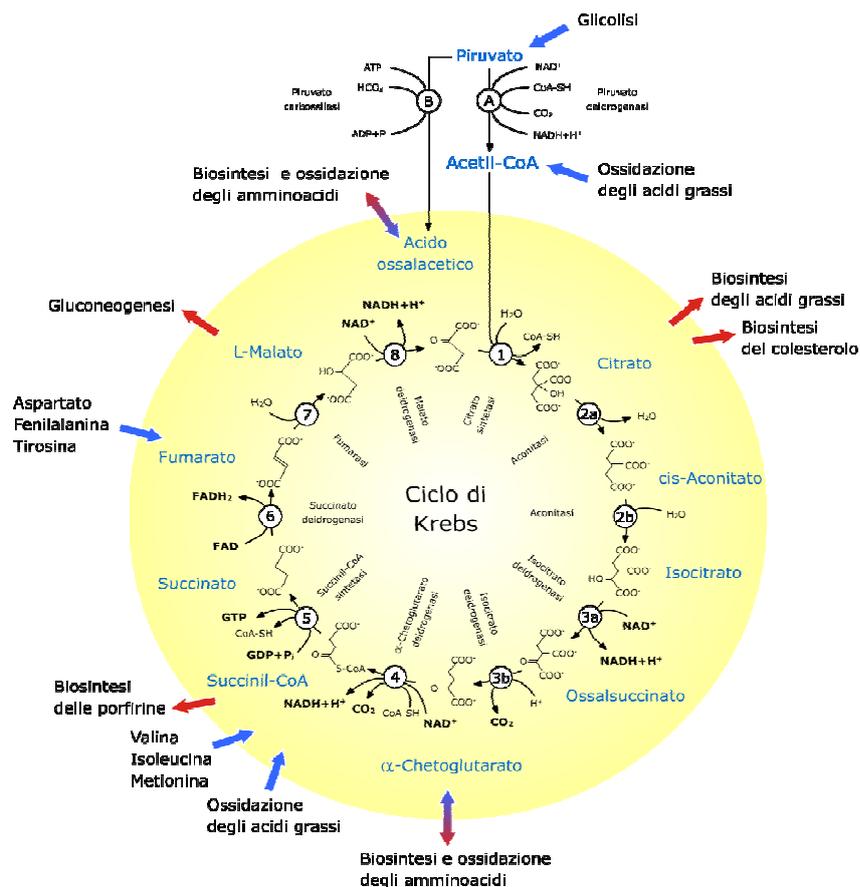


Figura 1.3 Rappresentazione schematica del ciclo di Krebs.

Fino ad ora la discussione sul TCA si è concentrata sul suo ruolo nel catabolismo e nella produzione di energia; il ciclo però funge anche da importante fonte di intermedi biosintetici (Figura 1.3). Queste vie anaboliche tendono a sottrarre carbonio dal ciclo utilizzandone gli intermedi. Per esempio il succinil-CoA è utilizzato per la sintesi dell'eme e di altre porfirine. L'ossalacetato e l' α -chetoglutarato sono i chetoacidi corrispettivi degli aminoacidi aspartato e glutammato, rispettivamente, e sono usati per la sintesi di questi e altri aminoacidi mediante transaminazione. L'aspartato e la glutammina a loro volta sono implicati nella biosintesi dei nucleotidi.

Dal momento che queste e altre reazioni tendono a consumare gli intermedi del ciclo dell'acido citrico sottraendo carbonio, il procedere del ciclo verrebbe meno se non esistessero processi in grado di ripristinare le riserve di intermedi del ciclo stesso. Questi processi costituiscono le vie anaplerotiche. Sebbene non siano solitamente classificate come vie anaplerotiche, le reazioni di transaminazione possono essere considerate anch'esse come tali, dal momento che sono reazioni reversibili che possono produrre intermedi del ciclo di Krebs. Di conseguenza, cellule che presentino abbondanza di aminoacidi possono convertirli a intermedi del ciclo dell'acido citrico mediante transaminazione generando α -chetoglutarato e ossalacetato da glutammato e aspartato. Un altro enzima, la glutammico deidrogenasi, costituisce un'altra possibilità per la sintesi dell' α -chetoglutarato a partire da glutammato. Inoltre molte piante e alcuni microrganismi, compreso il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, possono convertire frammenti a due atomi di carbonio a intermedi a quattro atomi di carbonio del TCA mediante il ciclo del gliossilato (vedi paragrafo successivo).

CICLO DEL GLIOSSILATO

Cellule vegetali, come pure alcuni microrganismi, compreso *S. cerevisiae*, sono in grado di realizzare una sintesi netta di carboidrati a partire dai grassi attraverso il ciclo del gliossilato (Kornberg and Beevers, 1957; Kornberg and Krebs, 1957) (Figura 1.4). Il ciclo del gliossilato può essere considerato una variante anabolica del TCA. A causa dell'irreversibilità della reazione piruvato deidrogenasica, l'acetil-CoA non può essere soggetto a una conversione netta in piruvato e quindi non può avvenire una sintesi netta di carboidrati a partire da esso. In realtà, i due atomi di carbonio dell'acetil-CoA possono essere incorporati nell'ossalacetato, che è un efficiente precursore nella gluconeogenesi; ma poiché due atomi di carbonio vengono persi in questa parte del ciclo dell'acido citrico, non si ha un accumulo netto di carbonio sotto forma di carboidrati. Il ciclo del gliossilato, al contrario, permette la sintesi netta di ossalacetato. Il ciclo del gliossilato è una via metabolica ciclica che trasforma due unità acetiliche, sottoforma di acetil-CoA, in una molecola di succinato. La via utilizza in parte gli stessi enzimi del ciclo di Krebs, ma non presenta quelle reazioni in cui vengono persi due atomi di carbonio. Al posto di queste reazioni, si ha l'aggiunta di una seconda molecola di acetil-CoA. Il ciclo quindi parte dalla condensazione dell'acetil-CoA e dell'ossalacetato per formare citrato, che viene isomerizzato a isocitrato; invece di venire decarbossilato,

l'isocitrato viene scisso dall'enzima isocitrato liasi in succinato e gliossilato. Le tappe successive rigenerano l'ossalacetato a partire dal gliossilato e acetil-CoA. Ogni ciclo determina quindi l'incorporazione di due frammenti a due atomi di carbonio e porta alla sintesi netta di una molecola a quattro atomi di carbonio. Questo processo ha luogo nel perossisoma, un organulo specializzato che realizza sia la β -ossidazione degli acidi grassi con formazione di acetil-CoA, sia la successiva utilizzazione dello stesso acetil-CoA nel ciclo del gliossilato. Il succinato prodotto viene trasportato dal perossisoma al mitocondrio, dove viene convertito in ossalacetato. L'ossalacetato è rapidamente utilizzato per la sintesi di carboidrati mediante la gluconeogenesi. Il ciclo del gliossilato permette inoltre a molti microrganismi di metabolizzare substrati a due atomi di carbonio, come l'acetato.

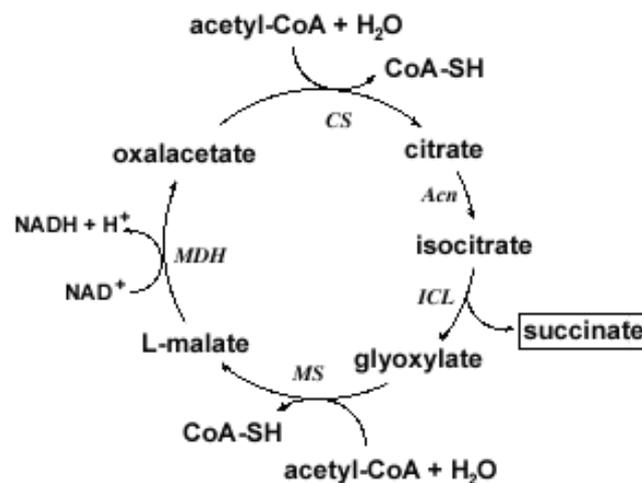


Figura 1.4 Rappresentazione schematica del ciclo del gliossilato. CS = citrate sintasi; Acn = aconitasi; ICL = isocitrato liasi; MS = malato sintasi; MDH = malato deidrogenasi.

1.1.2 Fosforilazione ossidativa

Il NADH e il FADH_2 derivati dalla glicolisi, dalla β -ossidazione e dal ciclo di Krebs sono molecole ricche di energia sottoforma di potere riducente, cioè contengono coppie di elettroni ad alto potenziale di trasferimento; quando questi elettroni vengono utilizzati per ridurre l'ossigeno molecolare ad acqua, viene liberata una grande quantità di energia libera, che può essere utilizzata per produrre ATP.

La respirazione consta di una catena di reazioni redox (di ossido-riduzione) sequenziali che utilizzano gli equivalenti riducenti derivati dalla degradazione ossidativa dei substrati carboniosi. Gli elettroni fluiscono lungo la catena respiratoria. Il progressivo passaggio degli elettroni a *carrier* di crescente affinità fino all'accettore finale del processo, l'ossigeno molecolare (un elemento molto attivo e potenzialmente dannoso), è associato all'efflusso di protoni. Il gradiente protonico così generato è infine utilizzato per la sintesi di ATP a partire da ADP e pirofosfato, reazione che prende il nome di fosforilazione ossidativa. La fosforilazione ossidativa quindi combina la respirazione con la sintesi di ATP.

Le reazioni redox sono catalizzate da quattro enzimi multimerici, i complessi della catena respiratoria I, II, III e IV. Queste strutture sono localizzate nella membrana mitocondriale interna, in stretto contatto tra loro e con due piccole molecole "shuttle", il coenzima Q (ubichinone) e il citocromo *c* (Figura 1.5).

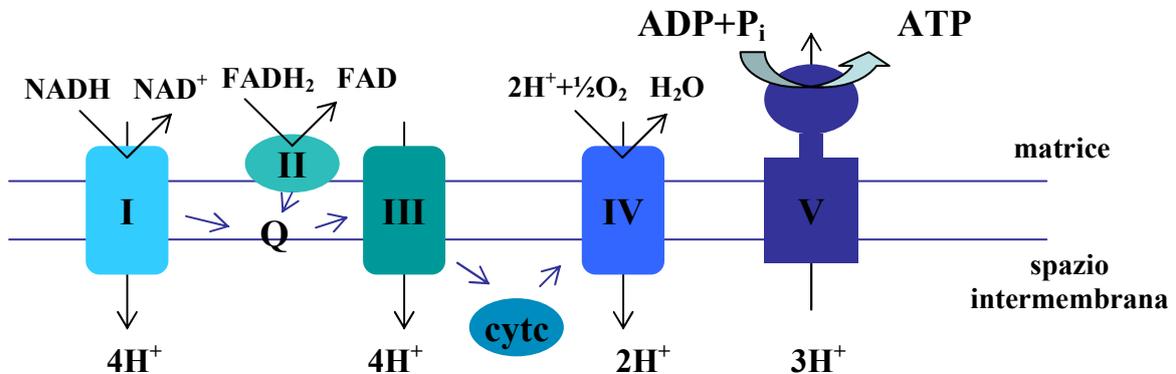


Figura 1.5 Complessi enzimatici del sistema OXPHOS mitocondriale. I: NADH-coenzima Q reduttasi; II: succinato-coenzima Q reduttasi; III: citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi; IV: citocromo c ossidasi; V: ATP sintasi; Q: coenzima Q; cytc: citocromo c. Le frecce blu rappresentano gli elettroni.

Il complesso I (NADH-coenzima Q reduttasi o NADH deidrogenasi), un enzima di 800 kDa costituito da almeno 34 catene polipeptidiche nell'uomo, catalizza la seguente reazione:



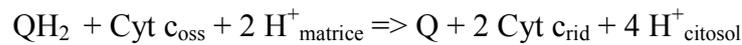
Riceve quindi elettroni dall'ossidazione del NADH e li trasferisce a un trasportatore di elettroni lipidico, il coenzima Q. Il flusso di due elettroni attraverso il complesso I determina il pompaggio di quattro ioni idrogeno fuori dalla matrice del mitocondrio. Il complesso I contiene un gruppo prostetico strettamente legato, il flavin mononucleotide (FMN). L'enzima contiene anche vari centri ferro-zolfo che trasferiscono elettroni dalla flavina ridotta al coenzima Q.

Il complesso II (succinato-coenzima Q reduttasi o succinato deidrogenasi) riceve elettroni dall'ossidazione del succinato e anch'esso li trasferisce al coenzima Q. La succinato deidrogenasi utilizza il FAD come coenzima. Il complesso II è l'unico complesso che funge anche da enzima del ciclo di Krebs, in quanto catalizza l'ossidazione del succinato a fumarato. Diversamente dagli altri enzimi del ciclo di Krebs, la succinato deidrogenasi è una proteina integrale della membrana mitocondriale interna. L'enzima può così trasferire gli elettroni direttamente dal FADH₂ a esso legato, agli altri trasportatori della catena respiratoria ancorati alla membrana. Anche il complesso II, come il complesso I, trasferisce elettroni al coenzima Q attraverso dei centri ferro-zolfo.

Il coenzima Q (CoQ o ubichinone), che a differenza degli altri trasportatori è in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana interna, trasferisce elettroni al complesso III.

Il complesso III (citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi) è un dimero, in cui ciascun monomero nell'uomo è formato da 11 distinte catene polipeptidiche, che contiene tre gruppi

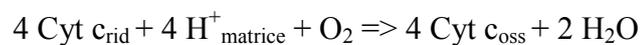
eme e un centro 2Fe-2S. L'enzima ossida la forma ridotta del coenzima Q e a sua volta riduce il citocromo c, e al tempo stesso pompa protoni all'esterno della matrice mitocondriale:



Il trasferimento di elettroni avviene attraverso, nell'ordine, i citocromi b, centri ferro-zolfo e il citocromo c₁.

Il citocromo c si distingue dagli altri citocromi in quanto non fa parte di complessi; infatti è un trasportatore proteico di elettroni debolmente ancorato alla membrana interna, in grado di diffondere lungo questa.

Il complesso IV (citocromo c ossidasi) è costituito da almeno 13 subunità e contiene due gruppi eme A e tre ioni rame, disposti come due centri Cu, designati con A e B. L'enzima accoppia l'ossidazione del citocromo c alla riduzione dell'ossigeno molecolare (O₂), l'accettore finale, ad acqua:



Il complesso IV è costituito dai citocromi a e a₃.

L'energia libera prodotta durante il trasporto degli elettroni viene conservata pompando protoni (H⁺) dalla matrice mitocondriale nello spazio intermembrana per creare attraverso la membrana mitocondriale interna un gradiente di H⁺. Il gradiente, chiamato gradiente elettrochimico, è sia di concentrazione chimica, in quanto la concentrazione di protoni nello spazio intermembrana è maggiore rispetto a quello nella matrice, sia di natura elettrica, in quanto la carica nello spazio intermembrana è maggiore. I protoni attraversano la membrana tramite un canale specifico presente nel complesso V e la dissipazione di questo gradiente permette la sintesi di ATP a partire da ADP e fosfato inorganico (Futai *et al.*, 1989).

Il complesso V non è un vero e proprio complesso respiratorio, ma un complesso, chiamato ATP sintasi, che, come detto, sintetizza ATP grazie all'energia rilasciata durante il trasporto di elettroni.

E' importante sottolineare che il gradiente protonico elettrochimico non è fondamentale solo per la sintesi di ATP, ma anche per la maggior parte delle altre funzioni mitocondriali e per il trasporto di sostanze attraverso la membrana interna tramite specifici trasportatori.

Le proteine ADP/ATP carrier (codificate dai geni *ANT* nell'uomo e *AAC* nel lievito) sono proteine integrali di membrana che scambiano ATP e ADP attraverso la membrana mitocondriale interna (Pebay – Peyroula *et al.*, 2003). Perciò anche queste sono componenti fondamentali del sistema OXPHOS mitocondriale in quanto sono responsabili della distribuzione dell'ATP sintetizzato nella matrice al resto della cellula e del rifornimento della matrice mitocondriale di ADP, il substrato dell'enzima F₁F₀-ATP sintasi.

Tre sono le classi di trasportatori di elettroni presenti nella catena di trasporto mitocondriale:

1) I centri ferro-zolfo (Fe-S) sono strutture complessate all'interno di proteine chiamate ferredossine, in cui uno o più atomi di ferro sono legati tramite legami di coordinazione a

atomi di zolfo inorganici o a atomi di zolfo di cisteine. Nei centri ferro zolfo i veri trasportatori di elettroni sono costituiti dagli atomi di ferro che, ciclicamente, accettano un elettrone riducendosi a ione ferroso (Fe^{2+}) e cedono l'elettrone riossidandosi a ione ferrico (Fe^{3+}).

2) I citocromi respiratori sono proteine a cui è complessata una molecola di tipo eme, il quale conferisce alla proteina la capacità di assorbire luce visibile, con un caratteristico spettro variabile da citocromo a citocromo. I citocromi respiratori vengono divisi in tre classi a seconda del picco di assorbimento nel visibile: citocromo a, con un picco di assorbimento a 602 nm; citocromo b, con un picco di assorbimento a 560 nm; citocromo c, con un picco di assorbimento a 550 nm. Tra i trasportatori di membrana mitocondriale sono presenti tre citocromi b, due citocromi c (c e c_1) e due citocromi a (a e a_3). Nei citocromi i veri trasportatori di elettroni sono i gruppi eme, di cui fanno parte uno ione Fe^{2+} e, nel caso dei citocromi a, anche uno ione Cu^+ .

3) L'ubichinone, o coenzima Q, è una molecola a struttura chinonica che, a differenza degli altri trasportatori, non è complessata a proteine. La struttura chinonica è legata a un numero specifico di unità isoprenoidi (10 nelle cellule di mammifero), le quali permettono alla molecola di diffondere liberamente nella membrana mitocondriale. L'ubichinone è in grado di accettare due elettroni in successione, passando dalla forma ossidata (ubichinone) alla forma parzialmente ridotta (semichinone), e da questa alla forma ridotta (ubichinolo). Nel caso dei chinoni, le reazioni di trasferimento degli elettroni sono accoppiate al legame e al rilascio dei protoni, una proprietà che è essenziale per il trasporto transmembrana dei protoni.

1.2 IL DNA MITOCONDRIALE (mtDNA)

Come detto in precedenza, una caratteristica peculiare dei mitocondri è che contengono un proprio genoma. Ogni mitocondrio contiene più copie di mtDNA, e il numero varia a seconda della specie, delle condizioni ambientali e, nel caso di organismi multicellulari, del tessuto. In generale, l'mtDNA è costituito da una molecola circolare la cui lunghezza è specie-specifica (tabella 1.1). Alcuni eucarioti inferiori posseggono un mtDNA di tipo lineare. In particolare, nel lievito *S. cerevisiae* sono presenti sia molecole circolari che lineari, queste ultime sotto forma di concatenameri (Bendich, 1996; Nosek and Tomaska, 2003).

Tabella 1.1 Dimensioni dell' mtDNA e numero di geni mitocondriali negli organismi dei vari regni (Lang *et al.*, 1999)

Regno	Dimensioni (Kb)	Geni codificanti proteine	Geni codificanti RNA
Funghi	19-100	8-14	10-28
Protisti	6-100	3-62	2-29
Piante	186-366	27-34	21-30
Animali	16-17	13	4-24

Per quanto riguarda l'organizzazione fisica dell'mtDNA, esso, al contrario del DNA nucleare, non è legato da istoni. Il DNA non è comunque "nudo". Infatti è compattato in particelle nucleo-proteiche chiamate nucleoidi. Di conseguenza l'mtDNA risulta essere organizzato in punti discreti all'interno della matrice mitocondriale, associato alla membrana mitocondriale interna (Iborra *et al.*, 2004; Legros *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2003). Il nucleotide è una struttura dinamica che contiene una o più copie di mtDNA (tabella 1.2), e rappresenta l'unità fondamentale di segregazione dell'eredità del genoma mitocondriale (Jacobs *et al.*, 2000).

I nucleoidi sono stati identificati in numerosi organismi (Miyakawa *et al.*, 1987; Bogenhagen *et al.*, 2003; Kaufman *et al.*, 2000; Meeusen *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2003), ma il meglio caratterizzato è sicuramente quello di *S. cerevisiae*.

Tabella 1.2 Confronto tra nucleoidi umano e di *S. cerevisiae* (Chen and Butow, 2005)

Specie		Dimensione (Diametro)	N° nucleoidi per cellula	N° mtDNA per nucleotide
<i>S. cerevisiae</i>	in cellule aerobiche	~0,2-0,4µm	~40-60	~1-2
	in cellule anaerobiche	~0,6-0,9µm	~7,6	~20
Uomo	/	~0,068µm	466-806 in linee cellulari	~2-10

In aggiunta a proteine che servono per il *packaging* dell'mtDNA, che sono necessarie per il mantenimento del genoma mitocondriale (Diffley and Stillman, 1991), il nucleotide contiene anche proteine le cui funzioni sono apparentemente non correlate alle attività del mtDNA (Kaufman *et al.*, 2000; Bogenhagen *et al.*, 2003; Kaufman *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda più nello specifico il nucleotide di *S. cerevisiae*, sono state identificate più di 20 proteine che lo compongono (Chen *et al.*, 2005). Queste sono state raggruppate in 4 categorie funzionali:

- 1) Proteine associate all'mtDNA che non hanno altre funzioni note nei mitocondri. Il nucleo proteico della struttura è costituito dalla proteina *histon-like* Abf2, che è coinvolta nel *packaging* dell'mtDNA, è fondamentale per il mantenimento dell'integrità dell'mtDNA, e è in grado di legarsi al genoma mitocondriale ogni 30 bp e di introdurre superavvolgimenti negativi (Diffley and Stillman, 1992). A questo nucleo si aggiungono proteine coinvolte nella replicazione, trascrizione, riparazione e segregazione del DNA mitocondriale, quali Mip1 (DNA polimerasi mitocondriale), Mgm101 (enzima di riparazione dell'mtDNA), Rim1 (proteina che lega il DNA a singolo filamento coinvolta nella replicazione), Sls1 (coinvolta nella trascrizione dell'mtDNA).

- 2) Proteine dell'*import* e biogenesi mitocondriale. Fanno parte di questo gruppo le proteine mtHsp60, mtHsp70, mtHsp10, che sono “*chaperon*”, e la subunità α della F_1 -ATP sintasi.
- 3) Enzimi del ciclo di Krebs e di reazioni a monte nella glicolisi. Fra queste ci sono gli enzimi aconitasi, isocitrato deidrogenasi, chetoglutarato deidrogenasi, aldeide deidrogenasi e piruvato deidrogenasi.
- 4) Enzimi del metabolismo degli aminoacidi. Fra questi ci sono le proteine Ilv5 e Ilv6 che sono coinvolte nella biosintesi di valina, isoleucina e leucina.

Il gruppo delle proteine bi-funzionali, che partecipano sia ad attività enzimatiche ben definite che, in un modo non ancora del tutto chiarito, al mantenimento della stabilità dell' mtDNA, sono particolarmente interessanti. Queste proteine, infatti, forniscono un meccanismo per accoppiare il metabolismo alla stabilità dell' mtDNA. E' possibile che le proteine bi-funzionali si siano evolute come sensori dei cambiamenti metabolici che possono così essere trasmessi al nucleotide per regolare la stabilità dell' mtDNA. Ad esempio, nel lievito, l'aconitasi ed Ilv5 sono cruciali per il metabolismo dei carboidrati e dell'ammonio, rispettivamente, e allo stesso tempo sono fondamentali per il mantenimento del DNA mitocondriale. La loro presenza nel nucleotide suggerisce che ci sia un meccanismo per il controllo metabolico dell' mtDNA e dell'attività del nucleotide; in questo modo segnali metabolici possono essere tradotti, modificando ad esempio la struttura del nucleotide, per controllare il mantenimento dell' mtDNA (Kucej and Butow, 2007).

1.2.1 Il DNA mitocondriale umano

Il DNA mitocondriale umano è una molecola circolare costituita da 16569 pb (figura 1.6), di cui è stata stabilita la sequenza nucleotidica completa (Anderson *et al.*, 1981). I due filamenti hanno una composizione in basi decisamente differente: il filamento pesante (H – heavy) è più ricco in guanine, mentre il filamento leggero (L – light) è più ricco in citosine.

Il genoma mitocondriale umano contiene 37 geni, 28 di questi presenti sul filamento pesante e 9 sul filamento leggero: 13 codificano per proteine dei complessi respiratori, 22 per i tRNA mitocondriali e 2 per gli rRNA mitocondriali (12S e 16S).

Il DNA mitocondriale, a differenza di quello nucleare, è straordinariamente compatto: il 93% circa della sequenza è codificante. Non ci sono introni e tutte le sequenze codificanti sono contigue o separate solo da pochi nucleotidi e mancano regioni fiancheggianti non tradotte. Ne risulta quindi un'organizzazione molto compatta, resa ancora più compatta dal fatto che alcuni geni sono parzialmente sovrapposti.

L'unica lunga regione non codificante del DNA mitocondriale è il *D-loop* (*displacement-loop*), una regione di circa 1 Kb che contiene i promotori per la trascrizione di entrambi i filamenti dell' mtDNA e il sito di inizio per la replicazione del filamento pesante (O_H) dell' mtDNA (Clayton, 1992). La trascrizione, a differenza dei geni nucleari, produce trascritti policistronici. In particolare nell' mtDNA umano sono presenti due promotori: il *light strand*

promoter (LSP) e il *heavy strand promoter* (HSP). Dal promotore HSP, situato sul filamento pesante a valle del D-loop, vengono trascritti come un unico mRNA tutti i geni, eccetto il gene per la subunità 6 della NADH deidrogenasi e otto geni per tRNA. Dall'LSP, situato a monte del gene per la subunità 6 della NADH deidrogenasi, vengono trascritti gli altri geni.

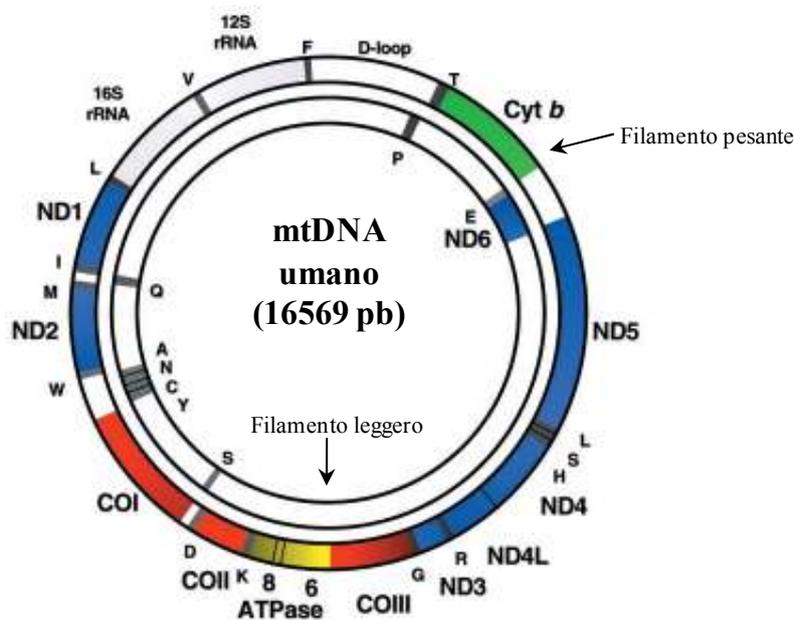


Figura 1.6 DNA mitocondriale umano: I geni che codificano per le varie subunità dei complessi respiratori sono rappresentati con colori diversi: Complesso I in blu, Complesso III in verde, Complesso IV in rosso, complesso V in giallo. I geni per tRNA sono rappresentati in grigio e identificati da diverse lettere. I geni per rRNA sono in grigio chiaro. (Da Zeviani and Di Donato, 2004)

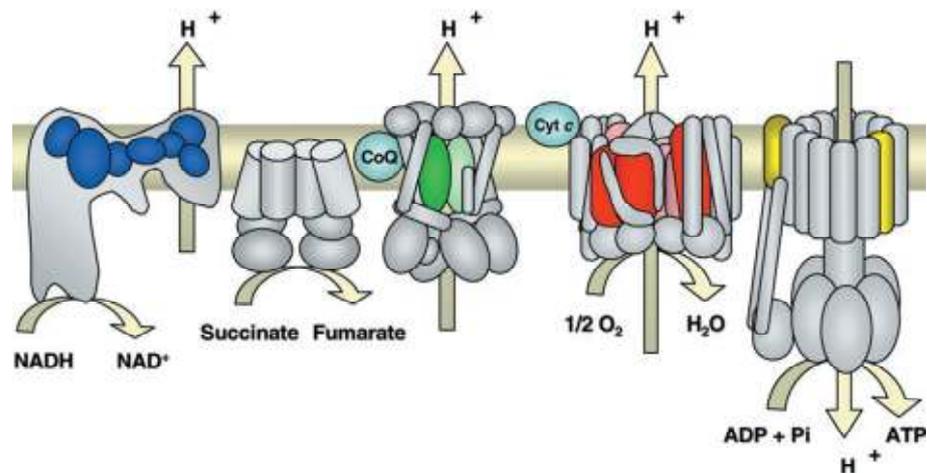
Tutte le 13 proteine codificate dal DNA mitocondriale sono componenti chiave della catena respiratoria (figura 1.7). Ne deriva che l'espressione dell'mtDNA è fondamentale per il mantenimento della fosforilazione ossidativa. Ma la maggior parte delle proteine dei complessi respiratori, nonché tutte le altre proteine mitocondriali, sono codificate da geni nucleari.

In particolare, il genoma mitocondriale umano codifica per:

- sette subunità del complesso I: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6;
- una subunità del complesso III, in particolare la componente proteica del citocromo b;
- tre subunità del complesso IV: COX1, COX2 e COX3 (o COI, COII, COIII);
- due subunità della porzione lipofilica del complesso V: ATPasi 6 e ATPasi 8.

Al contrario, tutte e quattro le subunità del complesso II sono codificate del DNA nucleare (Attardi, 1986).

I 22 tRNA mitocondriali sono codificati soltanto da geni mitocondriali. A causa del ridotto numero di geni per tRNA, il DNA mitocondriale ha sviluppato un proprio codice genetico, differente dal codice genetico universale e variabile a seconda della specie.



	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
N° subunits nuclear-encoded	>41	4	10	10	14
N° subunits mitochondrial-encoded	7	0	1	3	2

Figura 1.7 Subunità codificate da geni mitocondriali o geni nucleari dei complessi respiratori umani. Il codice colore è uguale alla figura 1.6. (Da Zeviani and Di Donato, 2004)

1.2.2 Il DNA mitocondriale di *S. cerevisiae*

Del genoma mitocondriale di *S. cerevisiae* è oggi disponibile la sequenza completa (Foury *et al.*, 1998). Esso presenta numerose differenze rispetto all' mtDNA umano. In primo luogo possiede una lunghezza maggiore, che varia da 68 Kb (*short strain*) a 86 Kb (*long strain*). In figura 1.8 è rappresentato schematicamente l' mtDNA di un ceppo *long*.

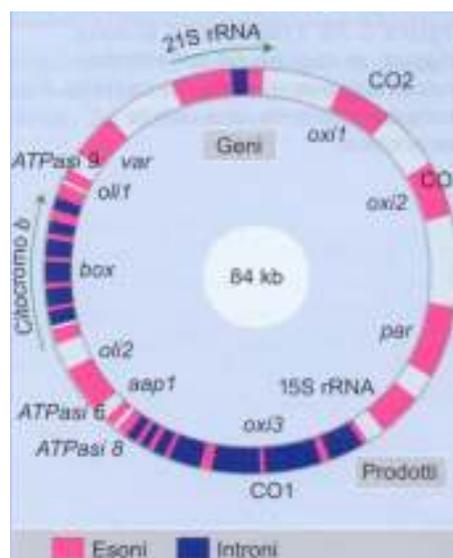


Figura 1.8 Rappresentazione schematica dell' mtDNA di un ceppo *long*. Le frecce indicano la direzione della trascrizione (da IL GENE VIII, Lewin).

Il genoma è lungo 85779 pb e, al contrario dell'mtDNA umano, presenta un basso grado di compattamento. Diverse regioni non sono codificanti, e tre geni contengono introni. Anche i geni mitocondriali di lievito sono trascritti per lo più come mRNA policistronici, ma in questo caso sono presenti più siti di inizio della trascrizione.

Il genoma mitocondriale di un ceppo *long* contiene 18 elementi codificanti per proteine, più 9 ORF dubbie o a funzione sconosciuta. Sette delle 18 proteine note fanno parte dei complessi respiratori (figura 1.9).

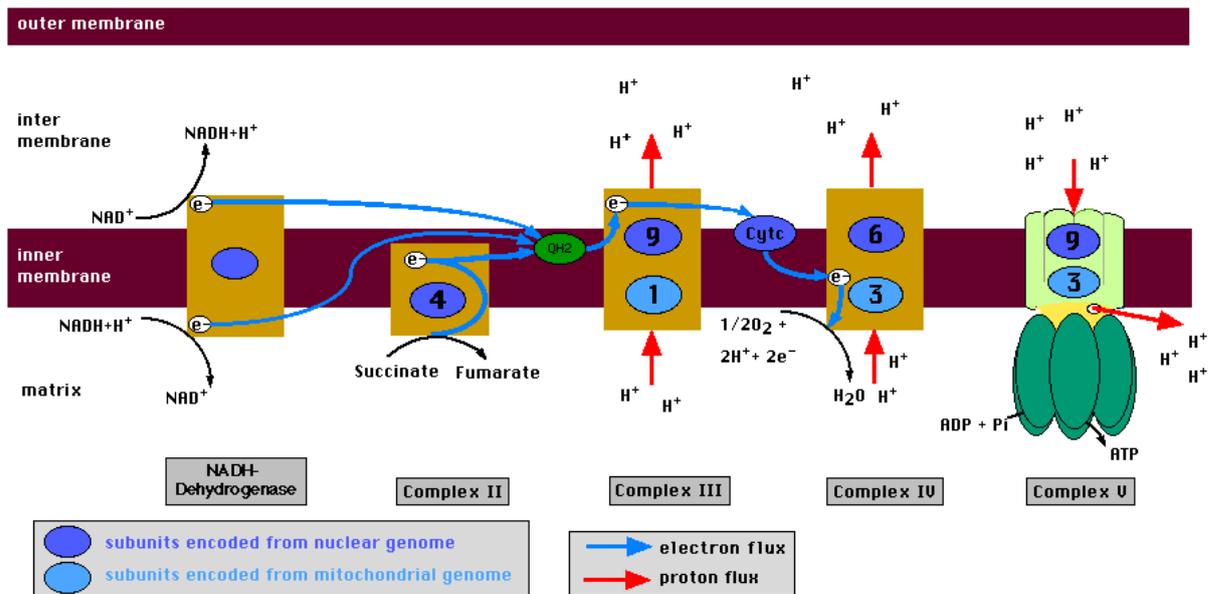


Figura 1.9 Subunità codificate da geni mitocondriali o geni nucleari dei complessi respiratori di *S. cerevisiae*. In blu le subunità codificate da geni nucleari, in azzurro le subunità codificate da geni mitocondriali, in verde il coenzima Q. Le frecce azzurre indicano il flusso di elettroni, le frecce rosse il flusso di protoni.

Al contrario di quanto si osserva nell'uomo, nessun gene codifica per subunità della NADH deidrogenasi, che nel lievito non è un complesso, ma una proteina singola codificata da un gene nucleare. Così come nell'uomo, il genoma mitocondriale di lievito codifica per una subunità del complesso III, l'apocitocromo b (codificato dal gene *COB*, detto anche *CYTB* o *BOX*) e per tre subunità del complesso IV, chiamate citocromo ossidasi 1 (codificata dal gene *COX1* o *OXI3* o *COI*), citocromo ossidasi 2 (*COX2* o *OXI2* o *COII*) e citocromo ossidasi 3 (*COX3* o *OXI1* o *COIII*). Inoltre sono codificate dall'mtDNA tre subunità dell'ATP sintasi (ATPasi 6, 8 e 9).

Il gene *VARI* codifica per una proteina ribosomiale mitocondriale. Le 10 proteine rimanenti, di cui è nota la funzione, sono codificate dagli introni presenti nei geni 21S rRNA, *COB* e *COX1* e consistono in maturasi, endonucleasi e trascrittasi inverse.

Il DNA mitocondriale di lievito inoltre codifica per i 24 tRNA mitocondriali. Anche in questo caso, a causa del ridotto numero di tRNA, il codice genetico presenta delle differenze rispetto al codice universale. Infine il genoma mitocondriale di lievito codifica per 2 rRNA (21S e

15S) e per un RNA (9 S) facente parte dell'RNasi P, coinvolta nella maturazione dei pre-tRNA mitocondriali.

Nei ceppi *short* sono presenti tutti i geni codificanti per tRNA, rRNA, proteine dei complessi respiratori e la proteina Var1. Mancano invece parti di regioni non codificanti, alcune ORF putative e alcuni introni, e di conseguenza RNA codificanti per maturasi o endonucleasi.

1.3 INTERAZIONE NUCLEO-MITOCONDRIO

L'assemblaggio e il funzionamento dei complessi respiratori necessita della "collaborazione" di prodotti genici derivati sia dal genoma nucleare che dal DNA mitocondriale (Attardi and Schatz, 1988; Grivell, 1989; Forsburg and Guarente, 1989a; Pon *et al.*, 1991).

Infatti, le subunità codificate dall'mtDNA di ogni complesso devono interagire con le altre subunità codificate dal DNA nucleare che sono sintetizzate nel citoplasma con una sequenza *target* per il mitocondrio (solitamente un peptide segnale all'N-terminale) che le dirige attraverso l'apparato di traslocazione. Questa sequenza *target* viene poi rimossa prima dell'assemblaggio delle subunità (Glick and Schatz, 1991; Hartl and Neupert, 1989; Neupert, 1997). I componenti dell'apparato di *import* (proteine TIM e TOM), gli enzimi coinvolti nel processo di *import*, e le proteine di assemblaggio della catena respiratoria sono tutti prodotti dei geni nucleari. I geni nucleari inoltre sono importanti per il mantenimento del genoma mitocondriale, infatti, ad esempio codificano per la DNA polimerasi γ mitocondriale (POLG1) e per proteine che mantengono un appropriato equilibrio dei nucleotidi liberi all'interno del mitocondrio (TP – timidina fosforilasi, TK – timidina chinasi, DGK – guanosina chinasi, e ANT1 - traslocatore di nucleotidi adeninici). Il DNA nucleare inoltre codifica per i fattori essenziali necessari per la replicazione, trascrizione e la traduzione intramitocondriale, inclusi TFAM, TFBM1, e TFBM2 (Larsson *et al.*, 1998; Falkenberg *et al.*, 2002). Dal nucleo inoltre vengono codificate anche le proteine necessarie per le varie funzioni metaboliche che avvengono nei mitocondri come il TCA o la sintesi dell'eme (Figura 1.10). Quindi il mitocondrio, che si crede sia un discendente di un primitivo batterio aerobio (Margulis, 1975), ha mantenuto solo una traccia delle sue informazioni geniche originarie, mentre molti geni sono stati trasferiti al nucleo della cellula ospite.

Secondo dati recenti, il proteoma mitocondriale umano è stimato consistere approssimativamente di 1500 prodotti genici (Calvo *et al.*, 2006), mentre le proteine mitocondriali di lievito sono circa 750 (Sickmann *et al.*, 2003).

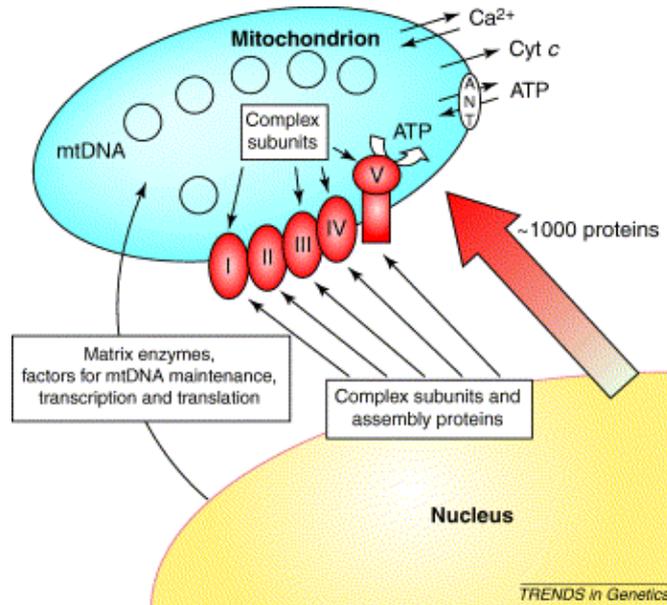


Figura 1.10 Fattori genetici che influenzano le funzioni mitocondriali. (Da Chinnery, 2003).

1.4 CARATTERISTICHE GENETICHE DEL MITOCONDRIO

La genetica del DNA mitocondriale differisce da quella del DNA nucleare e ha proprietà specifiche importanti per la comprensione delle malattie mitocondriali causate da mutazioni dell' mtDNA. Mentre la maggior parte delle cellule umane contiene due copie del DNA nucleare, esse contengono molte più copie di DNA mitocondriale (da 1000 a 100000, in funzione del tipo di cellula) (poliplasmia). Queste sono tutte identiche in un individuo sano alla nascita, condizione nota come omoplasmia. Al contrario, i pazienti con difetti patologici del mtDNA presentano spesso una miscela di DNA mitocondriale mutato e *wild type*, condizione nota come eteroplasmia (Holt *et al.*, 1990; Grossman and Shoubridge, 1996). La percentuale di mtDNA mutato può variare molto fra i diversi pazienti, ed anche da organo ad organo, e tra cellule dello stesso individuo. Studi *in vitro* hanno mostrato che la maggior parte delle mutazioni del mtDNA sono recessive (King and Attardi, 1988). In altre parole, le cellule sono in grado di tollerare un'alta percentuale di mtDNA mutato (fino al 60-90%) prima di sviluppare un difetto biochimico della catena respiratoria. Quindi l'espressione fenotipica di un difetto genetico si manifesta solo quando è stato raggiunto un livello critico, superato il quale compaiono i primi sintomi che diventano progressivamente più gravi. Viceversa al di sotto di questo livello che prende il nome di soglia o "threshold" le mutazioni risultano fenotipicamente silenti (Rossignol *et al.*, 2003). Questa soglia risulta inferiore nei tessuti maggiormente dipendenti dal metabolismo ossidativo rispetto a quelli in grado di utilizzare la glicolisi anaerobica e costituisce un ulteriore elemento di variabilità del fenotipo clinico (McKenzie *et al.*, 2003). Inoltre vi sono soglie diverse per differenti mutazioni, ad esempio circa l'80-90% per le mutazioni nei geni per tRNA e circa il 60% per delezioni del mtDNA

(Bourgeron *et al.*, 1993). L'effetto soglia può essere in parte spiegato con l'esistenza di riserve di macromolecole (mRNA, tRNA e proteine), presenti in eccesso rispetto alla quantità necessaria per garantire una respirazione normale (Rossignol *et al.*, 2003).

Il genoma mitocondriale presenta un'eredità particolare: durante la formazione dello zigote, uno spermatozoo fornisce alla cellula uovo il suo genoma nucleare ma non il suo genoma mitocondriale. Infatti durante la fecondazione il DNA mitocondriale dello sperma (circa 100 mtDNA) che entra nella cellula uovo viene rapidamente eliminato attraverso un meccanismo ancora sconosciuto (Sutovsky *et al.*, 1999). Di conseguenza, il genoma mitocondriale dello zigote è determinato esclusivamente da quello che si trova originariamente nell'ovulo non fecondato. Il genoma mitocondriale viene quindi ereditato per via materna; quindi la madre trasmette il suo mtDNA dell'oocita a tutti i suoi discendenti (Giles *et al.*, 1980).

Una delle caratteristiche più insolite delle malattie mitocondriali causate da difetti del mtDNA è la variabilità clinica tra fratelli. Si pensa che questo rifletta il "collo di bottiglia genetico" mitocondriale (Poulton *et al.*, 1998). Sembra infatti che ci sia una restrizione del numero di genomi mitocondriali durante l'oogenesi precoce, che crea un "collo di bottiglia genetico" funzionale. Infatti c'è un drammatico decremento del numero di copie del mtDNA tra un oocita maturo (più di 100.000 molecole) e un oogonio nella prole (circa 200 molecole) (Jenuth *et al.*, 1996). Quindi si avrà un effetto di campionamento: ogni campione indipendente conterrà proporzioni diverse di mtDNA mutati e *wild type* nel discendente. Sebbene questo generi variabilità nella trasmissione della mutazione nei discendenti, ciò accade comunque entro un dato intervallo di confidenza, spiegando perché gli studi familiari retrospettivi hanno mostrato comunque una relazione tra il livello di mtDNA mutato nella madre e nei figli (White *et al.*, 1999; Chinnery *et al.*, 2000).

Differenze nella trasmissione delle mutazioni non possono invece essere alla base di un altro fenomeno associato al fatto che in fratelli i difetti possono essere riscontrabili in diversi tessuti, ad esempio un fratello può presentare una malattia neurologica mentre un altro può sviluppare un'insufficienza cardiaca. Ovviamente devono entrare in gioco fattori addizionali. La variabilità clinica e biochimica di molte mutazioni del mtDNA potrebbe essere dovuta a un diverso *background* genetico mitocondriale e/o nucleare.

Il livello percentuale di mtDNA mutato nei singoli tessuti può anche cambiare durante lo sviluppo e durante tutta la vita adulta, potenzialmente influenzando il fenotipo di un individuo. Due meccanismi contribuiscono a questo processo: la replicazione rilassata e la segregazione mitotica.

Diversamente dal DNA nucleare che si replica solo una volta durante ogni ciclo cellulare, l'mtDNA è replicato continuamente, anche in tessuti che non sono in divisione come il muscolo scheletrico ed il cervello (Bogenhagen and Clayton, 1977; Birky, 2001). La replicazione del mtDNA è quindi indipendente dal ciclo cellulare e per questo è detta rilassata.

In una cellula eteroplasmica, è possibile che il DNA mitocondriale mutato e il *wild type* si replichino a velocità leggermente diverse; o perché un tipo è selezionato dal caso, oppure a causa di un lieve effetto selettivo in favore di un particolare tipo. In teoria, questo meccanismo può condurre a cambiamenti nella proporzione dell' mtDNA mutato che sono stati descritti in pazienti con malattie connesse a mutazioni del genoma mitocondriale, fornendo una spiegazione per l'inizio tardivo e la progressione di alcune patologie del DNA mitocondriale (Chinnery and Samuels, 1999).

Quando una cellula eteroplasmica si divide, le sottili differenze nella proporzione del mtDNA mutato dovrebbero essere passate alle cellule figlie. Questa redistribuzione casuale di organelli durante la divisione cellulare può portare a cambiamenti nel livello del mtDNA mutato all'interno di un tessuto in divisione (Birky, 2001; Birky, 1994). Se e quando si supera il livello soglia, si può anche verificare un cambiamento del fenotipo. La partizione disuguale dovrebbe essere un processo puramente casuale, indipendente da ogni selezione causata da un effetto della mutazione sulla funzione mitocondriale. Questo fenomeno spiega la variabilità clinica legata all'età e al tessuto che spesso si osserva in disordini legati all' mtDNA. D'altra parte, i presunti cambiamenti dovuti alla selezione funzionale possono dare una spiegazione del perché il livello di alcuni mtDNA mutati diminuiscano nel sangue durante la vita.

1.5 PATOLOGIE MITOCONDRIALI

Le patologie mitocondriali sono definite come fenotipi clinici causati da difetti nel *pathway* della fosforilazione ossidativa (OXPHOS) (Zeviani *et al.*, 1989).

Fino a dieci-quindici anni fa, si pensava che le disfunzioni mitocondriali fossero una causa rara di malattie nell'uomo. Così, i risultati degli studi epidemiologici sono stati sorprendenti, anche per i ricercatori di questo campo. E' infatti emerso che, come gruppo, le disfunzioni del sistema OXPHOS hanno un'incidenza di 1 su 5000 nati (Smeitink *et al.*, 2006), rendendole malattie tra le più comuni tra quelle geneticamente determinate.

Anomalie a livello mitocondriale sono state identificate anche nelle patologie neurologiche sporadiche più comuni, compreso l'Alzheimer e il Parkinson (Leonard and Schapira, 2000; Beal 2002). Inoltre anche il normale processo di invecchiamento è stato descritto come una patologia mitocondriale, poiché è caratterizzato dall'accumulo di mutazioni somatiche nel mtDNA, a indicare l'assoluta dipendenza delle cellule umane dal metabolismo ossidativo e il ruolo centrale svolto dai mitocondri in tale processo (Harmen, 1972). In tal senso, recentemente è stato dimostrato che l'aumento delle mutazioni puntiformi dell' mtDNA, ottenuto esprimendo in topo una variata mutata della polimerasi mitocondriale, è associato con un decremento della *lifespan* e con la comparsa prematura dei segni dell'invecchiamento. In questo modo è stato possibile dimostrare che esiste una relazione causa-effetto tra le mutazioni dell' mtDNA e il fenotipo "invecchiamento" (Trifunovic *et al.*, 2004).

Il primo caso di patologia mitocondriale fu descritto nel 1962: una giovane paziente presentava un marcato ipermetabolismo non tiroideo associato a proliferazione di mitocondri anomali, per forma e dimensione, e caratterizzati da un meccanismo di dissipazione dell'energia conseguente al mancato accoppiamento dell'ossidazione e della fosforilazione (Luft *et al.*, 1962).

Un progresso significativo nella comprensione delle malattie mitocondriali è avvenuto nel 1988 con la descrizione della prima mutazione patologica nell'mtDNA, una singola delezione in pazienti affetti da miopatia mitocondriale (Holt *et al.*, 1988), e dall'identificazione in differenti famiglie della prima mutazione puntiforme (G11778A) nel gene codificante la subunità 4 del complesso I in pazienti che manifestavano la neuropatia ottica ereditaria di Leber (Wallace *et al.*, 1988). La via via crescente disponibilità del sequenziamento automatico del DNA e delle tecniche di PCR su singola cellula hanno aperto la strada a lavori che hanno portato all'identificazione di numerose mutazioni puntiformi patologiche del mtDNA e diverse delezioni del mtDNA in pazienti con un vasto range di differenti sintomatologie (Servidei, 2002) (si veda il sito Web MITOP <http://www.mitomap.org>).

Le patologie mitocondriali hanno tipicamente un decorso progressivo e comprendono un ampio spettro di fenotipi clinici associati all'insufficienza della fosforilazione ossidativa, che rendono la diagnosi difficile e complessa. I tessuti maggiormente colpiti sono quelli con una più alta richiesta energetica e quindi più dipendenti dal metabolismo ossidativo, quali tessuto nervoso, tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, ma anche reni, fegato, sistema endocrino e retina (Land *et al.*, 2004). Di conseguenza i pazienti possono presentare, in varia combinazione e gravità, degenerazione muscolare, cardiopatia, disordini dei movimenti, diabete mellito, deficit renale, demenza e vari sintomi oftalmologici (McKenzie *et al.*, 2003); quindi, in pratica, sono stati identificati virtualmente sintomi in ogni organo del corpo. Da questo deriva che le patologie mitocondriali sono per lo più multisistemiche, e determinano sintomi associabili a più tessuti ed organi. Diversi sintomi sono comuni a più malattie, mentre altri sono specifici di alcune patologie.

In figura 1.11 sono illustrati i diversi organi interessati dal fenotipo clinico e il tipo di difetto/patologia.

Per quanto riguarda i tessuti dei pazienti, essi sono caratterizzati da fenotipi associati a difetti della fosforilazione ossidativa. In primo luogo, la maggior parte dei pazienti con disordini mitocondriali presentano fibre muscolari “*ragged-red*”, cioè fibre muscolari caratterizzate dall'accumulo di mitocondri, spesso anomali, sotto il sarcolemma dei miociti (Gasser *et al.*, 2001). Le fibre “*ragged-red*” si generano in seguito a proliferazione di mitocondri che si moltiplicano per supplire alla deficienza della fosforilazione ossidativa. Un altro fenomeno tipico delle malattie mitocondriali è la COX negatività, cioè i muscoli dei pazienti non presentano attività citocromo ossidasica all'analisi istochimica. Inoltre sono spesso associati

difetti in uno o più dei complessi respiratori, con una notevole riduzione dell'attività enzimatica.

Neurology: Hypotonia, cerebellar ataxia, epilepsy, myoclonic seizures, spasticity, psychomotor and mental retardation, leucodystrophy, cortical atrophy, peripheral neuropathy, Leigh-Syndrom, Friedreich's ataxia, Alpers-Syndrom, hered. spastic paraplegia, MELAS, MERRF, NARP

Lebers hered. optic neuropathy, optic atrophy

Sensorineural deafness

Retinitis pigmentosa, Ptosis, Cataract, Progressive External Ophthalmoplegia, Kearns-Sayre syndrome

Paraganglioma

Facial dysmorphism

Endocrinology: Hyperaldosteronism, Hypoparathyroidism, Growth hormone deficit (dwarfism), Diabetes

Liver failure, Hepatic insufficiency, Hepatomegaly

Cardiomyopathy, Conduction defects, Barth syndrome

Sideroblastic anaemia, Neutropenia, Thrombopenia, Pearson syndrome

Pancreatic exocrine insufficiency

Diarrhoea, Villous atrophy, recurrent vomiting, Myoneurogastrointestinal Encephalopathy MNGIE

Phaeochromocytoma

Tubulopathy, renal insufficiency

Myopathy, muscular atrophy Myoglobinuria, Rhabdomyolysis, Hypotonia, Myalgia, exercise intolerance

Pigment and hair anomalies, hypertrichosis

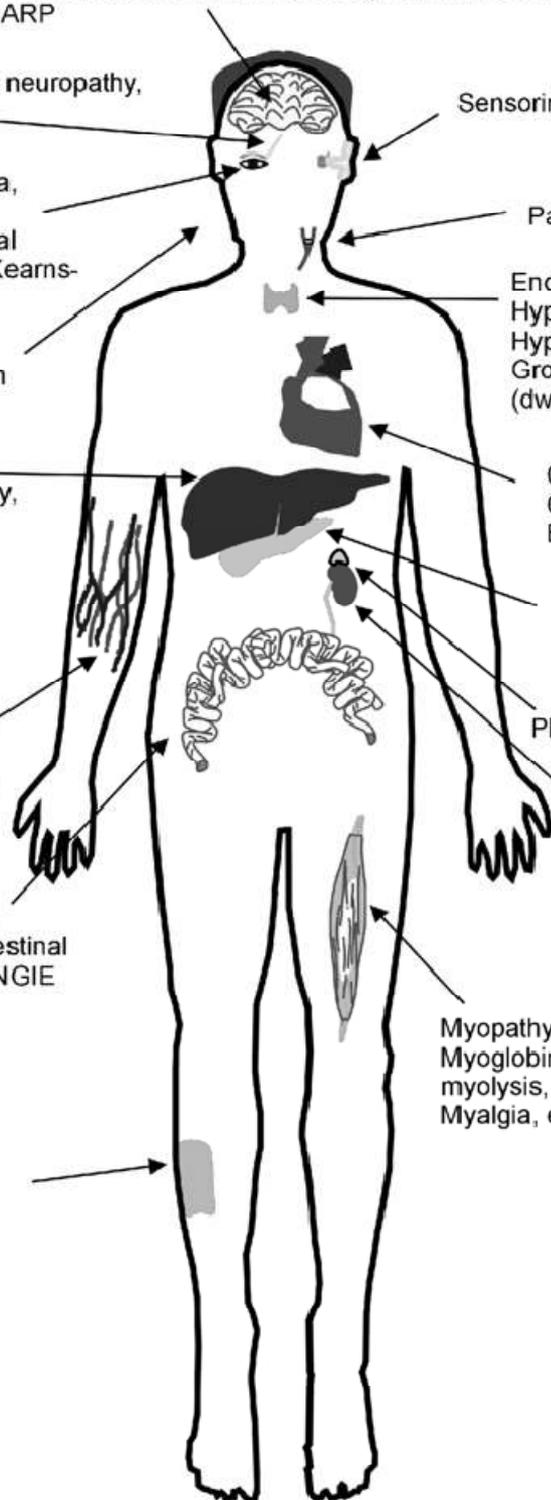


Figura 1.11 Fenotipi clinici associati alle patologie mitocondriali. (Da von Kleist-Retzow *et al.*, 2003)

La terapia per le patologie mitocondriali è assolutamente inadeguata. Spesso, in mancanza della comprensione delle basi molecolari del meccanismo patogenico, si sono adottate terapie palliative oppure sono stati somministrati in maniera indiscriminata vitamine, cofattori e antiossidanti con lo scopo di mitigare, posticipare o aggirare i danni postulati alla catena respiratoria (DiMauro *et al.*, 2000). La comprensione delle basi molecolari sottese alle varie patologia potrà contribuire significativamente all'individuazione di terapie mirate e trattamenti specifici.

Lo studio clinico delle patologie mitocondriali risulta particolarmente complesso, infatti diverse mutazioni possono causare sindromi simili, e viceversa, la medesima mutazione può portare, in diversi soggetti, a differenti malattie (Schon *et al.*, 1997).

Quindi, la malattia mitocondriale alla fine riflette un difetto della fosforilazione ossidativa all'interno di una cellula, ma lo schema del coinvolgimento cellulare determinerà le caratteristiche cliniche della malattia. Da una parte, devono esserci meccanismi comuni che spieghino perché i pazienti con mutazioni diverse possono avere un fenotipo clinico simile. Dall'altra parte, devono esserci meccanismi diversi per spiegare perché lo stesso difetto genetico può causare fenotipi clinici molto diversi tra loro.

Ad oggi non si è in grado di definire l'esatto meccanismo patofisiologico indotto dalle mutazioni e responsabile del quadro clinico (McKenzie *et al.*, 2003), si può solamente dire che la patogenesi è determinata da tre processi mitocondriali: la produzione di energia, la generazione di ROS e la regolazione dell'apoptosi e la loro interazione (Wallace, 1999). La fosforilazione ossidativa è la maggior fonte endogena di specie reattive dell'ossigeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) che sono dei prodotti tossici della respirazione. I ROS possono essere prodotti a partire dagli elettroni che vengono direttamente ceduti dal complesso I (NADH deidrogenasi) all'ossigeno molecolare, dando origine all'anione superossido. Questo viene detossificato dall'enzima superossido dismutasi che lo converte a perossido d'idrogeno. A sua volta l'acqua ossigenata è convertita ad acqua dall'azione della glutatione perossidasi, ma può essere anche convertita nella specie reattiva radicale idrossilico attraverso la reazione di Fenton. L'esposizione ai ROS può causare danni alle proteine, ai lipidi e agli acidi nucleici mitocondriali e cellulari. In particolare, i danni dei ROS stanno alla base della teoria mitocondriale dell'invecchiamento, secondo la quale l'invecchiamento è dovuto principalmente ad un incremento dei danni ROS-dipendenti sull'mtDNA con l'aumentare dell'età (Wallace, 2005).

L'aumento dello stress ossidativo e la riduzione della capacità energetica mitocondriale sono segnali in grado di indurre la morte cellulare programmata o apoptosi. Il mitocondrio gioca un fondamentale ruolo nell'inizio dell'apoptosi, l'innesco del processo è infatti costituito dall'apertura di un canale non specifico nella membrana mitocondriale interna, detto MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*). L'apertura del poro causa la dissipazione del potenziale di membrana con conseguente *swelling* del mitocondrio e il rilascio di fattori

promuoventi l'apoptosi, quali il citocromo c, in grado di innescare la cascata apoptotica mediata dalle caspasi citoplasmatiche (Wallace, 1999).

Abbiamo visto che le malattie mitocondriali sono fenotipi clinici associati alla disfunzione della fosforilazione ossidativa, che, ricordiamo, è sotto il duplice controllo del genoma mitocondriale (mtDNA) e del genoma nucleare (nDNA). Di conseguenza, le malattie mitocondriali possono essere causate da mutazioni o a carico del DNA mitocondriale o del DNA nucleare (figura 1.12).

Le mutazioni del mtDNA sono state a lungo considerate le cause predominanti; oggi sappiamo che più del 50% dei casi di malattie mitocondriali nell'adulto, e più dell'80% dei casi pediatrici, sono causati da mutazioni a livello dei geni nucleari e si può prevedere che il numero di geni nucleari coinvolti in patologie mitocondriali aumenti notevolmente.

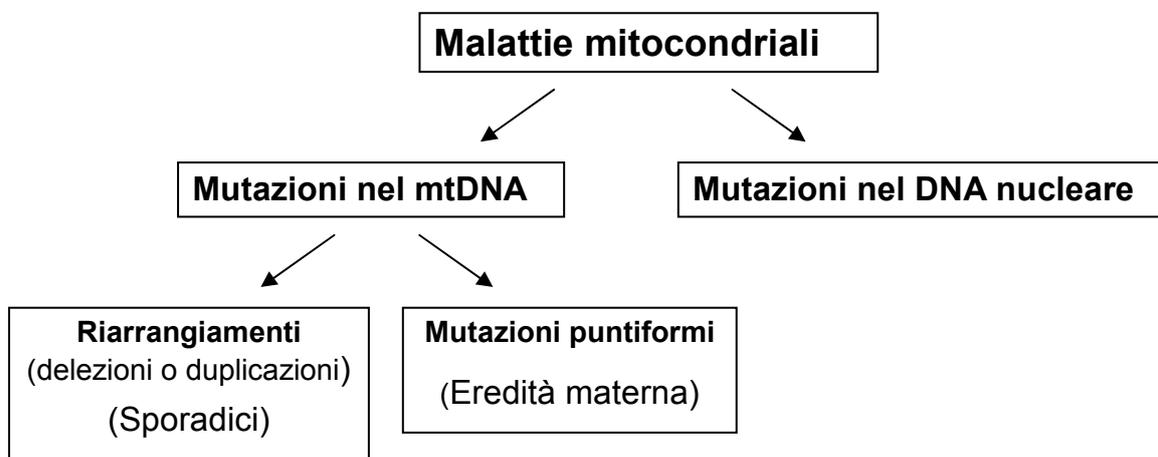


Figura 1.12 Suddivisione delle patologie mitocondriali.

1.5.1 Mutazioni nei geni del mtDNA

Le mutazioni del mtDNA sono divise in riarrangiamenti su larga scala (ad esempio delezioni o duplicazioni parziali) e mutazioni puntiformi. Mentre i riarrangiamenti su larga scala in genere sono sporadici, le mutazioni puntiformi generalmente sono ereditate per via materna. I riarrangiamenti su larga scala danneggiano diversi geni e sono invariabilmente eteroplasmici. Al contrario, le mutazioni puntiformi possono essere eteroplasmiche o omoplasmiche e possono colpire geni strutturali o geni coinvolti nella sintesi delle proteine mitocondriali (RNA transfer e RNA ribosomali) (Zeviani and Di Donato, 2004).

- **Riarrangiamenti su larga scala del mtDNA (mutazioni sporadiche)**

I tre importanti fenotipi clinici associati con queste mutazioni sono: sindrome di Kearns–Sayre (KSS), oftalmoplegia esterna progressiva sporadica (PEO) e sindrome di Pearson (Tabella 1.3).

Dato che la maggioranza dei riarrangiamenti su larga scala del mtDNA sono sporadici, quindi non sono di origine ereditaria, si crede che siano dovuti al risultato dell'amplificazione clonale di un singolo evento mutazionale, avvenuto nell'oocita materno o precocemente durante lo sviluppo dell'embrione (Schon *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1995). Di conseguenza ciascun paziente presenta un solo tipo di mtDNA mutato (DiMauro *et al.*, 1998). Attualmente non si comprende perché le mutazioni non siano trasmesse attraverso i gameti femminili alla progenie. Una possibilità è che le cellule germinali contenenti genomi deleti non siano vitali per la gametogenesi e/o la fecondazione (Schon *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1995).

La maggior parte dei riarrangiamenti mostrano all'estremità ripetizioni dirette di lunghezza variabile (Schon *et al.*, 1989; Mita *et al.*, 1989), suggerendo un meccanismo basato sulla ricombinazione omologa illegittima (Zeviani and Di Donato, 2004).

Le mutazioni possono colpire uno o più tessuti, anche a seconda della fase dell'embriogenesi durante la quale è avvenuto il riarrangiamento. L'ammontare relativo e la distribuzione tissutale delle lesioni molecolari dettano l'inizio e la gravità della patologia. Più estesa è la distribuzione tissutale della lesione, più grave sarà la sintomatologia clinica.

Queste mutazioni sporadiche sono sempre eteroplasmiche, cioè nei tessuti colpiti insieme alle molecole mutate si trovano anche molecole *wild type*, e quindi presentano le caratteristiche già discusse in precedenza, in particolare si ha l'insorgenza dei sintomi al superamento del livello soglia.

Tabella 1.3 Malattie causate da mutazioni sporadiche dell'mtDNA (reviewed in Zeviani and Di Donato, 2004).

Sindrome	Fenotipi clinici
KSS (Sindrome di Kearns-Sayre)	Atassia, neuropatia, PEO, deaerazione retinale pigmentosa, cardiomiopatia, bassa statura.
Oftalmoplegia esterna progressiva (PEO) sporadica	Ptosi bilaterale, oftalmoplegia, debolezza muscolare e intolleranza all'esercizio.
Sindrome di Pearson	Morte frequente nell'infanzia, anemia, vacuolarizzazione dei precursori del midollo.

- **Mutazioni puntiformi del mtDNA (eredità materna)**

In contrasto con i riarrangiamenti su larga scala, le mutazioni puntiformi del mtDNA sono generalmente ereditate per via materna.

Il DNA mitocondriale presenta un'elevata frequenza di mutazione, infatti è stato stimato accumulare 10 volte più danni ossidativi rispetto al DNA nucleare (Ames *et al.*, 1993). Ciò sembra essere dovuto, almeno in parte, alla limitata presenza di sistemi di riparazione (Croteau *et al.*, 1999), di proteine associate al DNA, che come gli istoni hanno una funzione protettiva (Richter *et al.*, 1988), e alla vicinanza al sito di produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Dato l'elevato tasso di mutabilità del DNA mitocondriale e la presenza di numerosi polimorfismi, la distinzione tra le mutazioni non deleterie e quelle patologiche può non essere facile. Le seguenti caratteristiche sono generalmente presenti nelle mutazioni patologiche: (1) mutazioni in nucleotidi/aminoacidi ad elevata conservazione nelle diverse specie o perdita di funzione del prodotto genico (ad esempio una mutazione di stop in un gene); (2) segregazione con il fenotipo patologico; (3) correlazione quantitativa tra il fenotipo clinico e il grado di eteroplasmia, se presente; e (4) identificazione della mutazione in famiglie di popolazioni etnicamente distinte (Zeviani and Carelli, 2003).

Le mutazioni più frequenti mappano in geni per i tRNA mitocondriali. Queste mutazioni causano una ridotta disponibilità di tRNA funzionanti e ciò può danneggiare la sintesi mitocondriale di tutte le proteine, portando quindi ad una riduzione di tutte le attività enzimatiche a codificazione mitocondriale. Viceversa, mutazioni che mappano in geni che codificano per proteine, danneggiano in maniera specifica la funzione del complesso della catena respiratoria al quale la proteina appartiene (Mariotti *et al.*, 1994).

Le mutazioni ereditate per via materna sono per lo più eteroplasmiche e si manifestano quando viene superato il livello soglia. Le mutazioni eteroplasmiche comprendono varie patologie quali: MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes), MERRF (Myoclonic epilepsy with ragged red fibres) e NARP (Neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa). Alcune mutazioni sono invece omoplasmiche e comprendono ad esempio le patologie LHON (Leber's hereditary optic neuropathy) e SNHL (Non-syndromic and aminoglycoside-induced sensorineural hearing loss) (Tabella 1.4).

In contrasto con molte mutazioni eteroplasmiche, l'espressione clinica di disordini associati con mutazioni omoplasmiche sono spesso stereotipate e principalmente limitate ad un singolo tessuto. In questo gruppo di patologie, la presenza di una mutazione patologica del mtDNA è necessaria ma non sufficiente per indurre la malattia. Come conseguenza, la penetranza è incompleta e probabilmente è controllata da fattori ambientali, polimorfismi mitocondriali addizionali o dall'effetto di uno o più geni nucleari (Howell and Mackey, 1998). Dunque, lo specifico meccanismo molecolare che sta alla base di questo contributo è tuttora largamente incompreso.

Tabella 1.4 Malattie da mutazioni eteroplasmiche ed omoplasmiche ad eredità materna (reviewed in Zeviani and Di Donato, 2004).

Sindrome da mutazioni eteroplasmiche	Fenotipi clinici
Encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica e <i>stroke-like episodes</i> (MELAS)	Lesioni del cervello nei lobi parieto-occipitali, acidosi lattica e fibre " <i>red ragged</i> "
Epilessia mioclonica con fibre " <i>red ragged</i> " (MERRF)	Mioclono, epilessia, debolezza muscolare, affaticamento, fibre " <i>red ragged</i> ", atassia cerebellare, sordità e demenza
Debolezza neurogenica, atassia e retinite pigmentosa (NARP)	Atassia, retinopatia pigmentosa, neuropatia periferica e debolezza neurogenica distale
Perdita di udito-atassia-mioclono	Perdita di udito, mioclono, epilessia, atassia e miopatia

Sindrome da mutazioni omoplasmiche	Fenotipi clinici
Neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON)	Perdita della visione centrale e microangiopatia circumpapillare
Perdita di udito sensoriale neurale non-sindromica e indotta da amino glicosidi (SNLH)	Perdita di udito

1.5.2 Mutazioni nei geni nucleari

Sono stati identificati vari geni nucleari che sono di fondamentale importanza per l'omeostasi del mitocondrio, e se questi geni sono mutati si ha l'insorgere di malattie mitocondriali autosomiche (Shoubridge, 2001). La scoperta che mutazioni in geni nucleari potessero determinare patologie mitocondriali è stata fatta nel 1989 da Zeviani (Zeviani *et al.*, 1989).

Patologie dovute a mutazioni nel DNA nucleare sono molto numerose, non solo perché la maggior parte delle subunità della catena respiratoria sono codificate dal genoma nucleare, ma anche perché la corretta struttura e il funzionamento della catena respiratoria richiede diversi *step*, che sono tutti sotto il controllo del DNA nucleare (DiMauro; 2004). Questi *step* includono:

- a) il corretto assemblaggio dei complessi respiratori, infatti mutazioni in queste proteine ancillari è stata associata a diverse patologie;
- b) la segnalazione intergenomica in quanto l'integrità e la replicazione dell'mtDNA richiedono fattori codificati dal DNA nucleare;
- c) l'*import* mitocondriale di proteine a codificazione nucleare;
- d) la sintesi di fosfolipidi della membrana mitocondriale interna dato che la catena respiratoria è localizzata in tale doppio strato lipidico. Ad esempio l'alterata sintesi di cardiolipina causa la sindrome di Barth (BTHS). La cardiolipina, infatti, non è semplicemente uno *scaffold* ma è una parte indispensabile di alcuni componenti della catena respiratoria (Schlame *et al.*, 2000);
- e) mobilità e fusione-fissione mitocondriale. I mitocondri si muovono nella cellula, si dividono per fissione e si fondono per fusione l'uno con l'altro. Disordini in questi processi essenziali possono causare patologie, tra cui la meglio conosciuta è la forma autosomica dominante di atrofia ottica determinata da mutazioni nel gene OPA1 (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000).

Quindi, a causa dell'estrema complessità della fosforilazione ossidativa, della sua peculiare organizzazione genetica, e delle svariate funzioni complessivamente svolte dai mitocondri, il numero di geni potenzialmente coinvolto nelle patologie mitocondriali è enorme e tende a coincidere con il proteoma mitocondriale stesso (Calvo *et al.*, 2006). Quasi il 99% delle proteine mitocondriali sono infatti codificate da geni nucleari.

La maggior parte delle mutazioni mendeliane segue un modello di trasmissione autosomico recessivo o, più raramente, un modello recessivo legato al cromosoma X. Le mutazioni

dominanti rappresentano un gruppo minore ma interessante di patologie mitocondriali (Zeviani and Carelli, 2005).

E' stata proposta una classificazione genetico-clinica per questi difetti (Leonard and Schapira, 2000; DiMauro and Schon, 2003; Zeviani *et al.*, 2003).

Le patologie mitocondriali possono essere determinata da mutazioni in:

1. geni che codificano componenti strutturali della catena respiratoria;
2. geni che codificano fattori di assemblaggio dei complessi OXPHOS;
3. geni che codificano proteine coinvolte nella sintesi di componenti non proteiche della catena respiratoria;
4. geni che codificano proteine indirettamente correlate con l'OXPHOS;
5. geni coinvolti nella stabilità dell'mtDNA.

Per quanto riguarda i primi 4 gruppi di geni, la patologia è dovuta alla mutazione nucleare in sé, che inibisce il processo della fosforilazione ossidativa o, più in generale, il metabolismo mitocondriale.

Mutazioni in uno di questi geni causano diverse patologie, fra cui le più comuni sono la sindrome di Leigh, il paraganglioma ereditario, la sindrome di Barth e l'atassia di Freidreich. Per i tipi di patologia mitocondriale, i fenotipi clinici e i geni coinvolti nella patologia si rimanda al database MITOMAP (www.mitomap.org).

Nel caso di mutazioni in geni che codificano componenti strutturali della catena respiratoria, in figura 1.13 sono rappresentate le subunità della catena respiratoria, codificate sia dal mtDNA che dal nDNA, le cui mutazioni sono note causare patologie mitocondriali, e le rispettive patologie.

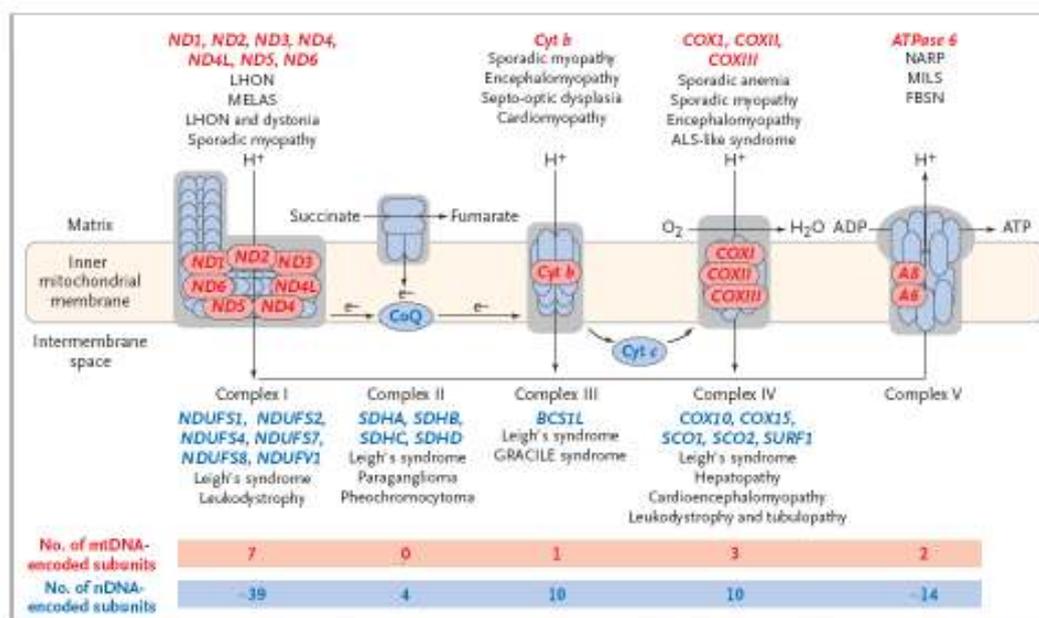


Figura 1.13 Subunità della catena respiratoria codificate dal nDNA (in blu) e dal mtDNA (in rosso), che mutate determinano le patologie mitocondriali indicate. (Da DiMauro and Schon, 2003)

Per quanto riguarda le malattie associate a instabilità dell' mtDNA, che verranno trattate anche nel paragrafo successivo, queste sono dovute a mutazioni in geni nucleari codificanti proteine mitocondriali fondamentali per la stabilità dell' mtDNA. Mutazioni in uno di questi geni causa instabilità dell' mtDNA, in particolare delezioni multiple e/o deplezione, cioè riduzione del numero di copie. In questo caso, le mutazioni in geni nucleari sono la causa primaria della patologia, e determinano come effetto secondario mutazioni del DNA mitocondriale; ma alla fine sono i difetti dell' mtDNA a determinare il fenotipo patologico (Zeviani *et al.*, 1995; Gasser *et al.*, 2001).

Le patologie causate da mutazioni in geni nucleari associate ad instabilità nell' mtDNA condividono molte caratteristiche con le patologie sporadiche. Anche in questo caso infatti i sintomi sono multisistemici e progressivi, e la sintomatologia subentra quando viene superato il livello soglia.

I geni responsabili di patologie associate ad instabilità dell' mtDNA e le corrispondenti patologie sono riportate in tabella 1.5.

Tabella 1.5 Principali malattie causate da mutazioni in geni nucleari associate ad instabilità dell' mtDNA (reviewed in Zeviani and Di Donato, 2004; Alberio *et al.*, 2007; Zeviani and Carelli, 2007).

Gene	Sindrome	Fenotipi clinici
POLG (subunità catalitica della DNA polimerasi mitocondriale)	PEO autosomica dominante (adPEO), PEO autosomica recessiva (arPEO), PEO sporadica	Delezioni multiple dell' mtDNA, PEO, debolezza muscolare, atassia depressione, ipogonadismo, perdita di udito, neuropatia periferica
	Sindrome da atassia-neuropatia (ANS)	Delezioni multiple dell' mtDNA, neuropatia periferica, disartria, difetti cognitivi di media gravità, movimenti involontari, sintomi psichiatrici, mioclono e attacchi epilettici
	Neuropatia atassica sensoriale, disartria e oftalmoparesi (SANDO)	Delezioni dell' mtDNA, neuropatia, disartria, oftalmoparesi, areflessia, depressione, emicrania, disfagia e nistagmo
	Sindrome di Alpers	Deplezione dell' mtDNA, atrofia del cervello, crisi epilettiche, regressione psicomotoria, proliferazione dei dotti biliari, fibrosi, cirrosi, crisi epatiche croniche, ipotonia, emiparesi e atassia
POLG2 (subunità accessoria della DNA polimerasi mitocondriale)	arPEO	
C10ORF2 (elicasi Twinkle)	arPEO	
ANT1 (ADP/ATP carrier)	adPEO e arPEO	
TP (timidina fosforilasi)	Encefalomiopatia mitocondriale neuro-gastrointestinale (MNGIE) dominante o recessiva	Delezioni multiple e deplezione dell' mtDNA, oftalmoparesi, neuropatia periferica, leucoencefalopatia, sintomi gastrointestinali

Malattie autosomiche dovute a difetti nella comunicazione intergenomica nucleo-mitocondrio possono essere associate o con l'accumulo di riarrangiamenti su larga scala del mtDNA (difetto qualitativo), denominate come "mtDNA breakage syndromes", o con severe riduzioni del numero di copie di mtDNA (difetto quantitativo), denominate "mtDNA depletion syndromes" (MDDS). Quest'ultimo gruppo è trasmesso come un tratto autosomico recessivo ed è fenotipicamente eterogeneo sebbene colpisca invariabilmente neonati o bambini (Spinazzola *et al.*, 2008a). Il primo caso di MDDS è stato descritto nel 1991 da Moraes e colleghi (Moraes *et al.*, 1991).

Attraverso analisi *Southern-blot* o *real-time* PCR è possibile mettere in evidenza la riduzione del numero di copie dell'mtDNA. Nei tessuti affetti questa riduzione può addirittura arrivare, nelle forme più gravi, fino al 98%. La drastica riduzione del mtDNA osservata in alcuni tessuti, causa un'insufficiente sintesi delle subunità dei complessi respiratori codificate dal mtDNA (complessi I, III, IV e V) (Spinazzola *et al.*, 2008a).

In accordo con i diversi fenotipi, la deplezione del mtDNA può riguardare uno specifico tessuto (in genere o il fegato o il cervello), oppure una combinazione di organi e tessuti, compresi muscoli, fegato, cervello e reni. Attualmente comunque sono note 3 ben definite forme di MDDS: miopatica (OMIM #605966), encefalomiopatica (OMIM #612073) ed epatocerebrale (OMIM # 251880) (reviewed in Spinazzola *et al.*, 2008a). Nonostante i fattori nucleari coinvolti nell'integrità dell'mtDNA siano potenzialmente molti, ad oggi sono stati identificati solo 7 geni che mutati determinano deplezione del mtDNA causando specifici fenotipi (Tabella 1.6).

Per un elenco di tutte le mutazioni che causano MDDS finora identificate si rimanda alla *review* di Poulton e colleghi del 2009 (Poulton *et al.*, 2009), escluse le mutazioni di POLG per le quali esiste un database (<http://tools.niehs.nih.gov/pol/>).

Le mutazioni in questi 7 geni sono in relazione con una minoranza dei casi clinici di MDDS, confermando l'esistenza di molti geni addizionali, oltre a quelli identificati, implicati nella patogenesi delle malattie da deplezione dell'mtDNA.

Tabella 1.6 Caratteristiche cliniche e genetiche delle sindromi da deplezione del mtDNA. (Spinazzola *et al.*, 2008a)

	Age of onset	Liver disease	Muscular features	CNS features	mtDNA depletion	Other features
POLG1	Variable	Hepatic failure	Myopathy, external ophthalmoplegia	Poliodystrophy, ataxia, epilepsia partialis continua	Liver, muscle	Valproate hepatotoxicity
DGUOK	Neonatal	Hypoglycaemia, hepatic failure	Hypotonia	Nystagmus, dystonic movements	Liver	–

PEO1	Neonatal	Hepatic failure	Myopathy, hypotonia, ophthalmoplegia	Athetosis, sensory neuropathy, ataxia, epilepsy	Liver	Infantile-onset spinocerebellar ataxia (IOSCA)
TK2	Infancy, childhood	None	Myopathy, elevated CK	Occasionally PEO, seizures	Muscle	SMA1-like, SMA3-like, muscular dystrophy
RRM2B	Neonatal, infancy	None	Trunk hypotonia	Microcephaly and global developmental delay hearing loss	Muscle, kidney	Tubulopathy nephrocalcinosis
SUCLG1	Neonatal	Hepatomegaly	Hypotonia, lactic acidosis	Connatal encephalopathy	Muscle, liver	Dysmorphisms, methylmalonic aciduria
SUCLA2	Infancy	None	Hypotonia, lactic acidosis	Leigh-like syndrome, dystonia	Muscle	Dysmorphisms, methylmalonic aciduria

Nella forma miopatica i bambini affetti nascono, di solito, dopo una gravidanza priva di complicazioni, anche se in alcuni casi è stata notata una diminuzione del movimento del feto. I sintomi di solito insorgono nei primi anni di vita, e cominciano con difficoltà ad alimentarsi, mancanza di crescita, ipotonia, debolezza ed occasionalmente oftalmoplegia esterna progressiva (PEO). Spesso i pazienti muoiono nell'infanzia o nella pubertà a causa di insufficienza polmonare e infezioni, ma alcuni pazienti sono sopravvissuti più a lungo (Moraes *et al* 1991; Oskoui *et al* 2006; Tritschler *et al* 1992). La forma miopatica della sindrome da deplezione del DNA mitocondriale è chiaramente una malattia clinicamente eterogenea in quanto solo circa il 20% dei casi è associato a difetti genetici noti. L'isoforma mitocondriale della timidina chinasi (TK2) è il gene più frequentemente mutato (Saada *et al* 2001; Mancuso *et al.*, 2003), ma recentemente è stato identificato un secondo gene che codifica la subunità B della ribonucleotide reduttasi p53 dipendente (RRM2B). Mutazioni in questo secondo gene sono state identificate come responsabili di una rara e severa variante che combina la miopatia ad insorgenza infantile con una tubulopatia prossimale renale con nefrocalcinosi (OMIM #612075) (Bornstein *et al* 2008; Bourdon *et al* 2007).

Per quanto riguarda la forma encefalomiopatica di MDDS, ad oggi sono state riportate due varianti, entrambe causate da un blocco della succinil-CoA sintasi (SCS) che è un enzima del ciclo di Krebs. La prima è caratterizzata da un valore elevato di lattato nel sangue, un severo ritardo psicomotorio con ipotonia muscolare e udito compromesso. E' stata inoltre documentata una moderata deplezione del mtDNA (circa 30%) nel muscolo scheletrico (Carrozzo *et al.*, 2007; Elpeleg *et al.*, 2005; Ostergaard *et al.*, 2007a). Mutazioni in SUCLA2, il gene che codifica la succinil-CoA sintasi ATP-dipendente (SCS-A), sono responsabili di

questa forma. La prevalenza dell'enzima SCS-A nei muscoli e nel sistema nervoso centrale spiega la tessuto-specificità della patologia. La seconda variante è causata da una mutazione in *SUCLG1* che codifica l'isoforma della succinil-CoA sintasi GTP-dipendente che è espressa in modo ubiquitario. La sua espressione ubiquitaria spiega perché queste mutazioni siano associate con una combinazione estremamente grave di disfunzioni muscolari e del fegato, caratteristiche dismorfiche, acidosi lattica e morte nei primi giorni di vita (Ostergaard *et al.*, 2007b). Entrambe le varianti sono caratterizzate da acidosi metilmalonica, determinate dall'acido metilmalonico che si accumula a causa dell'inefficiente conversione del propionil-CoA, derivato dalla β -ossidazione degli acidi grassi a catena dispari, in succinil-CoA. Nonostante la deplezione del mtDNA sia certamente una caratteristica molecolare comune alle due varianti patologiche, il ruolo nella patogenesi è poco chiaro. Da una parte la riduzione del mtDNA in genere è meno grave di quanto non riscontrato in altre condizioni e dall'altra lo specifico difetto metabolico, preannunciato dall'acidosi metilmalonica, implica un blocco del ciclo di Krebs, un *pathway* mitocondriale cruciale per la produzione di energia, e anche di altri *pathway* collaterali associati ad esso.

Nella forma epatocerebrale l'insorgenza dei sintomi avviene tra la nascita e i primi 6 mesi di vita e la morte spesso avviene entro il primo anno di vita. I sintomi più comuni includono: vomito persistente, incapacità di crescere, ipotonia e ipoglicemia associati a sintomi neurologici progressivi. La maggior parte dei pazienti presenta come caratteristica clinica principale insufficienza epatica, ma ad essa spesso si aggiunge un coinvolgimento neurologico, inclusi ipotonia, compromissione neuromuscolare, neuropatia periferica, atassia, distonia, o ritardo psicomotorio e di sviluppo. Il difetto del fegato generalmente è progressivo (come quello neurologico) e l'uso del valproato come farmaco per trattare l'epilessia può peggiorare questo difetto (Spinazzola *et al.*, 2008a).

Una parte dei casi è stata correlata a mutazioni in uno dei 3 seguenti geni: *DGUOK* (Mandel *et al.* 2001a), *POLG1* (Van Goethem *et al.*, 2001) e *PEO1* (Sarzi *et al.*, 2007a; Hakonen *et al.*, 2007). *DGUOK* è il gene che codifica la deossiguanosina chinasi mitocondriale (dGK) che è un enzima del *pathway* mitocondriale di salvataggio delle purine che converte le purine deossiribonucleotidi nei corrispondenti nucleotidi; *POLG1* codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi gamma mitocondriale; *PEO1* codifica per l'mtDNA elicasi Twinkle.

Cosa si sa del meccanismo molecolare alla base di queste patologie? Per quanto riguarda le mutazioni che colpiscono geni i cui prodotti sono coinvolti nella replicazione dell'mtDNA, come nel caso di *POLG* e del gene codificante per l'elicasi Twinkle, il meccanismo che lega la mutazione alla deplezione dell'mtDNA è chiara e diretta.

Inoltre, un adeguato rifornimento e corretto bilanciamento del dNTP *pool* mitocondriale sono essenziali per il mantenimento del numero di copie del DNA mitocondriale (Ashley *et al.*, 2007). Perturbazione di questo controllo omeostatico, come testimoniano i difetti di *dGUOK*, *TK2*, e presumibilmente anche *RRM2B*, possono portare alla deplezione dell'mtDNA.

Tuttavia, la base della tessuto-specificità è ancora poco conosciuta. I primi due enzimi sono coinvolti nel *pathway* di salvataggio dei deossinucleotidi mitocondriali, che costituiscono la principale fonte di precursori del DNA mitocondriale nei tessuti quali fegato, cervello e muscoli. In contrasto con TK2 e DGUOK, che codificano entrambi per enzimi mitocondriali, il gene RRM2B codifica per una subunità della ribonucleotide reduttasi (RNR), un enzima citosolico, che è coinvolto nella fase terminale della sintesi *de novo* dei deossinucleotidi, convertendo i nucleotidi nei corrispondenti deossinucleotidi durante la fase S del ciclo cellulare (Tanaka *et al.*, 2000). La presenza di MDDS nel muscolo sia dei pazienti che dei topi mutanti dimostra che, oltre alla riparazione del DNA, la ribonucleotide reduttasi p53-dipendente controlla anche la sintesi *de novo* del DNA mitocondriale in cellule in proliferazione così come nelle cellule post-mitotiche. Il controllo dell'espressione di p53-R2 da parte della proteina oncosoppressore p53 stabilisce un interessante legame tra l'omeostasi del mtDNA, i meccanismi di riparazione del DNA e la trasformazione neoplastica. Un difetto nell'ultima fase del *pathway* di salvataggio dei dNTP mitocondri è stato ipotizzato nella patogenesi dovuta a mutazioni in SUCLA2 (Elpeleg *et al.*, 2005) e SUCLG1 (Ostergaard *et al.*, 2007b) poiché SCS-A e SCS-G sono associati con la difosfato nucleoside chinasi (NDPK), che contribuisce all'omeostasi dei ribonucleotidi e deossiribonucleotidi nei mitocondri. Tuttavia, il ruolo svolto dalle deplezioni del DNA mitocondriale nelle manifestazioni cliniche di mutazioni in questi ultimi due geni non è chiaro, ma è probabilmente collaterale, e forse determinato dal grave difetto metabolico causato dal blocco del TCA mitocondriale (Spinazzola *et al.*, 2008).

1.7 IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO GENE CHE MUTATO DETERMINA UNA FORMA EPATOCEREBRALE DI MDDS: MPV17

Ho anticipato che, dal punto di vista molecolare, sono state identificate le cause della forma epatocerebrale di MDDS solo in una parte dei pazienti; ne deriva che in molti casi (~80%) non si sa quale gene mutato determini la patologia. Ciò ovviamente rende impossibile ogni speculazione sul meccanismo molecolare che sottende la patologia e ogni speculazione su una possibile terapia mirata e specifica che agisca sul *target* molecolare.

Recentemente è stato fatto un ulteriore passo avanti nell'identificazione di geni nucleari che mutati determinano malattie mitocondriali.

Nel 2006 sono state individuate 3 famiglie non correlate con pazienti di pochi mesi o anni di vita affetti da MDDS epatocerebrale, che non presentavano mutazioni nei geni noti causare tale patologia (Spinazzola *et al.*, 2006).

L'analisi di *linkage* ha permesso di identificare una regione piuttosto lunga (19cM), all'interno della quale risiedeva la "causa" della patologia. Purtroppo tale regione conteneva

un elevato numero di geni: 151. E' stato quindi necessario un approccio genomico integrativo *in silico* attraverso l'utilizzo del programma denominato Maestro (Calvo *et al.*, 2006). Tale programma identifica i probabili geni che codificano per prodotti mitocondriali, che data la patologia, sono i candidati più ovvi da testare.

L'analisi di sequenza ha poi portato all'identificazione di un gene, che mutato, è causa della patologia: MPV17 (Spinazzola *et al.*, 2006).

Sono state identificate differenti mutazioni recessive nei probandi delle tre famiglie (figura 1.15) (Spinazzola *et al.*, 2006):

- In una famiglia di origine italiana è stata identificata una mutazione omozigote 149G→A, che causa la sostituzione del residuo di arginina 50 con uno di glutamina (R50Q). Gli individui 1-1 e 1-3 sono morti di insufficienza epatica durante il primo anno di vita, mentre il trapianto di fegato all'età di un anno nell'individuo 1-2 e un controllo della glicemia attraverso la dieta nell'individuo 1-4, hanno permesso una maggiore sopravvivenza dei pazienti. L'individuo 1-4 però all'età di nove anni ha sviluppato sintomi neurologici con lesioni multiple al cervello.
- In una famiglia di origine marocchina è stata identificata una mutazione omozigote 498C→A, che causa la sostituzione del residuo di asparagina 166 con uno di lisina (N166K). L'individuo 2-4, il quarto ammalato di sei figli, è morto nei primi mesi di vita a causa dell'insufficienza epatica.
- In una famiglia canadese è stata identificata, in un allele, una mutazione missenso 148C→T, che porta alla sostituzione del residuo di arginina 50 con un residuo di triptofano (R50W), e nell'altro allele, una delezione di 25 pb (116-141del) che porta alla formazione di un polipeptide tronco. L'individuo 3-1, secondo figlio di genitori non consanguinei, è morto di insufficienza epatica nei primi mesi di vita.

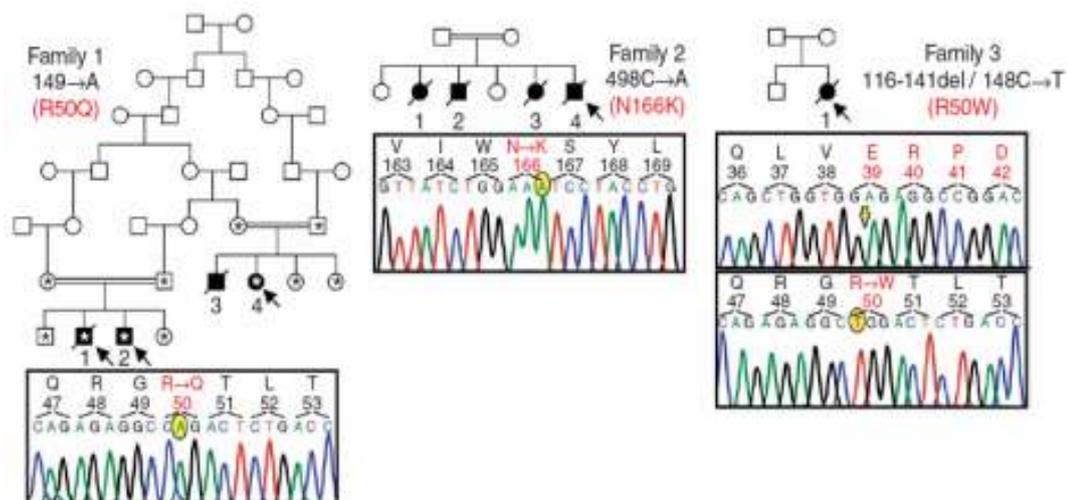


Figura 1.15 *Pedigree* delle tre famiglie utilizzate nell'analisi di *linkage*. I simboli pieni indicano gli individui malati; gli asterischi indicano gli individui della famiglia 1 che sono stati utilizzati nell'analisi di *linkage*; le frecce indicano i probandi; i simboli pieni e barrati sono individui malati deceduti. A fianco di ogni *pedigree* è presente l'analisi delle sequenze mutate di MPV17, con i nucleotidi mutati evidenziati in giallo; il cambiamento amminoacidico è indicato in rosso; la freccia gialla indica il punto d'inizio della delezione 116-141 nella famiglia 3. (Da Spinazzola *et al.*, 2006)

La caratteristica comune a tutti i pazienti è la presenza di una drastica riduzione del numero di copie di mtDNA (deplezione) (85% - 95%) nel fegato che è associata a difetti multipli dei complessi della catena respiratori correlati all' mtDNA, in modo particolare il complesso I e il complesso IV. Per quanto riguarda i sintomi, i pazienti presentavano una grave insufficienza epatica (il fegato mostra spesso fibrosi progressiva portale e lobulare che evolve in cirrosi terminale, ittero ed elevati livelli di lattato ed enzimi epatici nel sangue, gravi, spesso letali, crisi ipoglicemiche, ritardo di crescita, sintomi neurologici e multiple lesioni cerebrali (Spinazzola *et al.*, 2006).

Dopo questo primo innovativo lavoro, sono stati identificati vari pazienti con mutazioni in MPV17.

Nel 2007 Wong e collaboratori hanno analizzato 3 famiglie con 4 membri che presentavano una progressiva disfunzione epatica durante l'infanzia e hanno identificato, oltre alla già nota mutazione che determina la sostituzione aminoacidica R50W, tre nuove mutazioni patologiche in MPV17 (Wong *et al.*, 2007): a) una mutazione determina la sostituzione del triptofano in posizione 69 con un codone di stop (W69X) dando origine ad una proteina tronca mancante di ben $\frac{2}{3}$ della porzione C-terminale della proteina; b) una delezione *in-frame* di 3 nucleotidi (c.263_265del3); e c) una delezione *in-frame* di 9 nucleotidi (c.234_242del9).

Nel 2008 Navarro-Sastre e colleghi si sono occupati di un paziente che all'età di 13 mesi presentava una severa disfunzione epatica, ipoglicemia, ritardo di crescita e, in seguito, sintomi neurologici. E' stata identificata una nuova mutazione nel gene MPV17: una transizione in posizione +5 nel primo introne (c.70+5G→A, IVS1+5G→A) (Navarro-Sastre *et al.*, 2008).

Nello stesso anno Spinazzola e colleghi si sono occupati di tre pazienti con ipoglicemia, acidosi lattica e disfunzione epatica progressiva; i sintomi neurologici si sono manifestati solo in un secondo momento. In questo caso le mutazioni individuate sono: a) una mutazione nonsense che causa la sostituzione del triptofano in posizione 120 con un codone di stop (W120X); b) una mutazione non senso che causa la sostituzione della glicina in posizione 24 con un triptofano (G24W); e c) una macrodelezione che copre parte del settimo introne e parte dell'ottavo esone (Spinazzola *et al.*, 2008b).

Infine, Kaji e colleghi nel 2009 hanno identificato due ulteriori mutazioni in MPV17: 1) c.451insC nel sesto esone che determina un *frame-shift* che porta ad un prodotto genico allungato (p.Leu151fsX189 o p.Leu151PhefsX39); 2) c. 509C>T nel settimo esone che causa la sostituzione della serina 170 con una fenilalanina (S170F) (Kaji *et al.*, 2009).

Una variante di MDDS epatocerebrale associata a mutazioni in MPV17 è la neuroepatopatia Navajo (Navajo Neurohepatopathy – NNH, OMIM #256810), anch'essa una patologia multisistemica autosomica recessiva (Holve *et al.*, 1999; Vu *et al.*, 2001; Karadimas *et al.*,

2006). Le due patologie, oltre alla trasmissione autosomica recessiva, mostrano alcuni tratti comuni come ad esempio epatopatia e insufficienza epatica che colpisce bambini in tenera età, il coinvolgimento del sistema nervoso e deplezione dell' mtDNA. L'NNH colpisce in maniera particolare la popolazione Navajo del sud-ovest degli Stati Uniti con un'incidenza di circa 1 su 1600 nati vivi (Singleton *et al.*, 1990). L'NNH è stata descritta per la prima volta già nel 1976 (Appenzeller *et al.*, 1976), ma l'allele causa della patologia è rimasto sconosciuto fino a poco tempo fa.

In base alla gravità dei sintomi e all'età di insorgenza si possono distinguere tre diverse forme di NNH: neonatale, infantile e giovanile o classica. La forma neonatale, con insorgenza entro il sesto mese di vita, è caratterizzata da ittero e ritardo di crescita seguiti da insufficienza epatica e morte entro i due anni di vita; nella forma infantile, con insorgenza tra il primo e il quinto anno d'età, l'epatopatia si manifesta in modo acuto e progredisce rapidamente portando a insufficienza epatica e morte entro pochi mesi; mentre la forma classica (o giovanile), che ha insorgenza variabile, è caratterizzata da una moderata disfunzione epatica, neuropatia progressiva, e sopravvivenza fino all'età adulta (Holve *et al.*, 1999; Singleton *et al.*, 1990).

E' stata identificata una mutazione omozigote (149 G>A che determina la sostituzione aminoacidica R50Q) nel gene MPV17 in tutti i pazienti con NNH (Karadimas *et al.*, 2006). L'identificazione di una singola mutazione missenso indica che probabilmente la patologia è dovuta al "effetto del fondatore", cioè derivi da un singolo evento mutazionale. Infatti, l'attuale popolazione (circa 60.000 abitanti) presente nella parte occidentale della riserva Navajo discende da solo circa 1.000 individui (Johnston, 1966; Hwelte, 1971). Come conseguenza dell'isolamento geografico, si può quindi considerare che ci sia stata una sorta di deriva genetica nota come "effetto del fondatore".

Dato che tutte le forme cliniche presentano la stessa mutazione, il genotipo non può predire il fenotipo, ed inoltre ciò suggerisce che ci siano altri fattori che contribuiscono a determinare la gravità della patologia.

Un fatto che ha suscitato curiosità è che la mutazione identificata nei pazienti affetti da NNH (149 G>A), è stata trovata anche in una famiglia di origine italiana con MDDS epatocelebrale (Spinazzola *et al.*, 2006), in accordo con l'evidente similarità tra l'NNH e l'MDDS epatocelebrale per quanto riguarda le caratteristiche cliniche, patologiche e biochimiche. Questo ha fatto ipotizzare che la mutazione fosse stata trasmessa ai discendenti da un antenore comune. Infatti, anche se le popolazioni Navajo e italiana sono geograficamente ed etnicamente distanti, storicamente sono entrate in contatto durante le spedizioni organizzate da Francisco Vazquez de Coronado (AD 1540-1545). Ma questa originale ipotesi è stata smentita dall'analisi dell'aplotipo (Spinazzola *et al.*, 2008c), quindi deve essere avvenuta la medesima mutazione in maniera indipendente nelle due popolazioni. E' interessante notare che è stata identificata anche una mutazione che riguarda il residuo adiacente (148C>T) al nucleotide 149 (Wong *et al.*, 2007). La spiegazione probabilmente risiede nel fatto che la C₁₄₈

e la G₁₄₉ formano una sequenza CpG che è nota essere un sito particolarmente mutageno (*hotspot*) a causa della propensione della 5-metilcitosina ad andare in contro a deaminazione idrolitica (Pfeifer, 2006).

Quindi, dato l'aumento di mutazioni in MPV17 identificate di recente, l'analisi di questo gene dovrebbe essere inclusa nella diagnosi differenziale di pazienti con MDDS che presentano particolari sintomi neurologici.

Nel complesso i dati indicano che le mutazioni in MPV-17 sono associate con una sindrome con un'insorgenza molto precoce, entro i primi anni di vita, che è caratterizzata da due fasi. I primi sintomi sono metabolici; i pazienti presentano gravi crisi ipoglicemiche, associate a un progressivo e rapido deterioramento delle funzioni epatiche fino alla cirrosi e all'insufficienza epatica. Successivamente, se i pazienti riescono a superare questa prima fase, si ha l'insorgenza di sintomi neurologici che colpiscono sia il sistema nervoso centrale che periferico.

Dal punto di vista molecolare la caratteristica più rilevante è la presenza di deplezione del mtDNA nel fegato, e, in misura minore nei muscoli, dove però la deplezione non è accompagnata da un difetto enzimatico evidente, al contrario del fegato dove le attività enzimatiche dei complessi respiratori sono alterate. Una caratteristica interessante dei pazienti è l'ipoglicemia che, generalmente, insorge dopo appena 3-4 ore dal pasto. Inoltre l'infusione continua di glucosio non porta all'aumento del lattato nel sangue, al contrario di quanto osservato in altre disfunzioni della catena respiratoria (Touati *et al.*, 1997). Queste caratteristiche sono simili a quelle delle patologie di accumulo di glicogeno di tipo I, nelle quali la glicogenosi e la gluconeogenesi sono entrambe difettose e la produzione di energia è basata solo sulla glicolisi (Parini *et al.*, 2009).

Analisi strutturali fatte sui mitocondri degli epatociti hanno evidenziato, in alcuni casi, una anormale forma e dimensione e la presenza di *cristae* dilatate e distorte (Wong *et al.*, 2007).

Il trattamento dell'insufficienza epatica e della progressiva deficienza epatica nelle epatopatie mitocondriali rimane del tutto insoddisfacente, infatti non esistono cure risolutive, ma solo trattamenti palliativi. Fino ad ora sono stati utilizzati cofattori, vitamine, substrati respiratori, per nessuno dei quali è ancora stata provata una reale efficacia. L'unica vera possibilità terapeutica è il trapianto di fegato; ma il suo ruolo nelle epatopatie mitocondriali rimane controverso a causa della natura multisistemica della patologia. I pochi casi indicano un tasso di sopravvivenza del 50% (Sokal *et al.*, 1999; Dubern *et al.*, 2001; Delarue *et al.* 2000). La presenza di sintomi extra-epatici è una forte controindicazione al trapianto di fegato, ma il coinvolgimento neurologico potrebbe non essere ancora riscontrabile al momento dell'intervento e potrebbe manifestarsi solo in seguito (Thomson *et al.*, 1998). Quindi, nonostante ci siano casi documentati nei quali il trapianto di fegato è avvenuto con successo (Dubern *et al.*, 2001), l'assenza di fenotipi extra-epatici al momento del trapianto non sono

una garanzia di un esito positivo e non previene l'evoluzione di neuropatie periferiche e centrali.

Recentemente è stato dimostrato che, prevenire le crisi ipoglicemiche che, ricordiamo, sono spesso fatali, somministrando glucosio o alimentando i pazienti ogni 3 ore con cibi a lento rilascio di carboidrati, è efficace nel migliorare i problemi al fegato e rallentarne la progressione (Parini *et al.*, 2009). Tuttavia, nonostante ciò renda possibile un parziale controllo del difetto metabolico, i pazienti svilupperanno comunque i sintomi neurologici.

In contrasto con l'aumento delle mutazioni patologiche identificate nel gene MPV17, si sa poco o nulla della funzione di Mpv17 e del suo ruolo nella patogenesi.

1.8 MPV17: QUALE FUNZIONE?

Il gene MPV17 è stato identificato per la prima volta in topi transgenici ottenuti mediante inserzione casuale di costrutti retrovirali nel genoma di cellule embrionali staminali di topo (Weiher *et al.*, 1990). Il gene murino MPV17 si localizza sul cromosoma 5 (Karasawa *et al.*, 1993) e codifica per una proteina idrofobica di 176 aminoacidi con funzione sconosciuta. I topi omozigoti *Mpv17^{-/-}* così ottenuti, nei quali l'espressione del gene MPV17 risulta assente, mostrano una grave disfunzione renale caratterizzata da proteinuria causata da glomerulosclerosi focale segmentaria (FSGS) (O'Bryan *et al.*, 2000), simile dal punto di vista fisiologico ed istologico alla glomerulosclerosi umana. L'insorgenza dei sintomi avviene 2-3 settimane dopo la nascita dei topi, il decorso è progressivo e la morte avviene per insufficienza renale dopo 9-12 mesi (Weiher *et al.*, 1990). Nel topo il gene è espresso in una grande varietà di tipi cellulari, nonostante la patologia sia specifica per il rene (Weither *et al.*, 1990). In realtà, in aggiunta al fenotipo renale, i topi *Mpv17^{-/-}* mostrano anche degenerazione delle strutture dell'orecchio interno, determinando perdita dell'udito (Meyer zum Gottesberg *et al.*, 1996; Meyer zum Gottesberg and Felix, 2005).

Inizialmente è stato ipotizzato che la proteina Mpv17 avesse un ruolo nel metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) in quanto in fibroblasti ottenuti da topi *knock-out* per il gene MPV17 la produzione di ROS risulta ridotta, mentre l'overespressione di MPV17 ne induce l'aumento (Zwacka *et al.*, 1994). Tuttavia, successivamente, sono state riportate evidenze in favore dell'ipotesi che il danno renale osservato in assenza di MPV17 fosse determinato dall'over-produzione di specie reattive dell'ossigeno e dal conseguente accumulo di lipidi perossidati. Infatti, la progressione della patologia nei topi *Mpv17^{-/-}* veniva inibita trattando con molecole antiossidanti e molecole che contrastano la perossidazione dei lipidi (Binder *et al.*, 1999). E' stato ipotizzato che un eccesso di ROS, possibile conseguenza di un difetto OXPHOS nei glomeruli dei topi MPV17^{-/-}, fosse la causa dei danni e della degenerazione osservata nei podociti dei glomeruli renali; questi effetti potrebbero a loro

volta compromettere l'integrità anatomica e funzionale della membrana basale glomerulare (GBM), fondamentale nel processo di filtraggio a livello renale.

L'omologo umano è stato identificato attraverso ibridazione interspecifica (Karasawa *et al.*, 1993; Weiher, 1993). L'analisi di sequenza ha rivelato un'identità superiore al 90% nella regione codificante, nell'uomo, un polipeptide di 176 aminoacidi.

Nell'uomo il gene MPV17 mappa sul braccio corto del cromosoma 2 al locus 2p23-p21 ed è costituito da sette esoni (figura 1.16). E' stata dimostrata la sua espressione nel pancreas, nei reni, nel muscolo, nel fegato, nei polmoni, nella placenta, nel cervello e nel cuore (Spinazzola *et al.*, 2006).

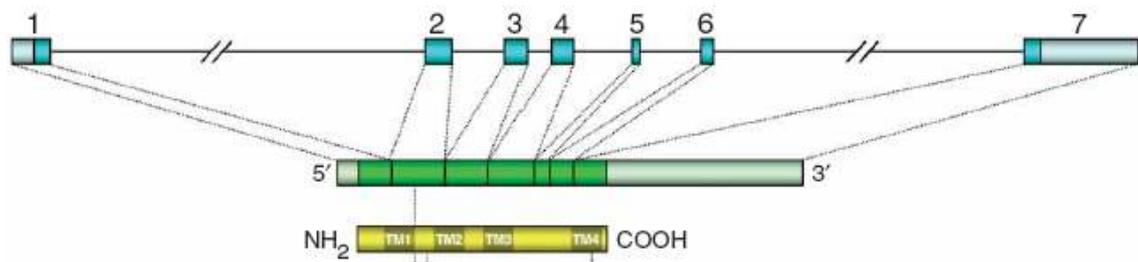


Figura 1.16 Rappresentazione schematica dei sette esoni del gene MPV17, del trascritto e della proteina. (Da Spinazzola *et al.*, 2006).

La proteina è localizzata nella membrana mitocondriale interna (Spinazzola *et al.*, 2006) ed è fortemente ancorata ad essa tramite quattro domini transmembrana (Figura 1.17). Mpv17 è trasportata nel mitocondrio attraverso il macchinario di *import* mitocondriale TOM-TIM in modo dipendente dal potenziale di membrana ($\Delta\Psi$) (Koehler, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004).

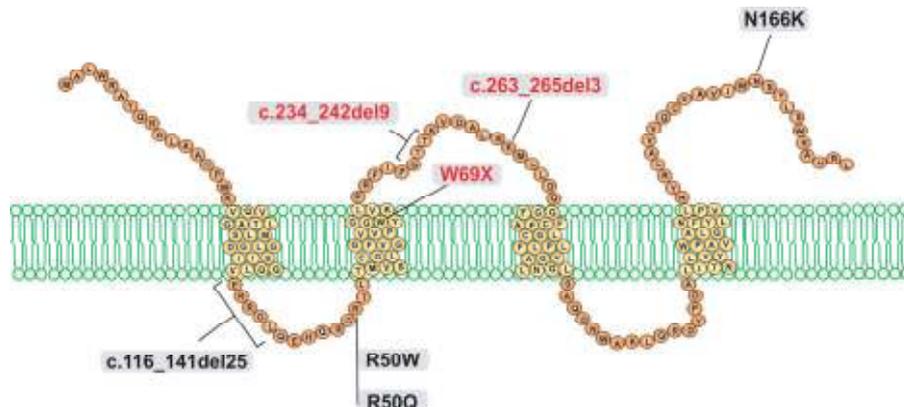


Figura 1.17 Rappresentazione schematica della proteina Mpv17 basata su modelli predittivi bioinformatici e relativa localizzazione di alcune mutazioni patologiche. Il *molecolare modeling* ha identificato 4 domini transmembrana (TM): TM1 aminoacidi 18-38, TM2 53-73, TM3 94-114, e TM4 131-151; con brevi regioni fiancheggianti idrofili che si trovano o nello spazio intermembrana o nella matrice. (Da Wong *et al.*, 2007)

Generalmente, la maggior parte delle proteine della membrana mitocondriale interna (IMM) e della matrice contengono una presequenza nella regione N-terminale che viene tagliata dalla peptidasi del segnale (Gakh *et al.*, 2002) dopo il trasferimento all'interno del mitocondrio attraverso il complesso TIM23 (Koehler, 2004). Al contrario, MPV17 non subisce alcun

taglio dopo che il processo di *import* è stato completato (Spinazzola *et al.*, 2006). L'assenza della maturazione, successiva al trasporto nel mitocondrio, è tipica delle proteine trasportatrici della membrana mitocondriale interna, che sono inserite nella IMM dal complesso TIM22 (Koehler, 2004; Wiedemann, 2004; Rehling, 2003), ma è stato anche documentato per un numero ridotto di proteine della membrana interna e della matrice mitocondriale (Otsuka *et al.*, 1988; Hammen *et al.*, 1994).

E' stato dimostrato che l'omologo umano di MPV17 murino, quando espresso a partire da un promotore eterologo nel rene, dopo integrazione come transgene, è in grado di impedire lo sviluppo della glomerulosclerosi in topi *Mpv17^{-/-}* (Schenkel *et al.*, 1995).

Inizialmente, sulla base dell'omologia di MPV17 con la proteina perossisomale di membrana Pmp22 (Kaldi *et al.*, 1993) e sulla base di studi di localizzazione cellulare, è stato ipotizzato che *Mpv17* si localizzasse nella membrana perossisomale (Zwacka *et al.*, 1994). Studi successivi hanno invece dimostrato che questa piccola proteina (~19,5 kDa), espressa in modo ubiquitario, è una proteina mitocondriale (Spinazzola *et al.*, 2006).

Nonostante molti studi, i dati non chiariscono la specifica funzione di *Mpv17*.

Per tentare di comprenderne il ruolo nella biogenesi mitocondriale e cercare di comprendere perchè la sua assenza porti a deplezione dell'mtDNA tessuto-specifica, sono state analizzate le caratteristiche cliniche, il decorso della patologia e l'organo-specificità dei difetti di un nuovo topo *Mpv17^{-/-}* (Viscomi *et al.*, 2009), un *knock-out* differente dal topo ottenuto da Weiher e colleghi (un possibile modello per la glomerulo-sclerosi umana). Infatti questo secondo modello murino sviluppa la glomerulosclerosi in età più avanzata e dunque il difetto renale non porta alla morte nei primi mesi di vita.

E' stato osservato che in topi giovani (primo anno di vita), come accade nell'uomo, la mancanza di *Mpv17* determina profonda/grave deplezione dell'mtDNA nel fegato (~95%) e, anche se in misura minore, nel muscolo scheletrico (~75%), mentre nessuna riduzione del numero di copie, o una lieve riduzione, è stata osservata nel rene e nel cervello (~30%). Misurazioni del contenuto del genoma mitocondriale, fatte a differenti età, hanno messo in luce che nei topi *Mpv17^{+/+}* il contenuto dell'mtDNA varia nel tempo, sia nel muscolo che nel fegato (Masuyama *et al.*, 2005), mentre rimane costante e a bassi livelli nei topi *Mpv17^{-/-}*. Al contrario nel tessuto cerebrale dei topi *Mpv17^{-/-}*, sia il contenuto assoluto sia la variazione in numero di copie di mtDNA durante la vita, è simile tra topi *Mpv17^{-/-}* e *Mpv17^{+/+}*. Anche se il ruolo di *Mpv17* rimane elusivo, questi risultati indicano che l'assenza della proteina *Mpv17* danneggia un meccanismo di controllo dinamico che regola il numero di copie dell'mtDNA, in un modo tessuto-specifico, e che forse è anche regolato dallo sviluppo (Viscomi *et al.*, 2009). Nonostante la grave deplezione dell'mtDNA, è stata osservata nei topi *Mpv17^{-/-}* una sorprendentemente modesta alterazione della "cito-architettura" del fegato, senza la comparsa di cirrosi o insufficienza epatica (a qualsiasi età), anche se, a livello ultrastrutturale, i mitocondri degli epatociti dei topi *Mpv17^{-/-}* sono risultati essere profondamente alterati. In

particolare i mitocondri erano sferici e si osservava la scomparsa di *cristae* e l'accumulo di materiale amorfo elettrone-denso nella matrice. Cambiamenti ultrastrutturali simili sono stati descritti in pazienti recanti mutazioni in MPV17 (Wong *et al.*, 2007), ma anche e in altre forme di MDDS epatocerebrale (Mandel *et al.*, 2001b). In aggiunta, nessun cambiamento è stato osservato nei tessuti extraepatici del topo *knock-out*, i quali mancano di Mpv17 ma non presentano, o quasi, deplezione dell'mtDNA. Questi dati hanno portato gli autori a ipotizzare che le anomalie strutturali dei mitocondri epatici siano secondarie al danneggiamento funzionale dei mitocondri, piuttosto che riflettere un ruolo di Mpv17 nel controllo della forma delle *cristae* e della struttura della membrana interna mitocondriale (Viscomi *et al.*, 2009). Inoltre la drammatica deplezione dell'mtDNA nel fegato (fino al 95%) è associata con un decremento dell'attività enzimatiche della catena respiratoria (in particolare i complessi I e IV) solo circa del 60%; quindi sproporzionatamente lieve se confrontata con la profonda riduzione del numero di copie del genoma mitocondriale. L'attività succinato deidrogenasi (SDH), che non dipende dal mtDNA dato che è a codificazione esclusivamente mitocondriale, è stata trovata invece normale in topi giovani (Spinazzola *et al.*, 2006). Nel complesso questi dati spiegano la generale conservazione della funzionalità epatica nei topi e l'assenza di drammatici cambiamenti morfologici che invece sono stati riscontrati nei pazienti con mutazioni in MPV17.

In contrasto con il caso umano, l'assenza di Mpv17 nei topi non è associata a difetti metabolici, infatti i topi Mpv17^{-/-} non sviluppano ipoglicemia indotta da digiuno, sono insensibili ad un farmaco epatotossico (valproato) o all'ipotermia. Quindi i topi *knock-out* si dimostrano refrattari al danno epatico, nonostante l'estrema riduzione del numero di copie dell'mtDNA. Questo fenomeno è dovuto ad un meccanismo compensatorio in grado di mantenere la respirazione a livelli quasi normali. In particolare, ciò è stato attribuito alla riduzione dell'espressione di Mterf1, un modulatore negativo della trascrizione mitocondriale, che avviene in seguito a deplezione dell'mtDNA; ne consegue un'augmentata trascrizione che compensa il basso numero di copie dell'mtDNA permettendo alle cellule epatiche del topo Mpv17^{-/-} di svolgere una respirazione cellulare compatibile con la vita. Lo stesso meccanismo di compensazione trascrizionale è stato osservato nei muscoli scheletrici di pazienti con mutazioni in TK2 (Barthelemy *et al.*, 2001) e in diversi tessuti, soggetti a deplezione dell'mtDNA, in topi Tk2^{-/-} (Akman, 2008). Quindi la compensazione della riduzione del numero di copie di mtDNA a livello trascrizionale (o traduzionale) potrebbe essere un meccanismo generale di risposta alla deplezione del DNA mitocondriale. È stato anche dimostrato che la trascrizione di Mterf1 è ridotta nel muscolo di topi Mpv17^{-/-}, un tessuto che mostra una significativa deplezione dell'mtDNA, mentre è normale nel cervello di topi *knock-out* per MPV17, dove la deplezione dell'mtDNA è assente o non significativa. Questi dati rafforzano l'ipotesi che Mterf1 abbia un ruolo nella risposta (trascrizionale e traduzionale) compensatoria alla riduzione del numero di copie di genoma mitocondriale in specifici organi nel topo Mpv17^{-/-} (Viscomi *et al.*, 2009).

Alcuni sintomi del topo $Mpv17^{-/-}$ non sono stati riscontrati nei casi clinici umani, probabilmente perché la loro manifestazione è tardiva nella vita del topo mentre nell'uomo le MDDS associate a mutazioni in MPV17 sono patologie ad insorgenza precoce, che spesso porta i pazienti alla morte nella vita neonatale o nell'infanzia, non consentendo in tal modo la manifestazione di sintomi a insorgenza tardiva.

I fenotipi clinici più rilevanti nei topi $Mpv17^{-/-}$ coinvolgono la pelle, l'orecchio interno e i reni. Il pelo dei topi $Mpv17^{-/-}$ da nero diventa grigio 5-6 mesi dopo la nascita. I topi con almeno 18 mesi di vita sviluppano la glomerulosclerosi segmentale focale (FSGS) con una intensa proteinuria. Una concomitante degenerazione degli epitelii sensoriali della coclea porta a perdita dell'udito (Meyer zum Gottesberge *et al.*, 1996; Meyer zum Gottesberge *et al.*, 2005). Questi sintomi sono associati con un accorciamento della vita dei murini. Coincidente con l'insorgere della FSGS è stata osservata deplezione dell'mtDNA nei ciuffi glomerulari ma non nei tubuli epiteliali renali. Questi risultati dimostrano che $Mpv17$ controlla il numero di copie dell'mtDNA attraverso un meccanismo sia tessuto specifico, come detto precedentemente, sia cellula-specifico (Viscomi *et al.*, 2009).

Recentemente è stata identificata in *Neurospora crassa* una proteina, *wsc*, omologa alla famiglia di proteine MPV17/PMP22 (Liu *et al.*, 2008). Questa proteina *wsc* (*woroning sorting complex*) ha una funzione nella corretta biogenesi dei *woroning bodies* (WB) che sono organelli, unici dei funghi filamentosi, che derivano dai perossisomi e che servono per sigillare i *septal pore* in risposta a lesioni cellulari (Trinci and Collinge, 1974 ; Markham and Collinge, 1987). Nel processo di formazione dei WB è centrale la proteina fungo-specifica HEX che ha un segnale (PST1) per la localizzazione nella matrice perossisomale (Jedd and Chua, 2000; Managadze *et al.*, 2007) dove si auto-assembla per formare un complesso di grandi dimensioni (Jedd and Chua, 2000; Yuan *et al.*, 2003). Questi complessi si associano poi alla membrana perossisomale e producono degli intermedi di gemmazione (Brenner and Carrol, 1968; Wergin, 1973; Camp, 1977). Queste strutture in seguito si associano con la "cortex" cellulare, cioè la zona citoplasmatica sottostante la membrana plasmatica (Momany *et al.*, 2002; Tey *et al.*, 2005), e presumibilmente ciò consente la partizione e l'eredità dei WB. Solo più recentemente è stata identificata la proteina *wsc* che sembra svolgere una doppia funzione nella morfogenesi e nell'ereditarietà di questi particolari organelli, i *woroning bodies* (WB). Infatti nei mutanti *wsc*, i complessi HEX si formano ma non si associano alla membrana perossisomale; inoltre queste strutture ibride perossisomi-*woroning bodies* non si associano con la *cortex* cellulare e non segregano nei compartimenti subapicali, indicando che la proteina *wsc* è importante in entrambi i processi (Liu *et al.*, 2008).

1.9 RICERCA DI GENI NUCLEARI IMPLICATI IN PATOLOGIE MITOCONDRIALI

Difetti noti del mtDNA rendono conto probabilmente di circa la metà di tutti i disordini primari della catena respiratoria mitocondriale, tuttavia le cause di una grande proporzione dei rimanenti 50% dei casi devono ancora essere determinate. Definire le basi molecolari di questo gruppo di "disordini nucleari mitocondriali" presenta complessivamente una sfida della ricerca (Chinnery, 2003).

La percentuale dei casi non diagnosticati arriva fino all' 80-90% per le patologie pediatriche. Questo illustra il formidabile compito che devono ancora fronteggiare i ricercatori che lavorano per capire le basi genetiche delle patologie mitocondriali. Molti di questi casi, che attualmente attendono ancora la caratterizzazione molecolare, probabilmente sono dovuti a mutazioni in geni nucleari ignoti correlati con l'OXPHOS (Zeviani and Di Donato, 2004); per questo è di particolare importanza la loro identificazione.

L'esplosione del numero di malattie mitocondriali individuate recentemente è il risultato dello sviluppo del clonaggio posizionale, che consiste nell'individuazione della regione cromosomica contenente il gene patologico attraverso studi di *linkage* nelle famiglie dei pazienti senza alcun riferimento alla funzione del gene (Collins, 1995).

Sfortunatamente per l'identificazione dei geni, ampie famiglie con patologie mitocondriali a eredità autosomica non sono comuni, e localizzare con precisione geni patologici nella maggior parte dei casi sporadici e presunti autosomici recessivi è ancora più difficile. Infatti l'analisi di *linkage* è possibile solo se si hanno a disposizione famiglie numerose con più membri affetti dalla malattia e consiste nell'individuazione di polimorfismi vicini al locus patologico che pertanto vengono ereditati con il gene mutato. L'affidabilità dell'analisi dipende da quanto è stretta l'associazione tra polimorfismo e locus della malattia.

La ricerca di geni nucleari codificanti proteine con funzioni mitocondriali utilizzando la strategia del clonaggio posizionale "*family-based*" è stata ostacolata da una serie di problemi. Spesso le patologie hanno un fenotipo clinico severo che si presenta nell'infanzia e progredisce rapidamente, portando a morte neonatale o infantile (Rahman *et al.*, 1996). Questo significa che gli individui affetti non tramandano il gene mutato alla generazione successiva, e che la grande maggioranza delle famiglie sono piccole, con uno o pochi membri affetti. La seconda complicazione è il fenotipo clinico che risulta essere particolarmente complesso: mutazioni in un singolo gene, che quindi causano un determinato difetto biochimico, possono causare fenotipi sorprendentemente differenti. Viceversa, pazienti con differenti deficienze della catena respiratoria possono avere un fenotipo simile (cioè essere fenocopie). Quindi anche quando è possibile trovare diverse famiglie con componenti che presentano i medesimi sintomi, non ci sono garanzie che questi presentino lo stesso difetto genetico (Chinnery, 2003).

Il clonaggio posizionale porta all'identificazione di regioni (o aptotipi) che contengono il difetto genetico, e oggi, dato che il genoma umano è stato sequenziato, è semplice determinare quali geni ci sono all'interno di specifiche regioni candidate, ma la lista dei candidati è spesso enorme. Quale gene deve essere scelto per ulteriori analisi? Potrebbe esserci un candidato ovvio, magari una proteina di assemblaggio della catena respiratoria, o una proteina per la quale è noto un coinvolgimento nel mantenimento del mtDNA, ma si stanno cominciando a malapena a districare le complesse relazioni tra i mitocondri e il sistema cellulare. È estremamente probabile che le patologie mitocondriali si presentino mediante mutazioni in geni con una funzione attualmente non nota, o attraverso mutazioni in geni con una funzione ben caratterizzata di cui attualmente non si conosce l'influenza sulla biologia del mitocondrio (Chinnery, 2003). Testare solo i geni ovvi quindi non può essere la strada giusta; ulteriori ricerche in organismi modello sono necessarie per identificare nuovi geni rilevanti per l'omeostasi mitocondriale.

Di solito, quindi, al clonaggio posizionale segue il sequenziamento di uno o più geni per identificare mutazioni potenzialmente patologiche. L'identificazione di una mutazione patologia è complicata dal fatto che fra diversi individui sono presenti polimorfismi, che rendono difficoltosa l'identificazione di una mutazione patologica. Anche qualora vi sia un solo polimorfismo, non è detto che questo sia effettivamente la mutazione patologica. Inoltre, anche qualora venga identificata una mutazione deleteria, quale la presenza di un codone di stop, non è detto che essa sia la vera causa della patologia, e non piuttosto una mutazione non correlata. L'analisi dell'albero genealogico, quando se ne ha a disposizione uno sufficientemente grande, ha dei limiti in quanto geni strettamente concatenati co-segregano con le evidenti possibili conseguenze di mis-interpretazione. Quindi, una volta individuata una mutazione, occorre dimostrare la relazione causa-effetto tra tale mutazione e la malattia. Da qui nasce la necessità della validazione, definita come lo studio in un sistema modello degli effetti di una mutazione il cui ruolo patologico è ignoto. Se si dimostra che la mutazione, introdotta nel sistema modello, causa difetti del metabolismo mitocondriale, è possibile affermare che essa è una mutazione patologica. La validazione diventa ancora più importante nei numerosi casi sporadici, ovvero nei casi per i quali non si dispone di informazioni familiari.

D'altra parte anche qualora il gene causa della patologia sia noto, molte sono le domande ancora senza risposta, in particolare riguardo ai meccanismi patogenetici, che mettono in relazione il genotipo con il fenotipo osservato.

Da qui nasce la necessità di un organismo modello; in prima istanza per la validazione di presunte mutazioni patologiche in nuovi geni, e in secondo luogo, per tentare di dare una spiegazione del meccanismo molecolare della patologia.

1.10 IL LIEVITO *Saccharomyces cerevisiae* COME ORGANISMO MODELLO

Nella scienza moderna il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è stato ampiamente utilizzato come modello unicellulare per investigare la biologia di base, la fisiologia e i meccanismi patologici degli eucarioti superiori poiché, nonostante la sua relativa semplicità, le cellule di lievito sono simili da un punto di vista biochimico-molecolare alle cellule degli eucarioti complessi, come l'uomo. Per questo il lievito è stato insignito del titolo di “honorary mammal” (Resnick and Cox, 2000).

L'utilizzo di un organismo unicellulare porta con sé una serie di vantaggi a livello pratico. *S. cerevisiae* cresce rapidamente, in terreni semplici e poco costosi, e in diverse condizioni. Sono inoltre disponibili svariati *tool* di ingegneria genetica fra cui la trasformazione con plasmidi monocopia o multicopia ad alta efficienza. La creazione di *knockout* genetici richiede tecnologie semplici e trae vantaggio dal genoma estremamente compatto del lievito e dall'elevata efficienza di ricombinazione omologa propria di *Saccharomyces cerevisiae* che quindi favorisce l'inserimento della cassetta di distruzione al *locus* corretto (Guthrie and Fink, 1991; Guthrie and Fink, 2002). Inoltre, possono essere applicati al lievito semplici protocolli di biologia molecolare, quali l'estrazione di acidi nucleici e di proteine. Queste caratteristiche sono state sfruttate ampiamente per la selezione, lo *screening*, e l'identificazione di fenotipi mutati di lieviti, come anche per creare nuovi ceppi.

Il lievito esiste sia allo stato aploide che allo stato diploide, rendendo possibile studiare in maniera semplice l'effetto di mutazioni sia dominanti che recessive. Questa disponibilità di lievito sia aploide che diploide, e la possibilità di separare fisicamente ed identificare tutte e quattro le cellule aploidi derivanti da un singolo evento meiotico mediante la dissezione degli aschi e la successiva analisi delle tetradi, ne hanno fatto un inestimabile organismo per le manipolazioni genetiche (Guthrie and Fink, 1991; Guthrie and Fink, 2002).

Accanto a questa semplicità di manipolazione, *S. cerevisiae* possiede comunque una struttura molto simile a quella delle cellule degli eucarioti superiori. Infatti, *S. cerevisiae* possiede tutte le strutture intracellulari presenti anche negli eucarioti superiori, fra cui i mitocondri (Botstein, 1991).

L'intera sequenza nucleotidica del genoma di *Saccharomyces cerevisiae*, che è di 12,8 Mb, circa 250 volte più corta di quella del genoma umano, è stata pubblicata nel 1996 (Goffeau *et al.*, 1996), rendendolo il primo organismo eucariote del quale è completamente nota la sequenza del DNA. Il progetto genoma ha identificato 6300 geni (Goffeau *et al.*, 1996; Johnston, 2000), un numero solo 3,5 volte maggiore rispetto a quelli di *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) ma circa 5 volte minore rispetto a quelli umani (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter *et al.*, 2001). Quindi, il lievito esprime un set minimo di geni necessari per sostenere la sopravvivenza degli organismi eucarioti.

Studi su scala genomica nell'uomo attualmente sono estremamente difficili se non impossibili. Quindi, è interessante che il 46% delle proteine umane siano state identificate avere omologhi nel proteoma di lievito (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Queste proteine conservate sono coinvolte nei meccanismi di base della vita cellulare, come replicazione, ricombinazione e riparazione del DNA, trascrizione e traduzione dell'RNA, traffico tra i compartimenti subcellulari, enzimi del metabolismo generale e, per ultimo ma non meno importante, biogenesi del mitocondrio. Comunque, il lievito è un organismo semplice e sarà di poco aiuto per la comprensione dello sviluppo dell'uomo, della difesa e immunità cellulare, o della comunicazione cellula-cellula. Inoltre, le proteine condivise tra lievito e uomo spesso hanno architetture diverse dei loro domini, le proteine umane esibiscono un incremento della complessità di struttura e il 60% delle famiglie proteiche umane sono più numerose (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Nonostante ciò, studi effettuati pochi anni fa hanno rilevato che i geni di lievito condividono una significativa identità di sequenza con il 30-40% dei geni umani associati a malattie (Basset *et al.*, 1996; Foury, 1997). Di conseguenza, malgrado le sue limitazioni, il lievito è uno strumento insostituibile per lo studio dei geni umani associati a patologie che non hanno una funzione nota e sono stati identificati attraverso il clonaggio posizionale (Collins, 1995). Sebbene, da quando è stata pubblicata la sequenza completa del genoma di lievito, sono stati fatti notevoli progressi nella decifrazione della funzione dei geni, ancora molte *open reading frames* (ORF) rimangono senza una funzione assegnata (Costanzo *et al.*, 2001; Sickmann *et al.*, 2003). *S. cerevisiae* è attualmente uno degli organismi eucarioti nel quale analisi su scala dell'intero genoma (genomica) e delle proteine (proteomica) sono state effettuate efficientemente (Kumar *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2000, Ito *et al.*, 2000; Uetz *et al.*, 2000; Martzen *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001). Ci sono due principali ragioni. Primo, la scarsità di introni e la possibilità di comparare i geni con altri 13 genomi di lieviti emi-ascomiceti parzialmente sequenziati ha notevolmente facilitato la scoperta di geni (Blandin *et al.*, 2000). Secondo, grazie all'elevata efficienza di ricombinazione omologa propria di *S. cerevisiae*, un consorzio internazionale di laboratori ha generato una collezione di ceppi di lievito che comprende 5943 differenti delezioni geniche (Winzeler *et al.*, 1999). Le distruzioni sono state effettuate sia in contesto aploide che diploide e hanno previsto la distruzione genica tramite inserzione di una cassetta di resistenza alla geneticina.

Con il completamento del sequenziamento, ora si richiede uno spostamento della focalizzazione sperimentale sulla genomica funzionale così che possa essere determinato il ruolo delle proteine. Sono state sviluppate alcune strategie promettenti per l'identificazione di un gene o di più geni responsabili per una determinata attività biochimica (Kumar and Snyder, 2001; Hughes *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2000; Martzen *et al.*, 1999; Uetz *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001). Inoltre, lo *screening* dell'intero genoma applicato di recente per la determinazione della funzione dei geni di lievito dovrebbe anche avere applicazioni dirette sull'analisi funzionale di altri genomi eucariotici, compreso quello umano (Mootha *et al.*, 2003).

Saccharomyces cerevisiae non è utile solo per identificare la funzione dei geni, ma il suo studio può anche aiutare a comprendere i meccanismi molecolari che sottendono le patologie umane. Infatti, fino al 30% dei geni clonati tramite clonaggio posizionale implicati in malattie umane hanno un omologo in lievito (Foury, 1997). Determinare la funzione di tutti i prodotti genici di lievito sarebbe un passo importante verso la comprensione della loro funzione nei metazoi e porrebbe le fondamenta per una più completa comprensione dei processi e dei *pathway* cellulari.

Il lievito quindi risulta un sistema modello insostituibile perché è semplice e l'annotazione dei suoi geni è eccellente; attualmente è l'unico organismo in cui è stata testata l'efficienza delle nuove tecnologie (doppio ibrido, *chip* di DNA e proteine, delezioni sistematiche) a livello dell'intero genoma; è l'unico organismo in cui il funzionamento di un set basale di geni che sono conservati in tutti gli eucarioti è stato analizzato in dettaglio con l'utilizzo delle nuove tecnologie ma anche tramite la genetica classica e la biochimica (Foury and Kucej, 2001).

1.10.1 Il lievito *S. cerevisiae* come modello per le patologie mitocondriali

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un eccellente modello per capire le basi molecolari delle patologie mitocondriali umane (Barrientos, 2003).

Recentemente, le conoscenze sulla biogenesi mitocondriale di lievito sono avanzate notevolmente. In contrasto con gli studi estensivi effettuati sulla struttura dei complessi respiratori dei mammiferi, le attuali conoscenze sulla biogenesi mitocondriale nell'uomo si basano essenzialmente su studi di genetica e biochimica del lievito.

L'alto grado di somiglianza tra il mitocondrio di lievito e dell'uomo ha consentito l'utilizzo di studi di genomica funzionale in *S. cerevisiae* per identificare geni nucleari umani coinvolti in malattie. Per esempio sono state individuate mutazioni in cinque geni nucleari responsabili di miopatie mitocondriali caratterizzate da deficienza della citocromo c ossidasi, grazie a studi che ne hanno prima dimostrato in lievito la funzione essenziale nel processo di assemblaggio (Barrientos, 2003). L'identificazione di vari ortologi umani di proteine mitocondriali di lievito, ad esempio i geni *BCS1* e *COX10*, necessari all'assemblaggio delle componenti della catena respiratoria e responsabili di sindromi ereditarie, è stata possibile mediante l'approccio della complementazione funzionale, ottenuta quando il prodotto genico di un organismo è in grado di compensare la mancanza di un gene di un altro organismo (Valnot *et al.*, 2000; De Lonlay *et al.*, 2001).

Questo approccio ha portato all'isolamento di geni umani coinvolti nella biogenesi e nell'assemblaggio dei complessi respiratori, nell'*import* e nell'*export* di proteine mitocondriali (Petruzzella *et al.*, 1998; Glerum *et al.*, 1994; Mashkevich *et al.*, 1997; Ropp and Copeland, 1996; Lecrenier *et al.*, 1997; Zsurka *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Bonnefoy *et al.*, 1994). Sono stati inoltre caratterizzati ortologi umani di trasportatori di metalli localizzati nella

membrana mitocondriale interna del lievito (Lecrenier *et al.*, 1997; Zsurka *et al.*, 2001) e geni coinvolti nella morfogenesi, fusione e segregazione dei mitocondri (Jensen *et al.*, 2000; Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000).

Un consorzio internazionale di laboratori ha svolto una *screening* sistematico funzionale utilizzando la collezioni di deletanti di lievito per identificare proteine mitocondriali. Sono stati identificato 466 geni che deleti danneggiano la respirazione mitocondriale, 265 dei quali non erano stati identificati in precedenza. Di questi 466 ceppi che hanno una diminuita crescita su substrati non fermentabili, il 43% ha mutazioni in geni che hanno prodotti noti essere localizzati nei mitocondri, o che sono importanti per le funzioni mitocondriali, il 22% ha mutazioni che colpiscono proteine all'esterno del mitocondrio ma che sono importanti per processi cellulari critici necessari per il mitocondrio, e il 35% ha mutazioni in geni codificanti prodotti con una funzione o una localizzazione cellulare ignota. Geni omologhi a geni di quest'ultimo gruppo, presenti in diverse specie, codificano per proteine a localizzazione mitocondriale. Per applicare questi progressi alle patologie mitocondriali umane, questo *screening* è stato esteso all'uomo e sono stati trovati 255 ortologi umani dei geni di lievito associati a difetti di crescita su substrati non fermentabili. Di questi, 21 erano geni noti essere coinvolti in malattie mitocondriali ereditate in maniera mendeliana, e alcuni erano geni responsabili di patologie genetiche codificate dal nucleo nei quali la disfunzione mitocondriale è un'importante *step* nella fisiopatologia (Steinmetz *et al.*, 2002).

Questo nuovo approccio sembra quindi essere una strada efficace per identificare proteine importanti per le funzioni mitocondriali. I benefici di questo lavoro saranno quelli di aiutare l'identificazione di geni patologici candidati meno ovvi in pazienti con patologie mitocondriali, ma l'informazione può anche essere usata alla rovescia. Con un database così esauriente, sarà anche possibile determinare se mutazioni che causano malattie nell'uomo influenzino verosimilmente le funzioni mitocondriali. Questo indubbiamente aiuterà a comprendere la via che integra il mitocondrio nel complesso *network* cellulare.

Dopo questo primo *screening* dell'intera collezione di lievito, ne sono stati fatti altri per tentare di colmare le lacune ancora presenti, cioè identificare ulteriori proteine importanti per la biogenesi mitocondriale, che magari sono essenziali sono in certe condizioni. Diversi lavori sono già stati fatti in questa direzione (Hess *et al.*, 2009).

Anche se studiando il sistema, relativamente semplice, lievito, è divenuto chiaro che i mitocondri hanno un'elevata complessità di relazioni con il resto della cellula (Foury and Kucej, 2001), la complessità sarà certamente di dimensioni più ampie se si considerano le intricate relazioni tra cellule funzionalmente interdipendenti nei diversi organi degli eucarioti superiori. Il genoma di lievito è considerevolmente più piccolo rispetto a quello umano, e molti geni patologici umani noti non hanno un omologo diretto in lievito (Foury and Kucej, 2001; Bassett *et al.*, 1997).

Quindi, in conclusione, sebbene i mitocondri siano più complessi nell'uomo rispetto al lievito e verosimilmente siano comprese molte più proteine addizionali, l'alto grado di somiglianza

tra la biogenesi mitocondriale e le funzioni mitocondriali nel lievito e nell'uomo fanno di *S. cerevisiae* un eccellente modello per lo studio della fisiopatologia mitocondriale nell'uomo in quanto numerosi *pathway* metabolici mitocondriali del lievito e dell'uomo condividono un set di geni.

Però, ci sono anche ampie divergenze: per esempio, la replicazione del DNA mitocondriale utilizza la stessa DNA polimerasi in tutti gli eucarioti (Ropp and Copeland, 1996; Lecrenier *et al.*, 1997) ma utilizza DNA elicasi non correlate.

Lo studio delle basi molecolari e dei meccanismi patogenici di diverse patologie mitocondriali umane sta già traendo vantaggio dal modello *Saccharomyces cerevisiae* e, data la sua flessibilità e utilità, lo sfruttamento di questo modello per le patologie mitocondriali umane è atteso continuare nel futuro (Barrientos, 2003).

Grazie all'utilizzo del lievito come sistema modello sono stati studiati gli effetti sul metabolismo mitocondriale di mutazioni in numerosi geni, sia mitocondriali che, soprattutto, nucleari. In tabella 1.7 sono riportati alcuni geni umani, le cui mutazioni sono state studiate in lievito grazie alla presenza dell'ortologo.

Tabella 1.7 Geni umani che mutati causano patologie umane che sono stati studiati in lievito grazie alla presenza dell'ortologo.

Gene umano	Gene di lievito	Funzione del prodotto genico	Bibliografia
ANT1	<i>AAC2</i>	ADP/ATP carrier, trasporto di ATP e ADP attraverso la membrana mitocondriale interna	Fontanesi <i>et al.</i> , 2004 Palmieri <i>et al.</i> , 2005 Lodi <i>et al.</i> , 2006
POLG	<i>MIP1</i>	DNA polimerasi mitocondriale, replicazione dell'mtDNA	Stuart <i>et al.</i> , 2006 Baruffini <i>et al.</i> , 2006 Baruffini <i>et al.</i> , 2007 Stricker <i>et al.</i> , 2009
EFG1	<i>MEF1</i>	Fattore di elongazione mitocondriale G1, traduzione degli mRNA mitocondriali	Valente <i>et al.</i> , 2007
EFTU	<i>TUF</i>	Fattore di elongazione mitocondriale Tu, traduzione degli mRNA mitocondriali	Valente <i>et al.</i> , 2007
BCS1L	<i>BCS1</i>	Proteina coinvolta nell'assemblaggio del complesso III	Fernandez-Vizarra <i>et al.</i> , 2007
COX6B1	<i>COX12</i>	Subunità VIb della citocromo c ossidasi, richiesta per l'assemblaggio del complesso	Massa <i>et al.</i> , 2008
GFER	<i>ERV1</i>	Sulfidril ossidasi, ossida Mia40 e promuove la ritenzione di proteine nello spazio intermembrana	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2009
SDHB	<i>SDH2</i>	Subunità 2 della succinato deidrogenasi	Goffrini <i>et al.</i> , 2009

Il lievito *S. cerevisiae* negli ultimi anni si è anche rivelato un modello insostituibile per la validazione delle mutazioni patologiche, per studiare gli effetti di mutazioni dominanti e

recessive e per determinare la dominanza/recessività di una mutazione. Ma non solo, attraverso lo studio in lievito, grazie alla semplicità con cui possono essere effettuati esperimenti di biochimica e di biologia molecolare, si può arrivare a capire il meccanismo molecolare sotteso alla patologia, e quindi capire come agisce la mutazione.

Ad esempio, l'utilizzo di un sistema modello permette la ricerca e lo studio degli effetti di "molecole" in grado di ripristinare, almeno parzialmente, un difetto "patologico". La sostanza da testare può essere direttamente aggiunta al terreno di coltura e, se possiede opportune proprietà, è in grado di entrare nella cellula per diffusione o trasporto facilitato, e svolgere così la sua attività. Inoltre, è possibile cercare e valutare l'effetto di soppressori multicopia, mediante l'overespressione di un gene nel ceppo recante la mutazione patologica. E' possibile fare uno *screening random*, mediante la trasformazione del ceppo con una banca multicopia; ma se si hanno informazioni sufficienti, si può anche procedere direttamente al clonaggio del gene da testare, che si pensa essere un possibile soppressore, tramite l'utilizzo di un plasmide multicopia.

Il grande vantaggio di *S. cerevisiae* nello studio delle patologie mitocondriali consiste nel fatto che fenotipi correlati alla disfunzione del metabolismo mitocondriale possono essere facilmente osservabili. Infatti, mutazioni che inficiano la funzionalità mitocondriale determinano generalmente fenotipi semplici come ad esempio riduzione o inibizione della crescita su fonti ossidabili, alterazione degli spettri di assorbimento dei citocromi respiratori o alterazione dell'attività respiratoria. Inoltre, è possibile determinare se ad una mutazione patologica è associata instabilità dell'mtDNA o un incremento della mutabilità puntiforme.

Ma la caratteristica più importante di *S. cerevisiae* è che può sopravvivere anche in assenza di funzioni respiratorie e in presenza di delezioni parziali o totali del DNA mitocondriale, quindi in mancanza dei complessi che costituiscono la catena respiratoria (Tzagaloff and Dieckmann, 1990). Questa infatti è una caratteristica unica fra le cellule eucariotiche, e ciò lo rende particolarmente utile nello studio della biogenesi mitocondriale e delle basi molecolari di malattie umane che derivano dal danneggiamento del DNA mitocondriale.

I mutanti di lievito con catena respiratoria non funzionante vengono definiti mutanti respiratorio deficienti (RD) e non possono crescere su fonti di carbonio respirabili come l'etanolo, il glicerolo, l'acetato o il lattato, ma solo su substrati fermentabili come il glucosio e ciò permette una selezione molto semplice di questi mutanti. Essi formano colonie di dimensioni più piccole del normale che proprio per questa caratteristica vengono denominate colonie "*petite*". La morfologia dei ceppi mutati è una conseguenza dell'incapacità di metabolizzare l'etanolo prodotto dal glucosio durante la fermentazione (Ephrussi *et al.*, 1949). Infatti, mentre nelle cellule eucariotiche, la maggior parte dell'ATP deriva dai *pathways* metabolici che risiedono nei mitocondri, nelle cellule di lievito l'ATP è prodotto attraverso due vie: in presenza di glucosio viene attivata la glicolisi e la fermentazione; in presenza di

fonti di carbonio ossidabili, invece, la cellula ricorre alla respirazione e alla fosforilazione ossidativa.

Il DNA mitocondriale è soggetto a mutazioni spontanee, che rendono con elevata frequenza un ceppo respiratorio deficiente (RD) (Campbell and Duffus, 1988, Dujon, 1981 e Contamine and Picard, 2000).

I mutanti *petite* possono derivare, in realtà, sia da mutazioni in geni nucleari che portano a mutazioni o alla perdita di mtDNA (chiamati mutanti *pet*) sia da mutazioni del genoma mitocondriale. In quest'ultimo caso si parla di *petite* citoplasmatici, o semplicemente *petite*. Mentre i mutanti *pet* si generano spontaneamente a bassa frequenza, i *petite* citoplasmatici si generano spontaneamente, su una fonte fermentabile, con una frequenza molto elevata, pari a circa l'1-2% (Nagai *et al.*, 1961). La frequenza della comparsa dei *petite* è comunque variabile a seconda del ceppo, della ploidia e delle condizioni di crescita.

Per questa capacità di sopravvivere alle alterazioni del genoma mitocondriale la specie *S. cerevisiae* viene definita *petite positive*, a differenza degli organismi nei quali non è possibile isolare alcun mutante stabile e vitale del mtDNA, detti *petite negative*.

Va comunque ricordato che, nonostante *S. cerevisiae* sia perfettamente in grado di sopravvivere in assenza di DNA mitocondriale, per la vitalità cellulare è necessario, anche nei mutanti respiratori deficienti, che sia mantenuta l'integrità dei mitocondri, che dipende dal mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale (Ψ). Il potenziale è richiesto per l'*import* nel mitocondrio di molte proteine a codificazione nucleare ed è essenziale per alcune reazioni, quali la sintesi di basi azotate, aminoacidi e lipidi, che sono di vitale importanza per la cellula (Gbelska *et al.*, 1983; Neupert, 1997).

Quando la respirazione è abolita o per causa genetica (mutanti RD) o per le condizioni di crescita (anaerobiosi, antimicina), il gradiente elettrochimico di membrana è mantenuto sia dall'attività di pompa protonica del complesso V sia dall'ingresso di ATP⁴⁺ in cambio di ADP³⁺ ad opera dell'ATP/ADP carrier (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2003). Nei mutanti *petite* solo la seconda via è possibile, poiché manca la componente F₀ dell'ATP sintasi, della quale tre subunità sono codificate dal genoma mitocondriale. In assenza di queste subunità, che sono fondamentali per l'accoppiamento del trasporto di elettroni con la sintesi di ATP, la componente F₁ dell'ATP sintasi agisce come ATP idrolasi, o ATPasi, cioè idrolizza ATP ad ADP e fosfato inorganico (Giraud and Velours, 1997), mantenendo nella matrice mitocondriale una concentrazione di ADP tale da consentire un trasporto ATP/ADP che conservi il potenziale di membrana al di sopra del livello soglia essenziale all'integrità del mitocondrio (Contamine and Picard, 2000). All'idrolisi di ATP, è accoppiato, oltre che il trasporto di nuovo ATP nella matrice, un pompaggio in senso inverso, dalla matrice allo spazio intermembrana, di protoni, il quale mantiene il gradiente.

I mutanti *petite* si distinguono in ρ^0 quando mancano completamente del mtDNA e in ρ^- che sono caratterizzati da lunghe delezioni e riarrangiamenti del DNA mitocondriale. Fenotipicamente i due tipi di *petite* non sono distinguibili, in quanto entrambi sono

respiratorio deficienti e dunque incapaci di crescere su fonti ossidabili. Essi si distinguono dai ceppi wt, che, in riferimento allo stato del genoma mitocondriale, vengono chiamati ρ^+ . I ceppi ρ^- e ρ^0 sono respiratori deficienti in quanto in essi non avviene la sintesi proteica mitocondriale, e di conseguenza l'assemblamento dei complessi respiratori. A causa delle delezioni, infatti, i ρ^- presentano sempre la perdita di alcuni geni per tRNA, e in generale anche di geni per rRNA e per proteine. Nei mutanti ρ^- i frammenti di sequenza mantenuti sono corti, solitamente meno di un terzo del genoma, ma si può arrivare anche a meno dell'1%; mentre sono molto rari i casi di mutanti che mantengono più del 50% della sequenza selvatica. Poiché però la quantità totale di mtDNA nei mutanti ρ^- è simile a quella dei lieviti ρ^+ dai quali derivano, ne consegue che, indipendentemente dalla taglia delle delezioni, il frammento di sequenza conservato è ripetuto, con un fattore di amplificazione dipendente dalla sua lunghezza (Dujon, 1981). Le mutazioni *petite* sono non reversibili ed estremamente pleiotropiche, poiché nei mitocondri dei mutanti ρ^- e ρ^0 sono presenti solo i polipeptidi a codificazione nucleare in quanto non può avvenire alcuna sintesi proteica mitocondriale (Dujon, 1981). Dopo la comparsa della mutazione, la cellula rimane inizialmente ρ^+ a causa della presenza di numerose copie di mtDNA, la maggior parte delle quali sono ancora integre. Nel giro di poche generazioni però, i due tipi di mtDNA tendono a segregare, formando così alla fine cellule che contengono soltanto l'mtDNA parzialmente deleta, dunque ρ^- , e cellule che contengono l'mtDNA wt, dunque ρ^+ . Quindi la condizione naturale di *S. cerevisiae* è l'omoplasma, a differenza dei tessuti umani che possono essere eteroplasmici. L'eteroplasma in *S. cerevisiae* è quindi solo una fase transeunte che si genera in seguito ad una mutazione dell'mtDNA.

L'mtDNA può anche presentare, oltre a riarrangiamenti su larga scala, una singola mutazione puntiforme e in questo caso i mutanti vengono denominati mit^- , anch'essi respiratorio deficienti. Nel lievito *S. cerevisiae*, durante il processo di coniugazione, entrambe le cellule partecipano in egual misura alla formazione del genoma mitocondriale della cellula diploide. Quindi, dall'incrocio di un ρ^- con un mit^- si possono avere due tipi di diploidi, respiratorio deficienti, come i parentali, o respiratorio sufficienti. Infatti, in seguito all'incrocio, a causa dell'elevata frequenza di ricombinazione dell'mtDNA, tipicamente nel diploide avviene ricombinazione fra i genomi mitocondriali. Se il ceppo ρ^- contiene la regione in cui mappa la mutazione del ceppo mit^- , in seguito a ricombinazione, si genererà un genoma ρ^+ , in cui la regione presente nel ρ^- ha complementato la mutazione mit^- e quindi il diploide sarà respiratorio sufficiente (RS). Se invece il ceppo ρ^- contiene una regione che, nel mutante mit^- , non è mutata, il ceppo rimarrà respiratorio deficiente (RD). I ceppi ρ^0 , fenotipicamente indistinguibili dai ρ^- , non sono ovviamente in grado di complementare alcuna mutazione mit^- . Quindi, un ceppo non in grado di complementare una vasta serie di mutanti tester mit^- può essere considerato ρ^0 .

La perdita di mtDNA può essere stimolata anche dal trattamento con bromuro d'etidio. Il bromuro d'etidio è un intercalante in grado di inserirsi fra la doppia elica del DNA. Esso

introdotti nel ceppo di lievito privo del gene *SYM1* ($\Delta sym1$) presente nella collezione di deletanti EUROSCARF. Il fenotipo di crescita di questo mutante, che verrà analizzato meglio nel prossimo paragrafo, è complementato dall'introduzione dell'allele *wild type*, mentre non si ha alcun ripristino del difetto quando si introducono gli alleli mutati *sym1*^{R51W} o *sym1*^{N172K}, equivalenti agli alleli umani recanti le mutazioni R50W e N166K rispettivamente; mentre si osserva un parziale recupero del difetto in seguito a introduzione dell'allele *sym1*^{R51Q}, corrispondente alla mutazione umana R50Q, in accordo con il fenotipo meno grave osservato nei pazienti con questa mutazione (figura 1.19) (Spinazzola *et al.*, 2006).

L'introduzione del gene umano complementa parzialmente il fenotipo del mutante $\Delta sym1$ (Trott and Morano, 2004), mentre l'introduzione di tutti e tre gli alleli umani mutati non migliora affatto il difetto del delecto (Spinazzola *et al.*, 2006).

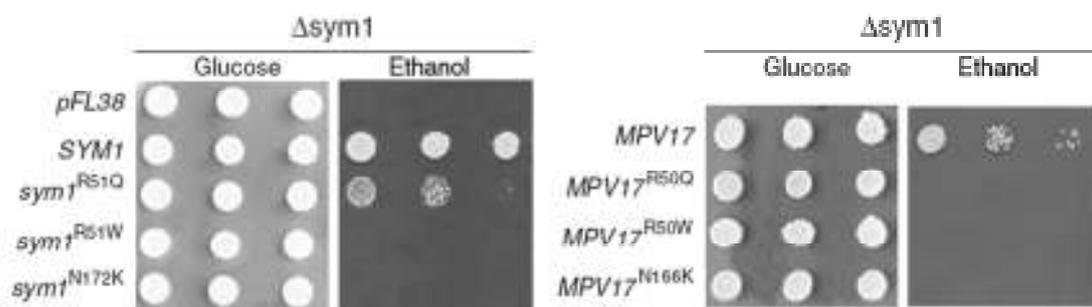


Figura 1.19 Validazione delle mutazioni umane R50Q, R50W e N166K utilizzando le varianti alleliche di lievito *sym1*^{R51Q}, *sym1*^{R51W} e *sym1*^{N172K} e le varianti alleliche umane MPV17^{R50Q}, MPV17^{R50W} e MPV17^{N166K} (Da Spinazzola *et al.*, 2006)

Questi dati indicano che le mutazioni umane del gene MPV17 sono deleterie nel lievito e quindi sono la causa della patologia umana.

I risultati ottenuti suggeriscono che il lievito possa rappresentare un buon modello per lo studio della funzione di Sym1, così contribuendo alla comprensione della funzione del suo ortologo umano.

1.11 II GENE *SYM1* di *Saccharomyces cerevisiae*

Il sequenziamento del genoma del lievito ha evidenziato l'esistenza di una possibile *ORF*, *YLR251W*, successivamente ribattezzata *SYM1* da *Stress-inducibile Yeast MPV17*. Il gene è stato infatti identificato come gene indotto da *heat shock* e è stata dimostrata la sua omologia funzionale con *MPV17* (Trott and Morano, 2004). L'analisi BLAST della sequenza amminoacidica predetta di *YLR251W* ha portato all'identificazione di una famiglia di proteine di mammifero omologhe (~48% di similarità, ~32% di identità) (figura 1.20) tra cui Mpv17 umana, Mpv17 murina e Pmp22 murina, tutte proteine integrali di membrana (con quattro eliche transmembrana) e di piccole dimensioni (20-22 kDa). Per alcune di queste proteine,

Mpv17 murina e Pmp22 murina, era stata dimostrata una localizzazione perissosomale (Zwacka *et al.*, 2004; Kaldi *et al.*, 1993).

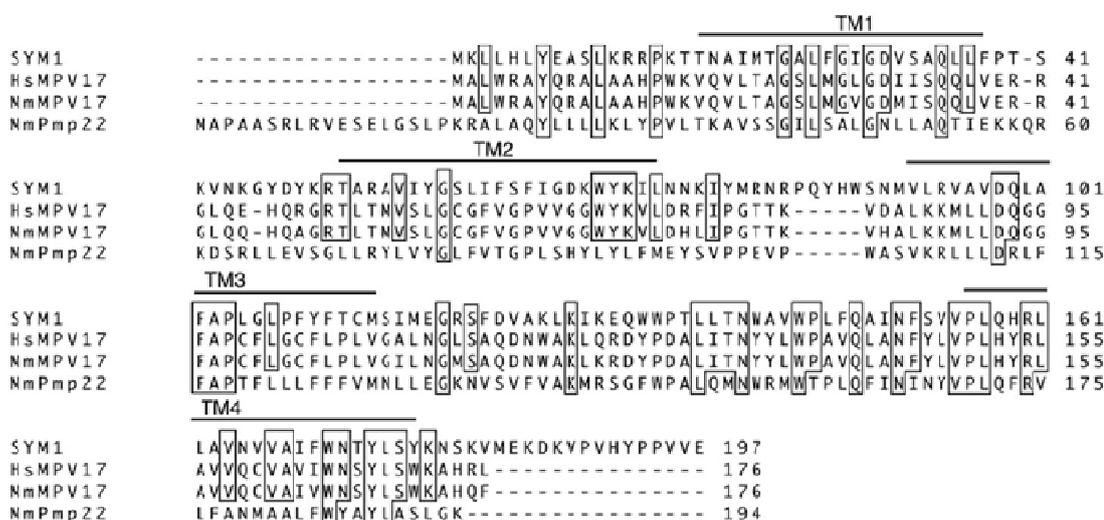


Figura 1.20 Allineamento delle sequenze aminoacidiche di Sym1, Mpv17 di *Homo sapiens*, Mpv17 e Pmp22 di *Mus musculus*. I residui identici sono cerchiati. I quattro domini transmembrana predetti (TM1, TM2, TM3, TM4) sono indicati con delle barre sopra la sequenza proteica. (Da Trott and Morano, 2004)

L'allineamento statisticamente più significativo è stato osservato con la proteina murina Mpv17, coinvolta nella glomerulosclerosi, e con la proteina Mpv17 umana, coinvolta in alcune forme di MDDS. Oltre alla somiglianza di sequenza è stata osservata, attraverso il confronto dei plot di idropatia, anche una forte conservazione dell'architettura dei domini transmembrana (Trott and Morano, 2004) (figura 1.21).

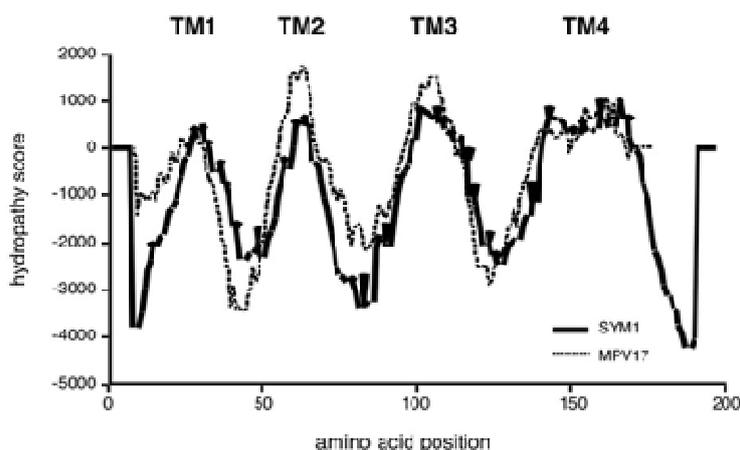


Figura 1.21 Profilo di idropatia di Sym1 e Mpv17 generato con TMPred. (Da Trott and Morano, 2004)

Per determinare se *SYM1* fosse l'ortologo funzionale di *MPV17*, la regione codificante del gene è stata amplificata, mediante reazione polimerasica a catena, da una libreria di cDNA umani e successivamente clonata ed espressa nel mutante diploide omozigote *sym1/sym1*. Il

mutante è stato successivamente analizzato per la crescita sulla fonte di carbonio ossidabile etanolo ad alte temperature (37°C), condizione in cui il mutante mostra un difetto di crescita, e il ripristino del fenotipo selvatico ha quindi stabilito il *link* funzionale tra *SYM1* di *S. cerevisiae* e il suo omologo MPV17 umano (Trott and Morano, 2004).

Studi di localizzazione cellulare, mediante costrutti di fusione con la *green fluorescent protein* (GFP), hanno inoltre dimostrato che Sym1 è una proteina a localizzazione mitocondriale, in particolare Sym1 è una proteina integrale di membrana inserita nella membrana mitocondriale interna presumibilmente attraverso quattro eliche transmembrana (Trott and Morano, 2004).

Sulla base delle analisi effettuate viene proposto per la proteina Sym1 un ruolo nel metabolismo/tolleranza all'etanolo durante lo stress termico (Trott and Morano, 2004). Infatti Sym1 è necessario per la crescita sulla fonte di carbonio non fermentabile etanolo specificamente alla temperatura di 37°C. Il ceppo $\Delta sym1$, al contrario, è in grado di crescere a 37°C in un mezzo di coltura contenente un'altra fonte di carbonio ossidabile, il glicerolo, indicando che *SYM1* non è necessario per la crescita respiratoria in generale (figura 1.22A), suggerendo un difetto specifico nel metabolismo dell'etanolo. Se questo fosse il caso, l'aggiunta di glicerolo all'etanolo dovrebbe ripristinare la crescita a 37°C; invece non è così, suggerendo che Sym1 sia importante per la tolleranza all'etanolo (figura 1.22A). Infatti, la crescita a 37°C del mutante $\Delta sym1$ non viene inibita se il terreno di coltura è addizionato di etanolo a basse concentrazioni (0,5%) (figura 1.22B).

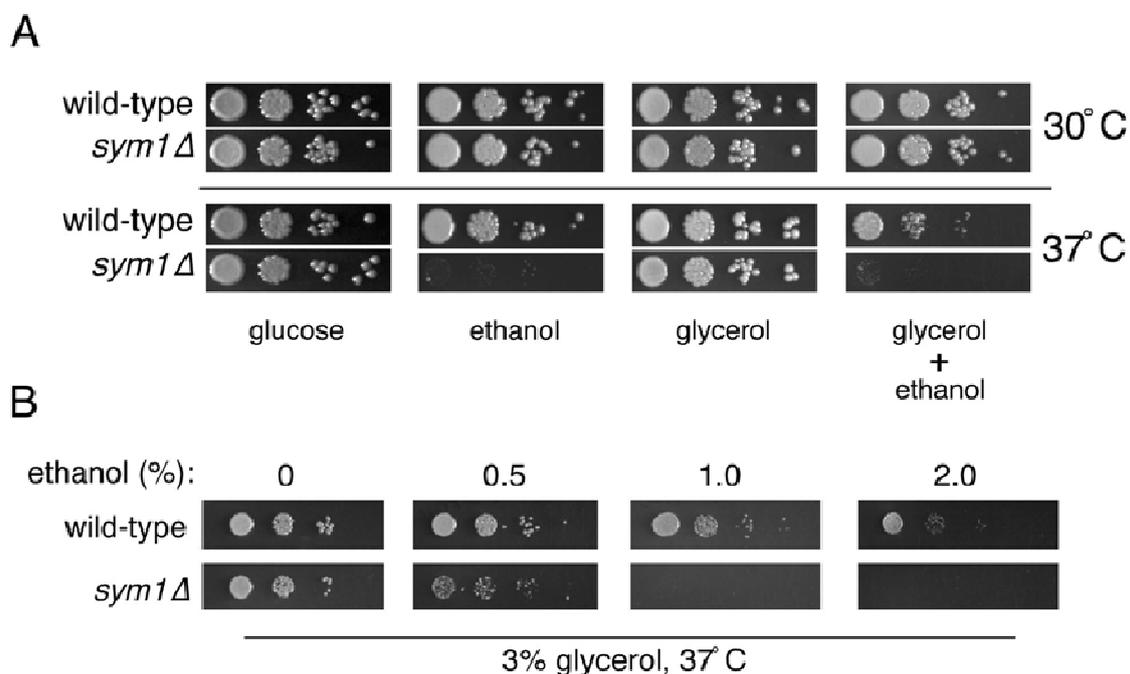


Figura 1.22 A) Analisi della crescita del ceppo wild type e $\Delta sym1$ a 30°C e 37°C. B) Analisi della tossicità dell'etanolo a 37°C. (Da Trott and Morano, 2004)

Inoltre la tossicità dell'etanolo sembra il risultato del metabolismo respiratorio, infatti, la crescita a 37°C del ceppo mutante non viene inibita se il terreno di coltura è addizionato di

etanolo e glucosio, condizione nella quale la crescita è dipendente dal metabolismo fermentativo.

Comparando i tassi di crescita delle cellule *wild type* e $\Delta sym1$, in terreno contenente etanolo dopo uno *shift* a 37°C, è stato osservato che le cellule $\Delta sym1$ riescono inizialmente a dividersi, ma dopo circa tre generazioni, vanno incontro ad arresto asincrono della crescita (figura 1.23A). Questo arresto di crescita è reversibile indicando che le cellule non vanno incontro a morte cellulare (figura 1.23B).

La funzione di Sym1 rimane da identificare.

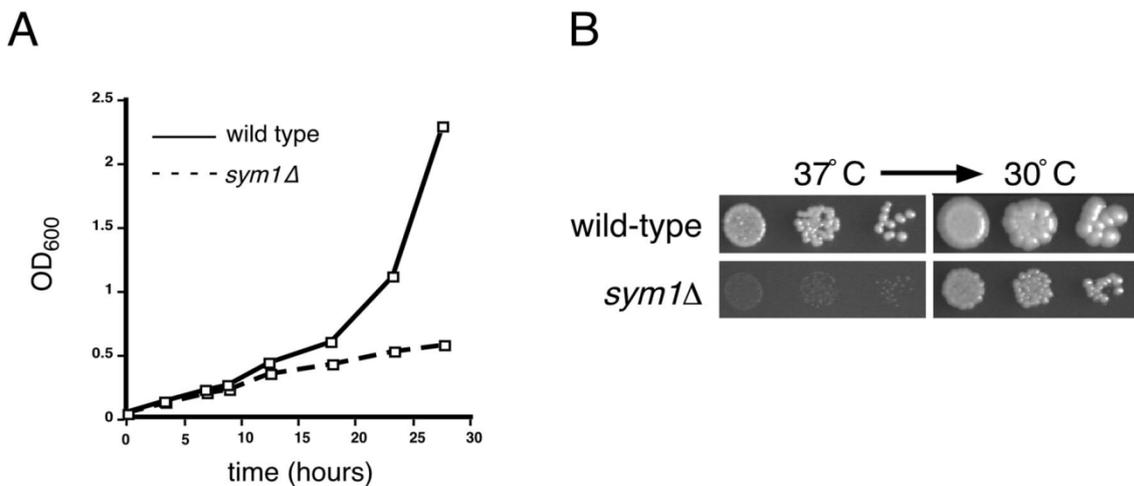


Figura 1.23 L'arresto di crescita delle cellule $\Delta sym1$ a 37°C è reversibile. **A)** Curva di crescita delle cellule in terreno contenente etanolo in seguito a trasferimento a 37°C. **B)** Le cellule sono state "spottate" in terreno contenente etanolo al 2%, dopo 7 giorni di incubazione a 37°C le piastre sono state incubate per altri 3 giorni a 28°C. (Da Trott and Morano, 2004)

1.12 SCOPO DELLA RICERCA

Scopo della tesi è capire il ruolo svolto dalla proteina mitocondriale Sym1 in *Saccharomyces cerevisiae*. L'uso del lievito, che rappresenta l'organismo modello per eccellenza per lo studio della biogenesi mitocondriale, dovrebbe consentire di chiarire i meccanismi molecolari che sono alla base dell'insorgenza di una sindrome da deplezione del DNA mitocondriale (MDDS) associata a mutazioni nell'ortologo umano MPV17.

Ci si propone inoltre di cercare, in lievito, possibili soluzioni terapeutiche, identificando soppressori chimici/metabolici e genetici. Si intende quindi identificare molecole che aggiunte al terreno di crescita o geni che overespressi siano in grado di migliorare i fenotipi causati dalla mancanza della proteina Sym1.

L'identificazione di tali soppressori, oltre ad avere un risvolto "terapeutico" contribuiranno a fornire informazioni utili per la comprensione della funzione di Sym1.

Purtroppo attualmente l'aspetto terapeutico delle sindromi da deplezione del mtDNA è del tutto insufficiente, soprattutto a causa della mancanza di informazioni sul meccanismo molecolare che sta alla base delle patologie. Quindi l'impatto delle scoperte fatte nel semplice organismo modello *S. cerevisiae* potrebbe essere molto rilevante in medicina mitocondriale.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi di lievito utilizzati

Nello studio sono stati utilizzati i seguenti ceppi aploidi di *Saccharomyces cerevisiae*:

Ceppo	Genotipo	Origine
BY4741	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4741 $\Delta sym1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sym1::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
W303-1B	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100</i>	Thomas and Rothstein, 1989
W303-1B $\Delta sym1$	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 sym1::KAN^R</i>	Nostro laboratorio
BY4742 $\Delta sym1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sym1::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
BY4741 $\Delta sml1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sml1::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
$\Delta sym1 \Delta sml1$	<i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 sym1::KAN^R sml1::KAN^R</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta rtg1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtg1::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
BY4741 $\Delta rtg3$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtg3::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
BY4741 $\Delta ymc1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ymc1::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
$\Delta sym1 \Delta ymc1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ymc1::KAN^R sym1::HYG^R</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta odc1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 odc1::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
$\Delta sym1 \Delta odc1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 odc1::KAN^R sym1::HYG^R</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta cit1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 cit1::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
$\Delta sym1 \Delta cit1$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 cit1::KAN^R sym1::HYG^R</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta cit2$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 cit2::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
$\Delta sym1 \Delta cit2$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 cit2::KAN^R sym1::HYG^R</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta yor292c$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yor292c::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
$\Delta sym1 \Delta yor292c$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yor292c::KAN^R sym1::HYG^R</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta sdh2$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sdh2::KAN^R</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
BY4741 ρ^0	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 \rho^0</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta rtg1 \rho^0$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtg1::KAN^R \rho^0</i>	Questo lavoro
BY4741 $\Delta rtg3 \rho^0$	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtg3::KAN^R \rho^0</i>	Questo lavoro

I ceppi BY4741, $\Delta rtg1$ e $\Delta rtg3 \rho^0$ sono stati ottenuti facendoli crescere per circa 30 generazioni a 28°C in terreno YPD addizionato di 20 µg/ml di etidio bromuro (Slonimski *et al.*, 1968). I cloni sono stati controllati tramite crescita su fonti ossidative e tramite colorazione DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo).

2.2 Ceppi batterici utilizzati

Per i clonaggi è stato utilizzato il seguente ceppo di *Escherichia coli*:

Ceppi	Genotipo
DH10B	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d DlacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galKλ-rpsL hupG</i>

2.3 Terreni di crescita

Per la crescita di *S. cerevisiae* sono stati utilizzati i seguenti terreni:

- **Terreno massimo YP:** bacto-peptone (ForMedium™) 2%, estratto di lievito (ForMedium™) 1%.
- **Terreno massimo YPA:** terreno YP addizionato di adenina 75 mg/l.
- **Terreno minimo minerale (YNB):** Yeast Nitrogen Base without aminoacids without NH₄SO₄ (ForMedium™) 1,9 g/L, NH₄SO₄ 5 g/L, eventuali aminoacidi e basi necessari per complementare le auxotrofie (adenina 25 mg/l, istidina 50 mg/l, leucina 100 mg/l, triptofano 50 mg/l, uracile 50 mg/l, metionina 50 mg/l, lisina 50 mg/l).
- **Terreno sintetico completo (SC):** terreno minimo minerale YNB addizionato di drop-out, secondo la formula di Kaiser (Kaiser *et al.*, 1994).
- **Terreno minimo 5-FOA:** terreno minimo minerale YNB addizionato di acido 5-fluoroorotico (Melford) 1 g/l, uracile 50 mg/l, eventuali aminoacidi e basi per complementare le auxotrofie.
- **Terreno di sporificazione:** acetato di potassio 2%, yeast extract (ForMedium™) 0,25%.

Ogni terreno veniva addizionato di una o più fonti di carbonio a diverse concentrazioni. Le fonti utilizzate sono state glucosio, galattosio, raffinose, etanolo, lattato, glicerolo, e acetato. Terreno YPD: YP addizionato di glucosio 2%; terreno YPE:YP addizionato di etanolo 2%; terreno YNBD: YNB addizionato di glucosio 2%; terreno SCD: terreno SC addizionato di glucosio 2%.

I terreni venivano all'occorrenza solidificati aggiungendo Agar (ForMedium™) 2%.

Le colture di lievito venivano fatte crescere in condizioni di aerazione a 28°C o 37°C.

Per la crescita di *E. coli* sono stati utilizzati i seguenti terreni:

- **Terreno LB:** bacto-triptone (ForMedium™) 1%, estratto di lievito (ForMedium™) 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7,2-7,5
- **Terreno LBA:** terreno LB addizionato di ampicillina (SIGMA) 100 mg/l.
- **Terreno SOB:** bacto-triptone (ForMedium™) 2%, estratto di lievito (ForMedium™) 0,5%, NaCl 0,5 g/l, KCl 186 mg/l, acqua distillata.
- **Terreno SOC per elettroporazione:** terreno SOB addizionato di MgCl₂ 20 mM e glucosio 20 mM.

I terreni venivano all'occorrenza solidificati aggiungendo Agar (ForMedium™) 2%.
Le colture di *E. coli* venivano fatte crescere in condizioni di aerazione a 37°C.

2.4 Vettori plasmidici

In questo studio sono stati utilizzati i seguenti vettori plasmidici:

Plasmide	Marcatori in <i>S. cerevisiae</i>	Tipo e numero di copie	Origine	Figura
pFL38	<i>URA3</i>	Vettore shuttle, centromerico	Bonneaud <i>et al.</i> , 1991	2.1 A
pFL44S	<i>URA3</i>	Vettore shuttle, multicopia	Bonneaud <i>et al.</i> , 1991	2.1B
pYEX-BX	<i>URA3</i> , <i>leu2-d</i>	Vettore shuttle, vettore di espressione multicopia	Clontech Laboratories	2.2
pAG32	---	Vettori di <i>E. coli</i>	Goldstein and McCusker, 1999	2.3

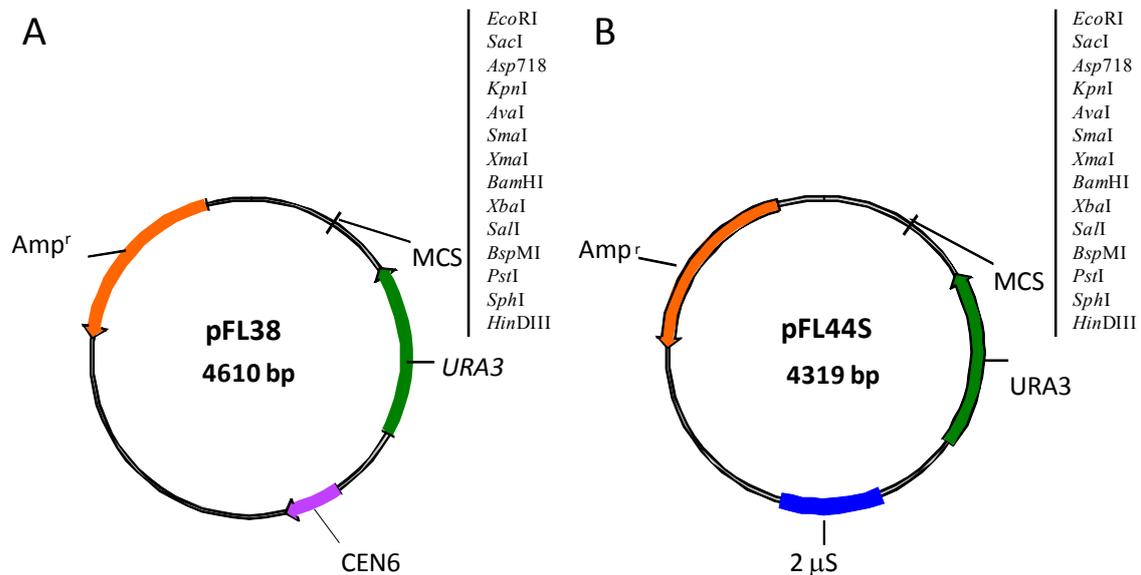


Figura 2.1 A) Plasmide pFL38; B) Plasmide pFL44.

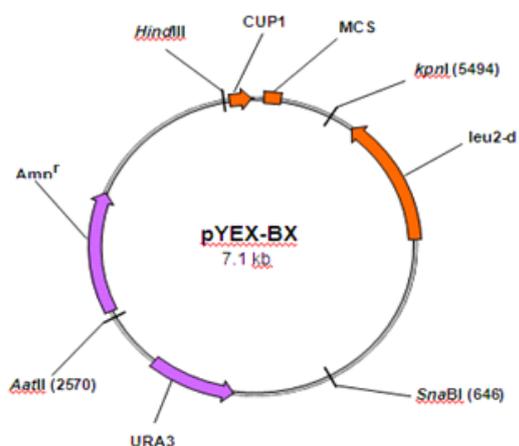


Figura 2.2 Plasmide pYEX-BX.

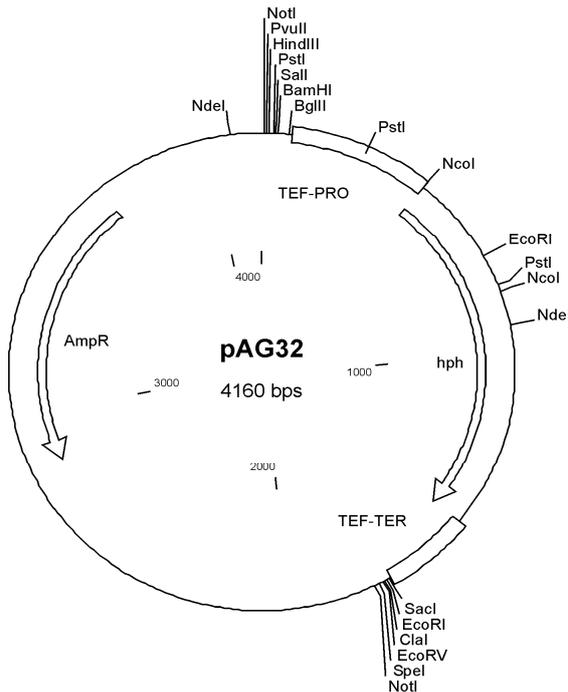


Figura 2.3 Plasmide pAG32.

2.5 PCR

Tutte le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando un termociclatore “Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler”.

2.5.1 Amplificazione di *SYM1*, *YMC1*, *YMV2*, *ODC1*, *ODC2*, *CRC1*

I geni sono stati amplificati mediante l’utilizzo dei primer elencati in tabella.

Gene Target	primer	Sito di restrizione al 5'
<i>SYM1</i>	Fw: ACTAGTCGACagagctactgtaataactgatgacga Rv: ACTAGAGCTCctgggcttctttgagggatg	Sall SacI
<i>YMC1</i>	Fw: atggcggaattgaatgttgagata Rv: gtaaagatgctgaggggataatga	---- ----
<i>ODC1</i>	Fw: TAGCGTCGACacggccatgctgttttagttcac Rv: TAGCGTCGACctccgccattgcctcctctcata	Sall Sall
<i>YMC2</i>	Fw: TAGCGTCGACaattgcttctacggacactcaca Rv: TAGCGTCGACttttgggtaccagatgccctatta	Sall Sall
<i>ODC2</i>	Fw: TAGCGTCGACcatttgattccttgccgttctg Rv: TAGCGTCGACcaatgatgctgctttcacctct	Sall Sall
<i>CRC1</i>	Fw: TAGCGTCGACaccgaagcaattgtggcagcagt Rv: TAGCGTCGACgcaaagatttcacatggcacagt	Sall Sall

L’amplificazione è stata effettuata mediante l’utilizzo della “*Pwo DNA Polymerase*” (Roche), secondo le istruzioni fornite dal produttore, utilizzando circa 50 ng di DNA genomico del ceppo BY4741 in 100 μ l e utilizzando le condizioni riportate in figura 2.4.

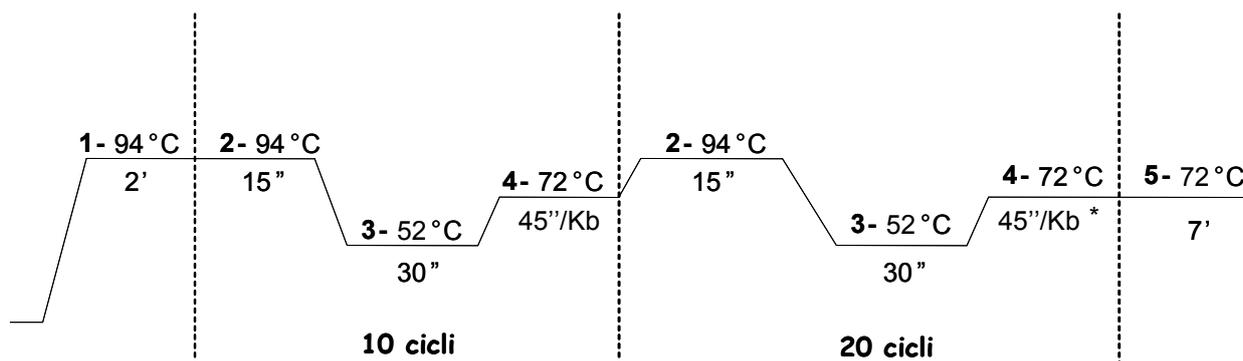


Figura 2.4 Condizioni PCR con PWO polimerasi. 1- Denaturazione iniziale; 2- Denaturazione; 3- Annealing; 4- Estensione; 5- Estensione finale; * 5 secondi in più ad ogni ciclo.

Alternativamente è stata utilizzata la polimerasi “KOD Hot Start” (Novagen®), secondo le istruzioni fornite dal produttore, utilizzando circa 75 ng di DNA genomico del ceppo BY4741 in 50 µl e utilizzando le condizioni riportate in figura 2.5.

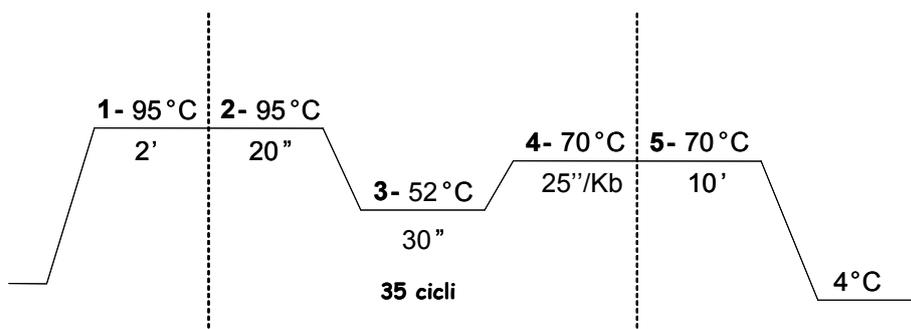


Figura 2.5 Condizioni PCR con KOD polimerasi. 1- Denaturazione iniziale; 2- Denaturazione; 3- Annealing; 4- Estensione; 5- Estensione finale.

2.5.2 PCR per la distruzione di *SYM1*

Per la distruzione del gene *SYM1* con la cassetta *Hyg^R*, è stata utilizzata la “*Platinum[®] Pfx DNA polymerase*” (Invitrogen) e i primer SYM-HYGF e SYM-HYGR (vedi tabella).

Nome primer	Sequenza primer
SYM-HYGF	tctttgttatactataggaagatagaattgatataaaacagCGTACGCTGCAGGTCGAC
SYM-HYGR	gctagttgaattccaaatatttcaaatcaggatttctatccaATCGATGAATTCGAGCTCG

Come template sono stati utilizzati 20 ng di plasmide pAG32 (plasmide con la cassetta *Hyg^R*) e 1 unità di *Pfx* in un volume totale di 100 µl. Per l'amplificazione sono state usate le condizioni riportate in figura 2.6.

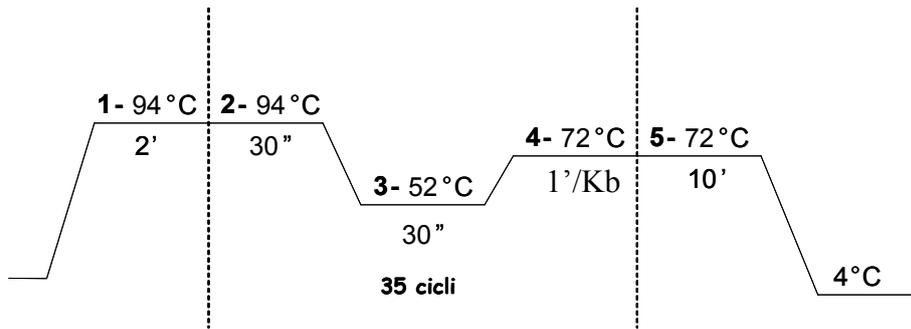


Figura 2.6 Condizioni PCR con polimerasi Pfx. 1- Denaturazione iniziale; 2- Denaturazione; 3- Annealing; 4- Estensione; 5- Estensione finale.

2.5.3 PCR da colonia di lievito

Le PCR da colonia di lievito sono state condotte utilizzando la “GoTaq® DNA Polimerase” (Promega) per controllare che la cassetta di distruzione Hyg^R si sia integrata al locus corretto. Sono stati utilizzati diversi primer elencati in tabella.

Nome primer	Sequenza primer
SYMseq1	CAAAAGGGAAAAGGCAAACACAGTCT
SYMseq2	CCCCAAGGAACAAGGTCTGATAAAT
SYM1up	ACTAGTCGACagagctactgtaataactgatgacga
SYM1low	ACTAGAGCTCctggggcttctttgagggatg
SYM1est	CATAAGGACAAAGATCCAGACG
K2	GAAAGAAGAACCTCAGTGCC

Sono state utilizzate cellule cresciute per 24 ore in terreno SC selettivo.

E' stata allestita la reazione di PCR (tranne la polimerasi) e il tutto è stato incubato a 95°C per 15 minuti. E' stata poi aggiunta la polimerasi (1,2 unità di *Taq*), fino ad arrivare ad un volume di $50\ \mu\text{l}$. Per l'amplificazione sono state utilizzate le condizioni riportate in figura 2.7.

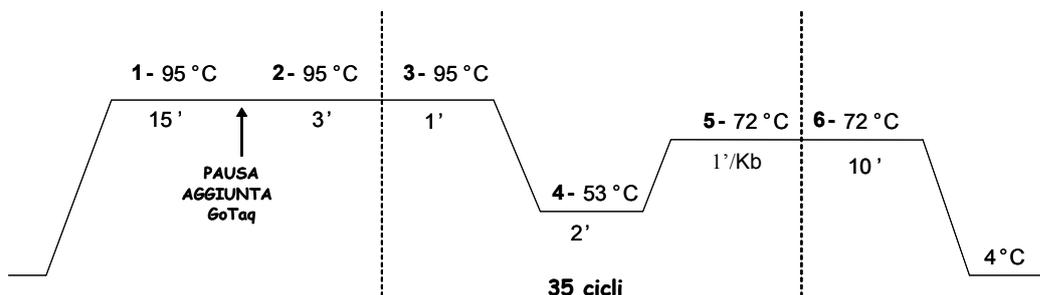


Figura 2.7. Condizioni PCR con GoTaq polimerasi. 1 Rottura iniziale delle cellule; 2 denaturazione iniziale; 3 Denaturazione; 4 Annealing; 5 extension; 6 Final extension.

2.5.4 PCR per ottenere gli alleli *SYM1-tag*

Il gene *SYM1* è stato amplificato con i primer SYM1up (che si appaia circa 500 pb a monte della ORF di *SYM1*) e SYM1HA per ottenere il costrutto recante l'immunosegnale HA, e SYM1UP e SYM1HIS per ottenere il costrutto recante l'immunosegnale esa-istidinico.

I primer SYM1HA e SYM1HIS, hanno, in ordine dal 3' al 5', una sequenza che si appaia alle 27 pb che precedono il codone di stop di *SYM1*, la sequenza codificante per il *tag*, il codone di stop (TAA), 13 pb che si appaiano alla regione che segue il codone di stop e il sito di restrizione necessario per il clonaggio.

Per l'amplificazione del terminatore di SYM1 sono stati utilizzati i primer SYMter e SYM1low.

Nome primer	Sequenza primer	Sito di restrizione al 5'
SYM1up	5'- actaGTCGACagagctactgtaataactgatgacga - 3'	<i>SalI</i>
SYM1HA	5'- gggcGGTACCatttcttatccagTTAAGCGTAATCTG GAACATCGTATGGGTATTTCGACCACGGGTGGA TAATGAACAGG - 3'	<i>BamHI</i>
SYM1HIS	5'- gggcGGTACCatttcttatccagTTAGTGGTGGTGG TGGTGGTGTTCGACCACGGGTGGATAATGAAC AGG - 3'	<i>BamHI</i>
SYMter	5'- gggcGGTACCcctgattttgaaaatatttggattc - 3'	<i>BamHI</i>
SYM1low	5'- actaGAGCTCctggggctctttgagggatg - 3'	<i>SacI</i>

Per l'amplificazione è stata utilizzata la polimerasi "PWO Polymerase" (Roche) seguendo le indicazioni della casa produttrice e le condizioni riportate in figura 2.8.

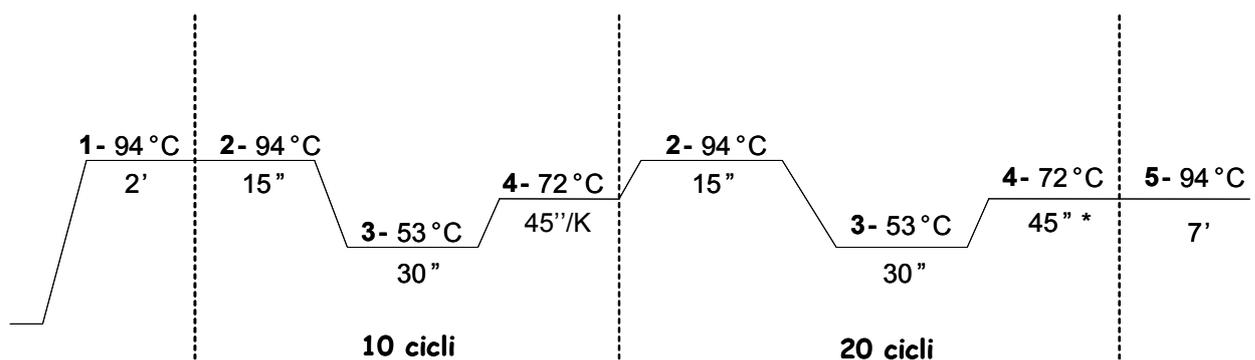


Figura 2.8. Condizioni PCR con PWO polimerasi. 1 denaturazione iniziale; 2 Denaturazione; 3 Annealing; 4 extension; 5 Final extension; * 5 secondi in più ad ogni ciclo.

2.6 Sequenziamento

Il sequenziamento dei vari costrutti molecolari è stato effettuato esternamente utilizzando il servizio di sequenziamento della MWG-Biotech. Per il sequenziamento sono stati utilizzati i

primer universali M13-uni e M13-rev, che si appaiano alle regioni fiancheggianti il MCS dei plasmidi utilizzati per i clonaggi.

Primer per il sequenziamento
M13 rev (-49): 5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'
M13 uni (-43): 5'-AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT-3'

2.7 Manipolazione del DNA

2.7.1 Digestione con endonucleasi di restrizione

Le digestioni analitiche di DNA venivano condotte digerendo 100-2000 ng di DNA in presenza di 5-10 unità di endonucleasi di restrizione specifica (New England Biolabs) in un volume totale di 20 μ l, per 2 ore a 37°C.

Per i clonaggio, 2 μ g di amplificato e 3 μ g di vettore sono stati digeriti con gli opportuni enzimi di restrizione (New England Biolabs) seguendo le indicazioni della casa produttrice.

Dopo digestione i prodotti venivano purificati.

2.7.2 Elettroforesi su gel d'agarosio e escissione da banda

L'elettroforesi dei frammenti di DNA veniva eseguita su gel d'agarosio 0,8%-1,2% in tampone TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) ed etidio bromuro 0,5 μ g/ml. Ai campioni veniva aggiunto 1/10 di volume di tampone di caricamento (glicerolo 30%, bromo fenolo blu 0,25%, xilene cianolo 0,25%).

Per l'escissione da banda, 100-500 mg di gel venivano escissi con una lama. L'estrazione da gel veniva condotta col kit "Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega).

2.7.3 Purificazione del DNA

Se necessario, i prodotti di PCR e i prodotti di digestione venivano purificati con il kit "Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega).

2.7.4 Defosforilazione del DNA

La defosforilazione dell'estremità 5' dei vettori digeriti veniva condotta utilizzando la fosfatasi antartica (New England Biolabs). 1 μ g di DNA veniva defosforilato con 10 unità di enzima in un volume totale di 100 μ l, per 1 ora a 37°C, dopodiché la fosfatasi alcalina veniva inattivata scaldando 10 minuti a 65°C. Il DNA defosforilato veniva poi purificato col kit "Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System"

2.7.5 Ligazione

Le reazioni di ligazione venivano condotte mantenendo un rapporto molare vettore:inserto pari a 1:5 per ligazioni “*sticky ends*” e 1:6-1:8 per ligazioni “*blunt ends*” e utilizzando la T4 DNA ligasi (Invitrogen), secondo i protocolli forniti dalla casa produttrice.

2.8 Trasformazioni

2.8.1 Trasformazione di *E. coli* mediante elettroporazione

I ceppi di *E. coli* venivano resi elettrocompetenti secondo il protocollo di Dower *et al.*, 1988. Le cellule elettrocompetenti venivano trasformate aggiungendo all’ependorf 1-3 μ l di DNA plasmidico (1-10 ng) o di ligazione. L’elettroporazione veniva condotta utilizzando una cuvetta da 2 mm, settando i valori di 2 KV, 25 μ F e 200 Ω , oppure utilizzando una cuvetta da 1 mm, settando i valori di 1,75 KV, 25 μ F e 200 Ω .

2.8.2 Trasformazione di *S. cerevisiae*

La trasformazione di *S. cerevisiae* veniva condotta con la tecnica del litio acetato (Gietz and Woods, 2002). Le cellule venivano trasformate con 100-1000 ng di DNA. In alternativa, veniva utilizzato il protocollo per la trasformazione rapida di *S. cerevisiae* (Gietz and Woods, 2002).

Per le distruzioni, prima del piastramento le cellule venivano fatte rigenerare in 2 ml di YPAD per 4 ore e piastrate successivamente su piastre YPD addizionate di igromicina 300 μ g/ml. La conferma della distruzione veniva condotta per analisi fenotipica e per PCR.

2.9 Ricerca di soppressori multicopia

Il ceppo *sym1::KAN^R* è stato trasformato tramite il protocollo standard del litio acetato (Gietz and Woods, 2002) con una libreria genomica nel plasmide multicopia pSEY8 *URA3*, e la trasformazione è stata seminata su piastre di SC, prive di uracile, addizionate di glucosio 2% e incubate a 28°C. Le piastre sono poi state replicate tramite *replica-plating* su YPE e incubate a 37°C. Le colonie in grado di crescere sono state recuperate e ri-strisciate su YPE per ri-confermare il fenotipo a 37°C. Inoltre è stata effettuata una perdita plasmidica (con 5-FOA) per correlare la perdita del plasmide con la perdita della crescita a 37°C su YPE.

Successivamente i plasmidi che erano in grado di sopprimer il fenotipo del ceppo *sym1::KAN^R* sono stati recuperati e analizzati per PCR per escludere i plasmidi contenenti *SYM1*. E’ stato poi sequenziato ad entrambe le estremità l’inserto del plasmide di interesse e comparato con il genoma di *S. cerevisiae* effettuando una ricerca BLAST.

2.9.1 Perdita plasmidica tramite 5-FOA

Cellule di ciascun trasformante sono state strisciate in piastre di SC addizionate di glucosio 2% e uracile in modo che le cellule potessero perdere il plasmide pSEY8. Dopo 24 ore le

piastre sono state replicate su piastre di acido 5-fluororotico (5-FOA), su cui potevano crescere solo le cellule che avevano perso il plasmide, essendo il 5-FOA tossico in presenza del prodotto genico del gene *URA3*. Dopo 24 ore è stata eseguita un'ulteriore replica su 5-FOA. Infine è stata effettuata una replica su SC privo di uracile per controllare l'effettiva perdita plasmidi.

2.10 Estrazione di DNA

2.10.1 Minipreparazione di DNA plasmidico da *E. coli*

L'estrazione di DNA plasmidico da *E. coli* veniva eseguita col metodo della lisi alcalina partendo da 1,5 ml di coltura in fase stazionaria, come descritto da Sambrook and Russel, 2001. Il DNA veniva risospeso in 20-30 µl di acqua più RNasi 20 µg/ml.

In alternativa il DNA plasmidico veniva estratto da 5 ml di coltura col kit “*Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System*” (Promega) risospeso il DNA in 100 µl di acqua.

2.10.2 Estrazione di DNA genomico da lievito

Il DNA usato come template nelle PCR per i clonaggi veniva estratto da lievito secondo il protocollo di Nasmyth and Reed, 1980, partendo da 10 ml di coltura di lievito in YPD e risospeso il DNA estratto in 50-100 µl di acqua.

2.10.3 Estrazione rapida di DNA totale da lievito

Per le PCR analitiche e per le trasformazioni di *E. coli* con DNA plasmidico totale, il DNA totale veniva estratto col metodo di Hoffman and Winston, 1987. Il materiale di partenza era costituito da 8 ml di terreno YPD per ceppi privi di DNA plasmidico, o 10 ml di terreno minimo SC addizionato di glucosio e di opportuni aminoacidi per ceppi contenenti plasmidi. Il DNA veniva risospeso in 50 µl di acqua più RNasi.

2.11 Estrazione di RNA da lievito e Northern blot

Gli RNA totali venivano preparati mediante estrazione con fenolo acido (Ausubel *et al.*, 1994).

Per l'analisi *Northern* venivano utilizzati 30 µg di RNA, che venivano caricati su gel d'agarosio denaturante e fatti correre per circa tre ore a 100 V. Il *blot* veniva condotto come descritto precedentemente da Sherman *et al.*, 1986. Il trasferimento veniva condotto su filtro di nylon *Hybond-N+* (Amersham). L'ibridazione radioattiva è stata condotta marcando 100 ng di sonda mediante il kit “Rediprime II DNA Labeling System” (GE Healthcare) e 5 µl di “Redivue deoxycytidine 5'-[α-³²P]triphosphate 370 MBq/ml” (GE Healthcare). Dopo i lavaggi, il filtro veniva esposto per un tempo variabile su lastre Kodak. Per la quantificazione,

il filtro veniva esposto al PhosphorImager (BioRad) e le bande venivano quantificate mediante il software fornito dalla casa produttrice.

Come controllo, veniva ibridato l'mRNA del gene *ACT1*, codificante per i monomeri dell'actina.

2.11.1 Sonde per l'analisi Northern

La sonda per *SYMI* è un frammento di 512 pb ottenuto tramite amplificazione PCR utilizzando il plasmide pFL38-*SYMI* come template.

La sonda per *ACT1* è un frammento di 1100 pb ottenuto tramite digestione del plasmide pBR322-*ACT1* con gli enzimi *XhoI* e *HindIII* e purificazione del frammento corrispondente al gene *ACT1*.

I primer utilizzati sono i seguenti:

SONDA	Sequenza primer
<i>SYMI</i>	Fw: cagctagggctgtcatctatg Rv: cccaaggaacaaggctctgataaat

2.12 Estrazione di mitocondri e saggi enzimatici

2.12.1 Estrazione di mitocondri

Partendo da una pre-coltura in YPE cresciuta a 28°C, le cellule sono state inoculate in 200 ml di YPD (10^7 cell/ml) e incubate in agitazione per 4 ore a 28°C. Poi sono state raccolte e risospese in 200 ml di YP addizionato di glucosio ad una concentrazione non reprimente (0,6%) ed etanolo (2%) e incubate *over-night* (13 ore) a 37°C. Successivamente le cellule venivano raccolte. La preparazione dei mitocondri è stata effettuata come descritto precedentemente (Ferrero *et al.*, 1981).

2.12.2 Quantificazione delle proteine (Metodo Bradford)

La concentrazione delle proteine è stata determinata attraverso il metodo di Bradford (Bradford, 1976), utilizzando il micrometodo del kit "Bio-Rad Protein Assay" (BIORAD) seguendo le indicazioni del produttore.

2.12.3 Saggio enzimatici

Le attività enzimatiche sono state misurate spettrofotometricamente.

L'attività glutammato deidrogenasica NADP⁺-dipendente è stata misurata a 340 nm in tampone potassio fosfato 0,08 M (pH 7,6), EDTA 5,8 mM; cisteina 0,23 mg/ml; NH₄Cl 10,2 mg/ml, NADPH 67 ng/ml e α -chetoglutarato 6 mM.

L'attività glutammato deidrogenasica NAD^+ -dipendente è stata misurata a 340 nm in tampone potassio fosfato 0,08 M (pH 7,6), EDTA 5,8 mM; cisteina 0,23 mg/ml; NH_4Cl 10,2 mg/ml, NADH 67 ng/ml e α -chetoglutarato 6 mM.

Per la citrato sintasi (CS) l'attività è stata misurata a 412 nm in una cuvetta da 1 ml contenente DTNB 0,1 mM (in Tris-HCl 1M pH 8.1); Triton X-100 0,25%; Acetil-CoA 0,31 mM e ossalacetato 0,5 mM (in trietanolamina-HCl 0,1M pH8.0 + 5 mM EDTA) (Srere, 1969).

L'attività enzimatica dell'isocitrato deidrogenasi (IDH) NAD(H) -specifica è stata misurata a 340 nm in 1 ml di Tris-HCl 40 mM (pH7,5); MgCl_2 4 mM; NAD^+ 0.25 mM e DL-isocitrato 2.5 mM (Keys and McAlister-Henn, 1990).

L'attività della succinato deidrogenasi (*Succinate Dehydrogenase DCPIP assay*) è stata misurata a 600 nm in tampone potassio fosfato 0,1 M (pH 7,8); 2,6-diclorofenolo-indofenolo (DCPIP) 0,15 mM; fenazina meta solfato (PMS) 5 mM; sodio azide (NaN_3) 100 mM; e succinato 10 mM (modificato da Kim and Beattie, 1973).

L'attività della malato deidrogenasi (MDH) è stata misurata a 340 nm in tampone fosfato 60 mM (pH 7); NADH 0,28 mM and ossalacetato 0,67 mM (modificato da McAllister-Henn and Thompson, 1987).

L'attività del complesso III (citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi) è stata misurata a 550 nm in tampone fosfato 50 mM (pH 7,4); sodio azide 2 mM; BSA 1mg/ml (in EDTA 10 mM pH 7,4); laurilmaltoside 0,7 mM; antimicina A 1 ng/ml; citocromo C ridotto 50 μM ; DBH_2 50 μM (Zheng *et al.*, 1990).

L'attività del complesso IV (citocromo c ossidasi - COX) è stata misurata a 550 nm in tampone fosfato 10 mM (pH 7); BSA 1mg/ml (in EDTA 10 mM pH 7,4) e citocromo C 80 μM (Warthon and Tzagoloff, 1967).

L'attività del complesso V (ATP sintasi) è stato misurato a 340 nm in tampone H-Mg pH8 (MgSO_4 10 mM in Hepes-KOH 100 mM pH 8); NADH 0,3 mM; fosfoenolpiruvato 2,5 mM; piruvato chinasi 50 ng; lattato deidrogenasi 50 ng; antimicina A 2 ng/ml e ATP 2,5 mM (Ragan *et al.*, 1987).

Il substrato esogeno che fa partire la reazione è stato aggiunto solo dopo l'esaurimento del substrato endogeno.

L'attività (nmol/min mg Pt) è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\text{Attività} = \frac{\text{Lettura } (\Delta\text{OD}/\text{min}) \times 1000 \times \text{Vol. totale (ml)}}{\epsilon \times \text{Vol. campione (ml)} \times \text{Conc. proteica (mg/ml)} \times \text{Cammino ottico (cm)}}$$

dove il valore di $\Delta\text{OD}/\text{min}$ è la variazione dell'assorbimento e si ricavato dalla pendenza della retta ottenuta e ϵ è il coefficiente di estinzione molare (ml/nmol cm).

Di seguito sono elencati i vari dei coefficienti di estinzione molare:

- $\epsilon = 6,2 \text{ ml/nmol cm}$ per GDH, IDH, MDH e complesso V;
- $\epsilon = 13,8 \text{ ml/nmol cm}$ per CS;
- $\epsilon = 21 \text{ ml/nmol cm}$ per SDH, complesso III e complesso IV.

2.13 Determinazione dell'attività GDH attraverso zimogramma

2.13.1 Elettroforesi nativa su gel di poliacrilammide (PAGE)

Il gel impiegato per l'analisi dello zimogramma è discontinuo: nella parte superiore è costituito da uno *stacking gel* (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; 4% acrilammide [36:1] e i due catalizzatori ammonio persolfato e Temed) e nella parte inferiore è costituito da un *running gel* (Tris-HCl 0,375 mM pH 8,8; 5% acrilammide [36:1] e i due catalizzatori) dove le proteine si separano in base al peso molecolare. La corsa è stata condotta in una cella Mini Trans-Blot (BIORAD) in tampone Tris-HCl 25 mM e glicina 187 mM.

Sono stati utilizzati i mitocondri isolati come descritto nel paragrafo 2.12.1. E' stata determinata la concentrazione proteica con il metodo Bradford (paragrafo 2.12.2) e sono stati caricati 50 μg di proteine mitocondriali, addizionati di *loading buffer* (Tris-HCl 3 M pH 6,8; glicerolo 3% e bromo fenolo blu 0,05%).

2.13.2 Zimogramma

Una volta terminata la corsa elettroforetica il *running gel* è stato ricoperto con una miscela (Tris-HCl 100 mM pH 8,8; Na-glutammato 5mg/ml; NAD 0,5 mg/ml o NADP 0,5 mg/ml; NitroBlueTetrazolium 0,25 mg/ml; fenazina metasolfato 0,005 mg/ml) resa semi-solida dall'aggiunta di una soluzione di agarosio allo 0,5%. Il gel è stato incubato a 37°C.

2.14 Analisi di Proteine

2.14.1 Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Il gel è di tipo discontinuo: nella parte superiore è costituito da uno *stacking gel* (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; 4% acrilammide [36:1], SDS 0,1% e i due catalizzatori ammonio persolfato e Temed) e nella parte inferiore è costituito da un *running gel* (Tris-HCl 0,375 mM pH 8,8; 12% acrilammide [36:1], SDS 0,1% e i due catalizzatori) dove le proteine si separano in base al peso molecolare. La corsa è stata condotta in una cella Mini Trans-Blot (BIORAD) in tampone Tris-HCl 25 mM, glicina 187 mM e SDS 0,1%.

Sono stati utilizzati i mitocondri isolati come descritto nel paragrafo 3.12.1. E' stata determinata la concentrazione proteica con il metodo Bradford (paragrafo 3.12.2) e sono stati utilizzati 30 μg di proteine mitocondriali per *lane*. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti prima di essere caricati e sono stati addizionati di *loading buffer* (Tris-HCl 34 mM pH 6,8; glicerolo 5%, β -mercaptoetanololo 5%, bromofenolo blu 2% e SDS 0,24 mg).

2.14.2 Gel elettroforesi *blue native* (BNGE)

I mitocondri isolate come descritto nel paragrafo 2.12.1, sono stati trattati con dodecilmaltoside (1g/1g) (Nijtmans *et al.*, 2002). Per la prima dimensione 100µg di protein sono state caricate in un gel a gradient (5-13%) non-denaturante (1D-BNGE). Per la seconda dimensione 2D-BNGE denaturante, la striscia della prima dimensione è stata tagliata, trattata per 2 ore a temperatura ambiente con SDS 1% e β-mercaptoetanololo 1% e successivamente è avvenuta la corsa elettroforetica in un gel discontinuo tricina-SDS-poliacrilammide al 16,5% (Schagger and von Jagow, 1987).

2.14.3 Elettroblot

Le proteine sono state trasferite, tramite *elettroblotting*, dal gel di poliacrilammide alla membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare).

2.14.4 Immunorivelazione

Per la rivelazione delle proteine di interesse o dei complessi molecolari di cui fanno parte tali proteine sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari (incubazione *over night* a 4°C):

- Anti-Sdh2 contro la subunità 2 del complesso II (prof. B. Lemire);
- Anti-Core1 e Core2 contro le omonime proteine del complesso III (prof. B.L. Trumpower);
- Anti-COIII contro la subunità III del complesso IV (Molecular Probes, Invitrogen);
- Anti-ATP4 contro la subunità 4 del complesso V (prof. J. Velours);
- Anti-Odc1 (prof. L. Palmieri);
- Anti-HA contro l'epitopo dell'emoagglutinina della proteina di fusione Sym1-HA (Roche Applied Science).

Sono poi stati utilizzati gli adeguati anticorpi secondari Anti-Rabbit, Anti-Mouse o Anti-Rat (GE Healthcare) (incubazione 2 ore a temperatura ambiente; diluizione 1:5000).

L'immunorivelazione è stata effettuata utilizzando il kit *ECLTM Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare).

2.15 Analisi fenotipiche

2.15.1 Spot assay

Le cellule venivano coltivate in YP o YNB addizionato di glucosio a 28°C. Quando erano in fase esponenziale, venivano diluite in modo da ottenere le concentrazioni 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ cells/ml. Da queste venivano prelevati in 10µl e utilizzati per fare gli spot su piastra (10⁵, 10⁴, 10³, 10² cell/spot). Le piastre sono state incubate alla temperatura di 28°C o 37°C per un numero variabile di giorni.

2.15.2 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) di etanolo

Le cellule sono state coltivate a 28°C in YPD fino a raggiungere la fase esponenziale. Sono state inoculate in terreno YP addizionato di diverse concentrazioni di etanolo ad una concentrazione di 10^6 cell/ml. Le colture sono state incubate in aereazione a 28°C o 37°C e dopo un tempo opportuno è stata misurata l'assorbanza a 600 nm.

2.15.3 Determinazione della frequenza dei *petite*

La frequenza dei *petite* è stata misurata inoculando dapprima le cellule da testare in 10 ml di terreno SC addizionato di etanolo 2% per controselezionare le cellule respiratorio deficienti. Dopo 2-3 giorni, le cellule venivano inoculate in 10 ml di YNB addizionato di glucosio 2% ad una concentrazione finale di 10^6 cell/ml e incubate per 4 ore a 28°C. In seguito veniva aggiunto 2% di etanolo e le colture venivano incubate per 24 ore a 37°C (circa 7 generazioni). In alcuni casi le cellule venivano reinoculate in 10 ml di terreno YNB addizionato di glucosio 2% e etanolo 2% ad una concentrazione finale di 10^6 cell/ml e fatte crescere per ulteriori 24 ore a 37°C (circa 15 generazioni complessive). Dopo 7 o 15 generazioni, le cellule venivano diluite e 200 cellule venivano piastrate su terreno SC addizionato di etanolo 2% e glucosio 0,25%. Le cellule venivano contate dopo 5 giorni di incubazione a 28°C.

Sono state analizzate più di 3000 colonie per ceppo ed ogni esperimento è la media di tre esperimenti differenti.

2.15.4 Determinazione della natura dei *petite*

Per discriminare se i cloni *petite* erano ρ^- o ρ^0 , i cloni sono stati incrociati con quattro cloni *mit* di sesso opposto che presentavano mutazioni *cox2*, *cox3*, e due distinte mutazioni *cob*. L'analisi è stata condotta strisciando 300 cloni *petite* su terreno YPD. Dopo 24 ore, le piastre venivano replicate su 4 diverse piastre di terreno YPD, su ciascuna delle quali era stato precedentemente piastrato un diverso ceppo tester (circa 10^7 cellule). Dopo tre giorni, le piastre venivano replicate su terreno YPE. La percentuale di cloni ρ^0 è definita come rapporto fra il numero di diploidi respiratorio sufficienti e il numero di diploidi ottenuti.

2.15.5 Spettri dei citocromi respiratori

Sono state allestite delle colture a 28°C in YPE. Successivamente le cellule sono state inoculate in 200 ml di YPD (10^7 cell/ml) e incubate in agitazione per 4 ore a 28°C. Poi sono state raccolte e risospese in 200 ml di YP addizionato di glucosio ad una concentrazione non reprimente (0,6%) ed etanolo (2%) e incubate *over-night* (13 ore) a 37°C. Successivamente le cellule venivano raccolte, lavate con acqua bidistillata e risospese in acqua in un volume complessivo di circa 3 ml, in modo tale che la concentrazione cellulare fosse almeno del 50%.

Gli spettri sono stati condotti utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio Cary 219 (Varian) misurando l'assorbanza fra 630 e 540 nm. I picchi a 602-560-550 nm corrispondono ai citocromi aa₃ (complesso IV), b (complesso III) e c.

2.15.6 Misurazione dell'attività respiratoria

L'attività respiratoria veniva determinata a 30°C mediante l'utilizzo dell'ossigrafo Hansatech, inserendo nell'apposita camera 100 µl di cellule ottenute come nel paragrafo precedente in 0,9 ml di tampone di respirazione (0,1M ftalato-NaOH, pH 5,0) saturo di ossigeno e addizionato di glucosio 2%. Su 1 ml della sospensione originale veniva determinato il peso secco, che doveva essere circa 50-100 mg. I valori venivano espressi come nmoli di ossigeno consumato per minuto per milligrammo di cellule (nmol O₂/min/mg).

2.15.7 Analisi della morfologia mitocondriale (microscopia elettronica)

L'esperimento è stato eseguito in due condizioni di crescita diverse: a) cellule cresciute esponenzialmente a 37°C in YP addizionato di glucosio 2% e etanolo 2%; b) cellule cresciute esponenzialmente a 28°C in YPD, raccolte per centrifugazione, inoculate in terreno YPE e incubate per 13 ore a 37°C.

Le cellule sono poi state raccolte per centrifugazione e fissate in glutaraldeide 2% per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono successivamente stati trattati come descritto in Dallabona *et al.*, 2009, ed analizzati presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università La Sapienza di Roma in collaborazione con la Professoressa Mancini.

2.15.8 Determinazione del contenuto cellulare di glicogeno

I ceppi sono stati inoculati in terreno YPD e incubati a 28°C 4 giorni. Successivamente sono stati effettuati degli spot da 2x10⁵ cellule su diverse piastre. La determinazione semi-quantitativa del contenuto cellulare di glicogeno è stata effettuata addizionando, a vari tempi, 10 ml di soluzione di iodio (0.4% KI-0.2% I₂) alle piastre. Gli spot dei ceppi che non accumulano glicogeno rimangono gialli, mentre gli spot dei ceppi che lo accumulano si colorano di marrone, e l'intensità della colorazione è proporzionale al contenuto del polimero.

2.16 Marcatura dell'mtDNA con DAPI

Dopo circa 24 ore di crescita in terreno solido YPD, le cellule venivano stemperate in 200 µl di Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Successivamente veniva aggiunto il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) ad una concentrazione finale di 1 µg/ml, e le cellule venivano incubate in ghiaccio per 15 minuti. Le cellule venivano osservate con un microscopio ottico Nikon ECLIPSE 80i con un obiettivo 100X in immersione.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

(I parte)

“ANALISI DEL CEPPO $\Delta sym1$ ”

Parte dei risultati discussi in questa sezione sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

Dallabona C, RM Marsano, P Arzuffi, D Ghezzi, P Mancini, M Zeviani, I Ferrero and C Donnini. 2009. "Sym1, the Yeast Ortholog of the Mpv17 Human Disease Protein, Is a Stress-Induced Bioenergetic and Morphogenetic Mitochondrial Modulator." *Hum Mol Genet.*

Nell'intento di identificare la funzione di *SYM1*, sono stati inizialmente utilizzati diversi approcci. Da un lato è stata eseguita un'attenta analisi fenotipica del mutante delecto ($\Delta sym1$) per capire in quali *pathway* fosse implicata la proteina Sym1. Dall'altro sono stati cercati soppressori della mutazione $\Delta sym1$, sia metabolici che genetici.

3.1 ANALISI FENOTIPICA

3.1.1 ANALISI DELLA CRESCITA OSSIDATIVA

E' stato precedentemente riportato che il mutante diploide omozigote $\Delta sym1/\Delta sym1$ nel contesto genetico BY4743 ha un difetto di crescita su etanolo a 37°C (Trott and Morano, 2004).

Per meglio caratterizzare il difetto determinato dalla mancanza di Sym1, è stata effettuata l'analisi fenotipica in un contesto genetico aploide. E' infatti noto che i ceppi aploidi sono generalmente meno vigorosi dei ceppi diploidi (Nagiec *et al.*, 1997).

L'analisi fenotipica è stata quindi condotta su numerose fonti di carbonio ossidabili quali etanolo, glicerolo, acetato, lattato e glucosio a bassa concentrazione (0,01%), sia in terreno ricco (YP) che in terreno minimo minerale (YNB), sia alla temperatura ottimale di crescita (28°C) che alla temperatura di 37°C (Figura 3.1). Nel caso del terreno YNB è stato necessario aggiungere alle fonti di carbonio ossidabili 0,01% di glucosio altrimenti neanche il ceppo parentale era in grado di crescere.

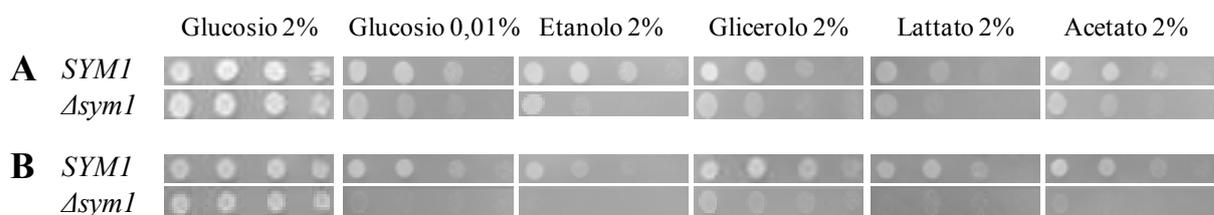


Figura 3.1 Crescita ossidativa nel contesto BY4741 a 37°C. **A)** Analisi in terreno ricco (YP) (foto dopo 2 giorni di incubazione); **B)** Analisi in terreno minimo minerale (YNB) (foto dopo 5 giorni di incubazione).

Dalla figura 3.1 si può vedere che a 37°C il ceppo BY4741 $\Delta sym1$ presenta un'incapacità di crescita/ridotta crescita in tutte le condizioni testate. Quindi, contrariamente a quanti riportato in letteratura (Trott and Morano, 2004), il difetto del ceppo mutato non è specifico per l'etanolo, ma si estende a tutte le fonti di carbonio testate, indicando che la mancanza di Sym1 non danneggia in maniera specifica il metabolismo dell'etanolo, ma il metabolismo ossidativo in generale (difetto OXPHOS). Il difetto è più o meno grave in dipendenza della fonte di carbonio utilizzata, ad esempio è grave in presenza di etanolo e lieve in presenza di glicerolo; inoltre dipende dal tipo di terreno, è infatti molto più evidente in terreno minimo minerale rispetto al terreno ricco.

La stessa analisi è stata effettuata anche in un secondo contesto genetico aploide, in particolare è stato utilizzato il ceppo W303-1B. I risultati confermano che la delezione del gene *SYM1* porta ad una ridotta/assente crescita su tutte le fonti di carbonio non fermentabili alla temperatura di 37°C (Figura 3.2).

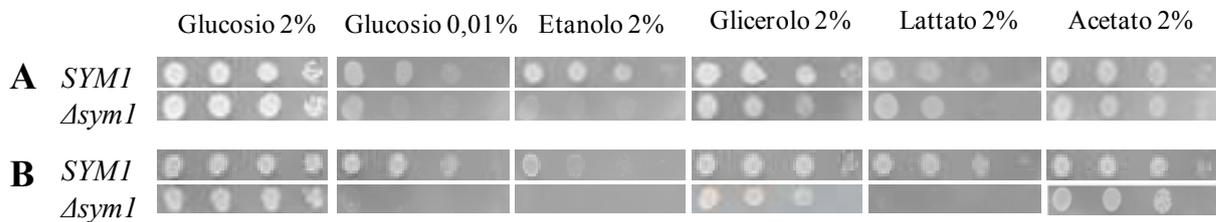


Figura 3.2 Crescita ossidativa nel contesto W303-1B a 37°C. **A)** Analisi in terreno ricco (YP) (foto dopo 2 giorni di incubazione); **B)** Analisi in terreno minimo minerale (YNB) (foto dopo 5 giorni di incubazione).

In accordo con i risultati precedenti, il ceppo delecto $\Delta sym1$ non mostra un difetto di crescita ossidativa alla temperatura ottimale di 28°C (dato non mostrato).

Complessivamente i risultati ottenuti indicano un ruolo di Sym1 nel metabolismo respiratorio in condizioni di stress.

All'inizio della ricerca la sperimentazione è stata svolta anche utilizzando il ceppo W303-1B per valutare un'eventuale ceppo-dipendenza del fenotipo osservato. Dal momento che i risultati ottenuti non erano significativamente dissimili da quelli ottenuti con il BY4741, la ricerca è proseguita utilizzando unicamente questo ceppo.

3.1.2 TOLLERANZA ALL'ETANOLO

Il fatto che il difetto di crescita sia molto più evidente in presenza di etanolo rispetto ad altre fonti ossidabili, suggerisce che Sym1 abbia un ruolo protettivo non solo nello stress termico ma anche nello stress da etanolo; o meglio nella combinazione di questi due stress. E' infatti noto che gli effetti combinati dell'etanolo e della temperatura determinano una significativa diminuzione della crescita e della vitalità cellulare (Sherman, 1959; Sherman, 1956; Trotter *et al.*, 2002). Questi effetti sono dovuti probabilmente alle proprietà denaturanti sia del calore sia delle alte concentrazioni di etanolo sulla struttura e sulla stabilità dei lipidi e delle proteine, determinando un effetto sinergico dei due stress.

E' stata quindi analizzata la tolleranza all'etanolo del mutante BY4741 $\Delta sym1$ valutando la crescita del ceppo parentale e $\Delta sym1$ in terreno liquido ricco contenente differenti concentrazioni di etanolo, alla temperatura di 28°C e 37°C (figura 3.3 e tabella 3.1), ed è stata derivata la minima concentrazione inibente (MIC) dell'etanolo.

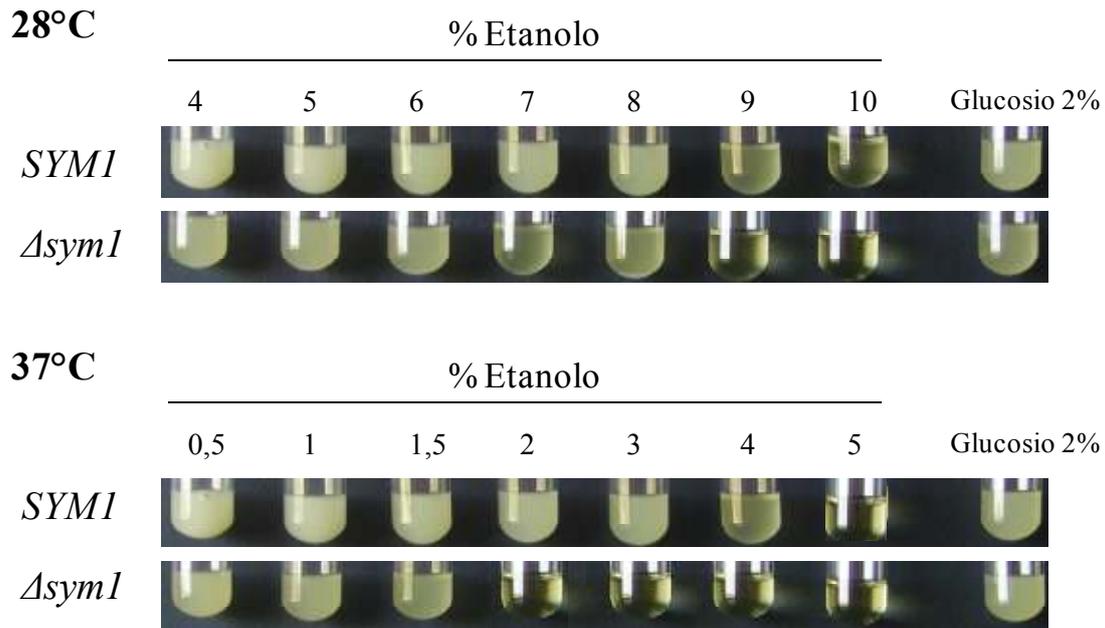


Figura 3.3 Crescita del ceppo BY4741 wild type e $\Delta sym1$ in terreno ricco a differenti concentrazioni di etanolo. La crescita in glucosio 2% è usata come controllo. Le colture sono state fotografate dopo tre giorni di incubazione a 28°C e dopo quattro giorni di incubazione a 37°C.

28°C							
% etanolo	4	5	6	7	8	9	10
BY4741	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 $\Delta sym1$	+	+	+	+	+	-	-
37°C							
[etanolo] %	0.5	1	1.5	2	3	4	5
BY4741	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 $\Delta sym1$	+	+	+	-	-	-	-

Tabella 3.1 Tolleranza all'etanolo del ceppo BY4741 wild type e $\Delta sym1$. La crescita è stata valutata mediante misurazione della densità ottica della coltura cellulare ad una lunghezza d'onda di 600 nm (OD_{600}). $OD_{600} > 1$, +; $OD_{600} < 1$, -. Tempo di crescita: 3 giorni a 28°C; 4 giorni a 37°C.

Il ceppo delete presenta una maggiore sensibilità all'etanolo a entrambe le temperature testate, più evidente a 37°C. La MIC di etanolo è quindi fortemente influenzata dalla temperatura ed è *SYM1/sym1* allele dipendente. Questi risultati suggeriscono che Sym1 abbia un ruolo protettivo da stress quali temperatura ed etanolo.

E' stata inoltre testata la crescita a 37°C in terreno contenente oltre ad etanolo un'altra fonte di carbonio. L'aggiunta di etanolo alle fonti di carbonio ossidabili glicerolo, lattato e acetato peggiora il fenotipo di crescita (figura 3.4). Al contrario, la crescita in presenza di glucosio ed

etanolo non viene compromessa, come già precedentemente dimostrato (Trott and Morano, 2004).

Complessivamente questi risultati suggeriscono che *Sym1* abbia un ruolo protettivo in qualche processo del metabolismo respiratorio ma non del metabolismo fermentativo.

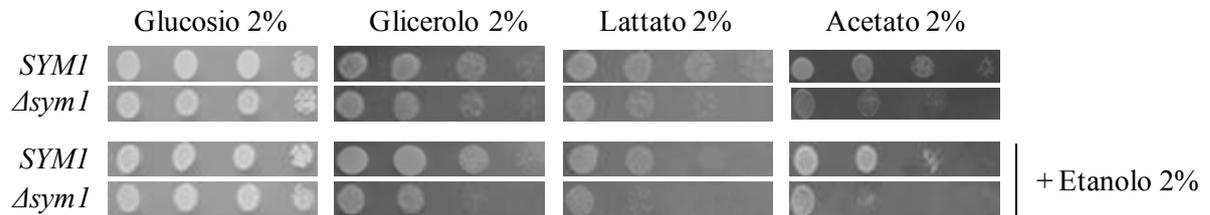


Figura 3.4 Analisi della crescita ossidativa in terreno ricco (YP) nel contesto BY4741 a 37°C su varie fonti di carbonio, in presenza o assenza di etanolo come fonte aggiuntiva di stress (foto dopo 4 giorni di incubazione).

Voglio sottolineare che, rispetto alla figura 3.1, in figura 3.4 il fenotipo del ceppo $\Delta sym1$ è meno evidente, questo perché, per poter apprezzare la diminuzione della crescita in presenza di etanolo, è stato necessario incubare le piastre per un tempo maggiore. Infatti, l'assenza di *SYM1* non determina un completo arresto della crescita in terreno ricco, ma un difetto della crescita ossidativa, più o meno marcato a seconda della fonte di carbonio.

3.1.3 ANALISI DELLA STABILITA' DEL GENOMA MITOCONDRIALE

Nell'uomo mutazioni in MPV17, l'ortologo di *SYM1*, determinano deplezione dell'mtDNA. E' stato quindi analizzato questo fenotipo anche in lievito. Un indice dell'instabilità del genoma mitocondriale è rappresentato dalla percentuale di mutanti *petite* che si generano spontaneamente. Anche il ceppo parentale produce *petite* la cui percentuale dipende dalla condizione sperimentale. L'esperimento è stato condotto in condizioni di doppio stress (37°C; 2% etanolo) in presenza di 2% di glucosio, che permette alle cellule sia respiratorio sufficienti che respiratorio deficienti di dividersi.

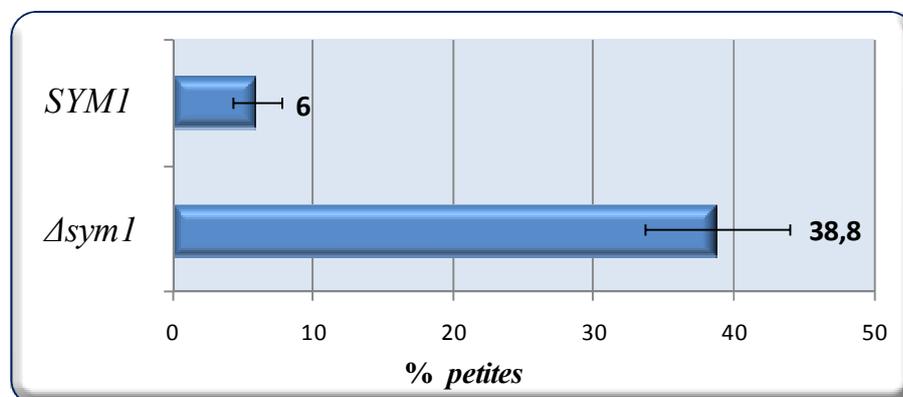


Figura 3.5 Analisi della mutabilità mitocondriale. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 7 generazioni a 37°C in terreno contenete glucosio 2% ed etanolo 2%.

La mancanza di Sym1 determina una forte instabilità del genoma mitocondriale, dimostrata dall'aumento della segregazione dei mutanti *petite*, suggerendo per Sym1 un ruolo nel mantenimento e nella stabilità del mtDNA (figura 3.5). Anche in condizioni di crescita fermentativa Sym1 ha quindi un ruolo importante sulla stabilità del genoma mitocondriale.

Fra le varie strategie a disposizione per valutare la natura dei mutanti *petite*, ρ^- oppure ρ^0 è stata utilizzata quella basata sull'incrocio con mutanti tester *mit*, come brevemente accennato nell'introduzione. Incrociando un ceppo *petite* con un ceppo *mit* si ottiene un diploide che può essere respiratorio sufficiente o deficiente, come riportato in figura 3.6.

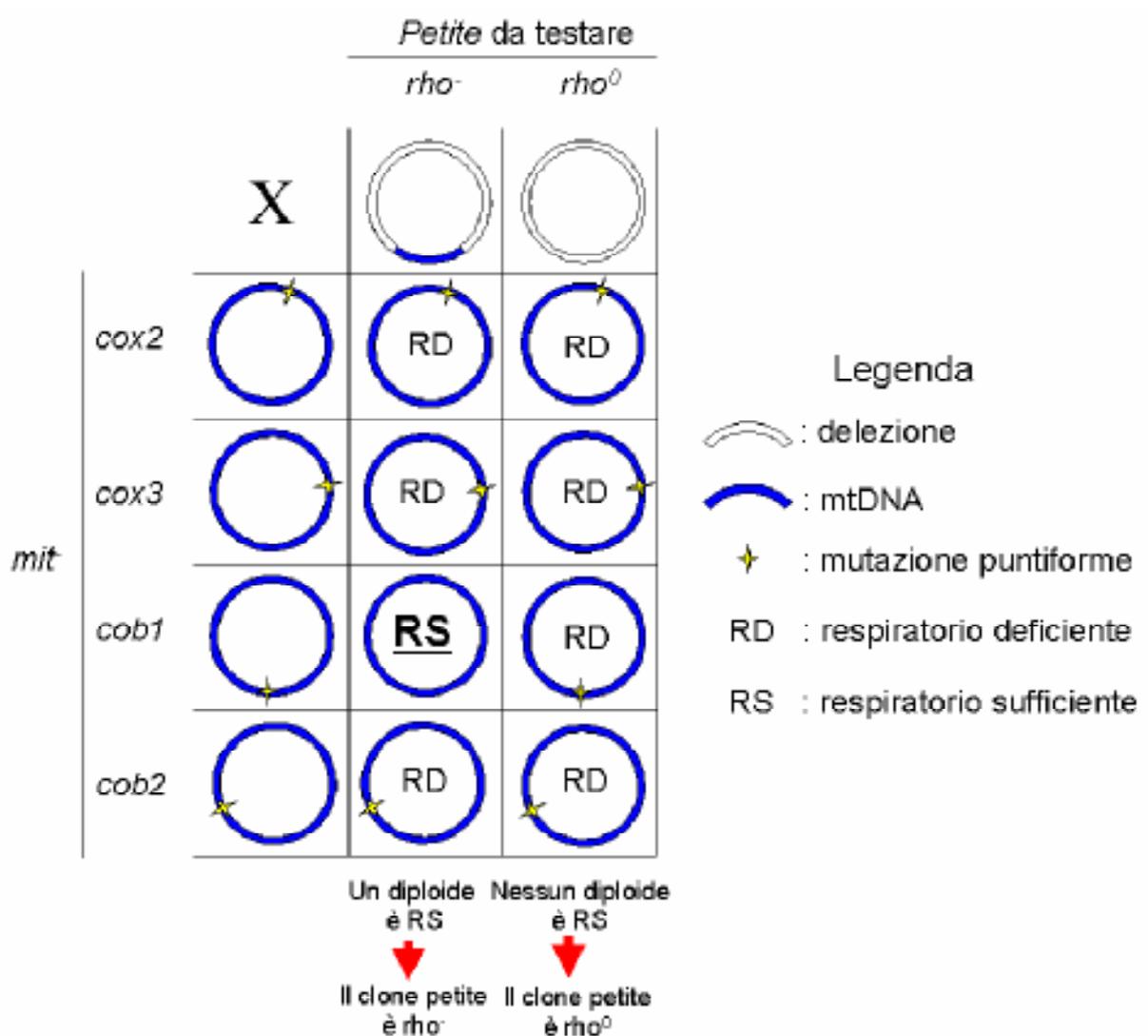


Figura 3.6 Rappresentazione schematica dell'incrocio fra ceppi *petite* (ρ^- o ρ^0) e ceppi tester *mit*.

Se il ceppo *petite* da testare è ρ^- , in seguito a fusione dei mitocondri derivanti dai due ceppi e ricombinazione, molto frequente, nel DNA mitocondriale di lievito, si otterrà un diploide respiratorio sufficiente, purché la regione di mtDNA presente nel ρ^- comprenda la regione che

nel *mit* è mutata. Al contrario, se il ceppo *petite* da testare, è ρ^0 , non avverrà alcuna ricombinazione e il ceppo diploide sarà respiratorio deficiente. Per avere un'elevata confidenza che un ceppo sia effettivamente ρ^- è necessario incrociarlo con diversi *mit*, così da avere un buona garanzia che venga coperto gran parte del DNA mitocondriale.

In particolare, i cloni *petite* precedentemente ottenuti sono stati incrociati con quattro ceppi *mit* di sesso opposto, mutati rispettivamente in due esoni del gene *COB* (chiamati *cob1* e *cob2*), nel gene *COX2* e nel gene *COX3*. Sono stati scelti questi mutanti in quanto queste regioni geniche sono maggiormente mantenute nei ρ^- che si originano spontaneamente (Fukuhara and Wesolowski, 1977; Mathews *et al.*, 1977).

I dati ottenuti, riassunti in tabella 3.2, indicano che in assenza di Sym1, circa il 50% dei mutanti *petite* è privo di mtDNA contro il 25% del ceppo parentale, a dimostrazione di un ruolo di Sym1 nel mantenimento del genoma mitocondriale. In ogni caso nel mutante Δ *sym1* vengono anche osservate delezioni che non sono state invece riscontrate nelle cellule mutate in MPV17.

	Frequenza di ρ^0 tra i <i>petite</i>
BY4741	24,3%
BY4741Δ<i>sym1</i>	52,8%

Tabella 3.2 Percentuale di mutanti privi di mtDNA (ρ^0). Per ogni ceppo sono stati saggiati almeno 300 cloni.

Alcuni cloni sono anche stati osservati al microscopio a fluorescenza dopo colorazione con DAPI per visualizzare la presenza/assenza di mtDNA. Il DAPI si lega infatti in maniera preferenziale al DNA mitocondriale, soprattutto a basse concentrazioni. Mentre i cloni ρ^+ di controllo presentavano cellule contenenti DNA mitocondriale visibile come una serie di puntini alla periferia della cellula, i cloni ρ^0 mostravano un segnale proveniente solo dal nucleo. Con la colorazione DAPI è quindi possibile distinguere tra le cellule che hanno mtDNA, come ρ^+ e ρ^- , da quelle che non ce l'hanno, cioè ρ^0 . Non è invece facile distinguere tra ρ^+ e ρ^- , ma questo è facilmente deducibile dalla capacità di crescere su fonti di carbonio respirabili. In figura 3.7 sono mostrate delle fotografie rappresentative ottenute al microscopio a fluorescenza.

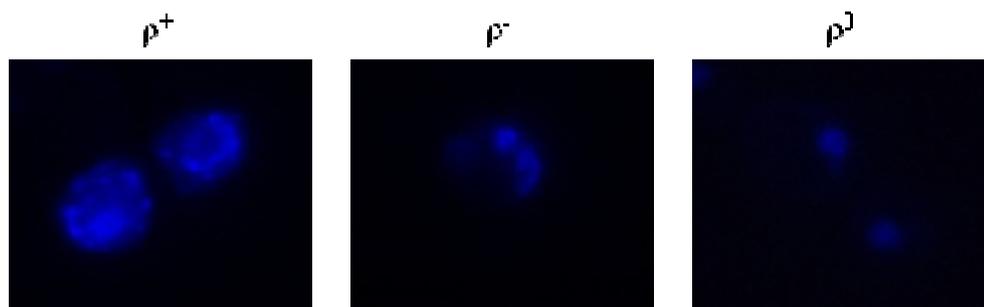


Figura 3.7 Immagini rappresentative ottenute al microscopio a fluorescenza dopo colorazione con DAPI.

3.1.4 INDIPENDENZA DEL FENOTIPO OXPHOS E INSTABILITA' DELL'mtDNA

In lievito il difetto respiratorio (OXPHOS) può essere causato da instabilità dell'mtDNA. È stato quindi analizzato se il difetto di crescita ossidativa fosse conseguente ad un danno al genoma mitocondriale. Il ceppo parentale e il mutante *Δsym1* sono stati fatti crescere a 28°C e poi trasferiti per una notte (13 ore) in terreno contenente etanolo a 37°C, condizione nella quale si ha arresto della crescita. Si è poi proceduto all'analisi dei *petite*, come riportato in figura 3.8. Il mutante *Δsym1* non produce significativamente più *petite* rispetto al ceppo parentale indicando che il difetto di crescita ossidativa osservato non è una conseguenza dell'instabilità dell'mtDNA. I due fenotipi OXPHOS e instabilità del genoma mitocondriale appaiono quindi indipendenti.

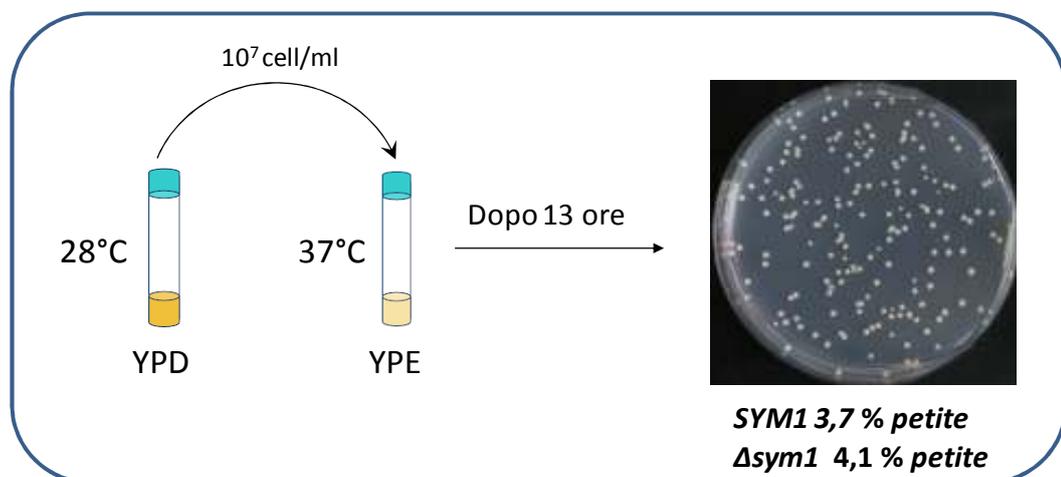


Figura 3.8 Percentuale di *petite* dopo trasferimento in etanolo a 37°C.

3.1.5 MORFOLOGIA MITOCONDRIALE

È stata valutata la morfologia mitocondriale mediante microscopia elettronica presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università La Sapienza di Roma in collaborazione con la Professoressa Mancini.

L'analisi è stata eseguita in due diverse condizioni: a) durante la crescita fermentativa, in 2% di glucosio, condizione in cui il mutante mostra un'elevata mutabilità del mtDNA (37°C; 2% etanolo) e b) in condizione di *shift over-night* in 2% etanolo a 37°C condizione in cui non si osserva invece un aumento di mutabilità del genoma mitocondriale.

L'analisi ultrastrutturale ha evidenziato in entrambi i casi un'alterata morfologia mitocondriale nei ceppi mutati *Δsym1*. Infatti, mentre il ceppo parentale ha mitocondri di forma tubulare, il mutante *Δsym1* presenta mitocondri sferici. Inoltre le *cristae* mitocondriali sono appiattite o assenti e in alcuni mitocondri sono presenti corpi elettrondensi (Figura 3.9). Il fatto che la mancanza delle *cristae* si osservi indipendentemente dallo stato integro o mutato del mtDNA indica che il difetto nella formazione delle *cristae* non è secondario all'assenza di proteine codificate dal genoma mitocondriale.

I dato complessivamente ottenuti suggeriscono per Sym1 un ruolo nel mantenimento della morfologia mitocondriale e in particolare per il mantenimento delle *cristae*.

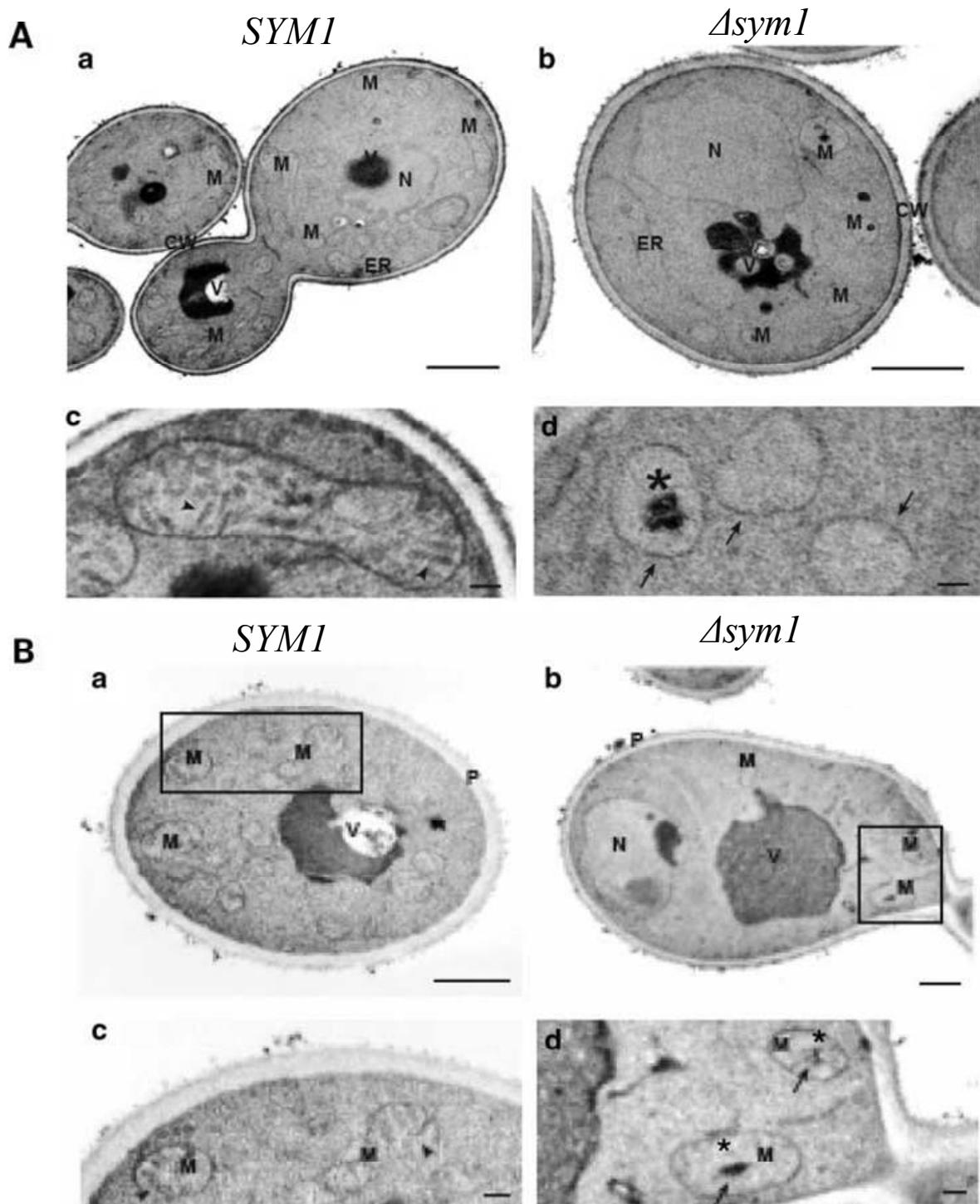


Figura 3.9 Analisi al microscopio elettronico. A) Crescita a 37°C in YPD + etanolo 2%; B) crescita a 28°C in YPD e *shift over-night* (13 ore) a 37°C in YPE. a-b) *Transmission electron micrographs*. N, nucleo; ER, reticolo endoplasmatico; M, mitocondrio; CW, parete cellulare; V, vacuolo. Barra, 1mm. c-d) Morfologia ultrastrutturale di mitocondri rappresentativi. Le punte di freccia indicano le *cristae*, le frecce indicano i mitocondri e l'asterisco indica mitocondri con corpi elettrondensi. Barra, 0.1mm.

3.2 ANALISI TRASCRIZIONALE

E' stata determinata l'espressione del gene *SYM1* in presenza di diverse fonti di carbonio e a diverse temperature.

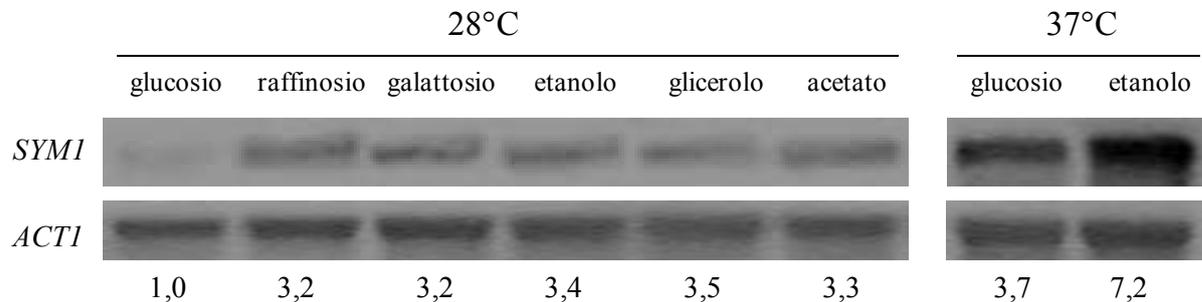


Figura 3.10 Analisi trascrizionale di *SYM1* a 28°C e 37°C in presenza delle fonti di carbonio indicate (addizionate al 2%). I segnali sono stati quantificati con il PhosphorImager e normalizzati. I valori indicano l'intensità del segnale normalizzato a 1.

A 28°C l'espressione di *SYM1* è repressa da glucosio e indotta in tutte le altre fonti di carbonio, sia fermentabili (raffiniosio e galattosio) che ossidabili (etanolo, glicerolo e acetato) (figura 3.10). Questo comportamento è tipico dei geni associati al metabolismo respiratorio. A 37°C, come già osservato (Trott and Morano, 2004) si ha l'espressione di *SYM1* anche in glucosio, in linea con un ruolo nella risposta allo stress termico indipendente dal suo possibile ruolo nel metabolismo ossidativo. Il maggior incremento dell'espressione si osserva a 37°C in etanolo, suggerendo che i due stress, temperatura ed etanolo, abbiano effetti additivi sull'espressione trascrizionale.

E' stata inoltre effettuata un'analisi bioinformatica della regione promotrice di *SYM1* attraverso il sito <http://www.yeasttract.com/>. Sono stati identificati numerosi potenziali siti di legame per fattori di trascrizione (Tabella 3.3), la maggior parte dei quali coinvolti nella risposta a varie tipologie di stress. Alcuni sono già stati documentati in letteratura. E' stata così identificata, 693pb a monte rispetto al codone di inizio, la sequenza GTCAC potenziale sito di legame per Rtg1/Rtg3. Questi attivatori trascrizionali sono coinvolti nella regolazione retrograda (RTG), una via di comunicazione dal mitocondrio al nucleo in condizioni normali e fisiopatologiche che coinvolge diversi fattori che sentono e trasmettono segnali mitocondriali che portano a cambiamenti nell'espressione di geni nucleari che determinano una riconfigurazione del metabolismo per adattare la cellula a difetti dei mitocondri (Liu and Butow, 2006).

Documentato		Predetto	
Gene	Funzione	Gene	Funzione
<i>AZF1</i>	Fattore di trascrizione <i>zinc finger</i> – risposta al glucosio (1)	<i>ARG81</i>	Fattore di trascrizione <i>zinc finger</i> – regolazione dei geni di risposta all'arginina
<i>CAD1</i>	Fattore di trascrizione <i>basic leucine zipper</i> coinvolto nella risposta agli stress (2)	<i>ASH1</i>	Fattore di trascrizione <i>zinc finger</i> – inibitore della trascrizione del <i>locus</i> HO
<i>CIN5</i>	Fattore di trascrizione <i>basic leucine zipper</i> che media la “ <i>pleiotropic drug resistance</i> ” e la tolleranza ai sali (2)	<i>CUP2</i>	Fattore di trascrizione legante rame – risposta alle concentrazioni di rame
<i>DAL82</i>	Regolatore dei geni indotti da allofanato (3)	<i>FKH1/FKH2</i>	Ciclo cellulare; silenziamento genico; allungamento trascrizionale
<i>GIS1</i>	Carenza di nutrienti (4)	<i>MOT3</i>	Fattore di trascrizione <i>zinc finger</i> – Geni coinvolti nell'ipossia/biosintesi dell'ergosterolo
<i>HSF1</i>	Fattore di trascrizione <i>heat shock</i> (5)	<i>PRP1</i>	Fattore di trascrizione <i>zinc finger</i> – Biosintesi dell'uracile
<i>MSN2/MSN4</i>	Risposta agli stress (4) (6)	<i>RTG1/RTG3</i>	Fattore di trascrizione <i>basic helix-loop-helix/zipper</i> – attiva la regolazione retrograda e i <i>pathway</i> TOR
<i>YAP5</i>	Fattore di trascrizione <i>basic leucine zipper</i> (2)	<i>YAP1</i>	Fattore di trascrizione <i>basic leucine zipper</i> richiesto per la tolleranza allo stress ossidativo

Tabella 3.3 Potenziali siti di legame per fattori di trascrizione identificati nel promotore di *SYM1*. Alcuni sono documentati in letteratura. (1) Slattery *et al.*, 2006; (2) Tan *et al.*, 2008; (3) Workman *et al.*, 2006; (4) Chua *et al.*, 2006; (5) Eastmond and Nelson, 2006; (6) Schuller *et al.*, 2004.

Per confermare o smentire la regolazione retrograda di *SYM1* è stata analizzata la sua espressione in cellule wild type ρ^+ e nel suo corrispondente ceppo ρ^0 . E' infatti noto che la mancanza dell'mtDNA induce la via retrograda. Inoltre l'espressione di *SYM1* è stata analizzata in ceppi privi dei fattori trascrizionali necessari per la regolazione retrograda *Artg1* e *Artg3*, resi ρ^0 .

In Figura 3.11 si può vedere che *SYM1* è più espresso in un contesto privo di mtDNA, e che questa maggiore espressione è abolita nei mutanti *Artg1* e *Artg3*, confermando l'esistenza di un controllo retrogrado mediato da tali fattori trascrizionali, come ipotizzato sulla basi dell'analisi bioinformatica condotta precedentemente.

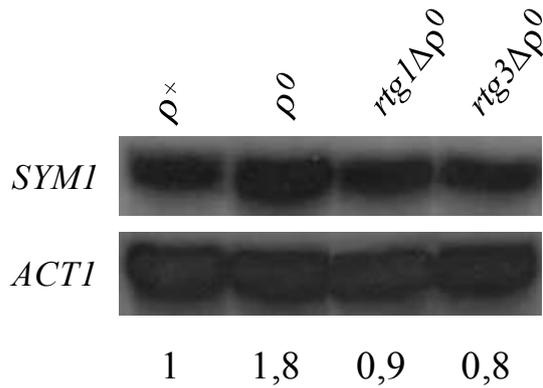


Figura 3.11 Analisi trascrizionale di *SYM1* a 28°C in terreno addizionato di glucosio 0,5% in un contesto ρ^+ , ρ^0 , $\Delta\rho^0$ e $\Delta\rho^0$. I segnali sono stati quantificati con il PhosphorImager e normalizzati. I valori indicano l'intensità del segnale normalizzato a 1.

Qui di seguito sono riportati i controlli effettuati sui mutanti *Artg* della collezione EUROSCARF prima di procedere al loro esame.

I ceppi *Artg1* e *Artg3*, dato che non possono attivare la regolazione retrograda, sono auxotrofi per il glutammato, come ampiamente discusso nell'appendice. In figura 3.12 si può vedere che effettivamente essi sono incapaci di crescere in terreno minimo addizionato dei solo aminoacidi per le autotrofie del ceppo BY4741, mentre riescono a crescere se viene aggiunto anche glutammato.

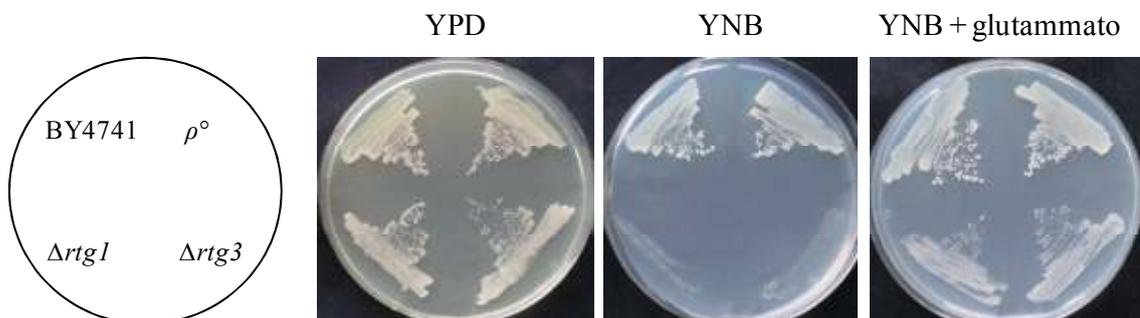


Figura 3.12 Controllo dei ceppi *Artg1* e *Artg3*.

3.3 IDENTIFICAZIONE DI SOPPRESSORI CHIMICI

Durante le prime fasi della caratterizzazione fenotipica è stata fatta una casuale e interessante osservazione. Il fenotipo OXPPOS del mutante *Asym1* mostrava un deciso miglioramento quando le cellule venivano messe in coltura in SC, terreno che contiene una miscela con tutti gli aminoacidi, rispetto a YNB. Per questo motivo, con lo scopo di identificare la molecola/le molecole in grado di migliorare il difetto di crescita, sono stati aggiunti i singoli aminoacidi non essenziali uno a uno al terreno di crescita.

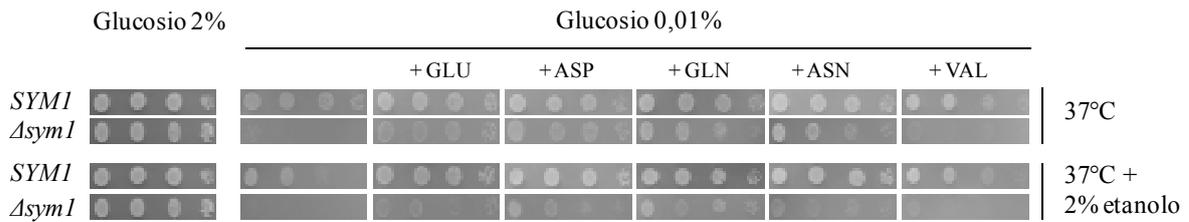


Figura 3.13 *Rescue chimico*. GLU, glutammato; ASP, aspartato; GNL, glutammina; ASN, asparagina; VAL, valina. Gli aminoacidi sono stati aggiunti ad una concentrazione di 1 mM.

L'aggiunta di glutammato, glutammina, aspartato e asparagina sono in grado di migliorare il difetto di crescita ossidativa. Il miglioramento è più evidente in caso di solo stress termico, mentre è lieve in presenza di doppio stress, termico e da etanolo. La valina è riportata come esempio di aminoacido che non ha effetto benefico (figura 3.13).

Il fatto che l'aggiunta di queste sostanze riesca, anche se solo parzialmente, a compensare il difetto di crescita ossidativa del ceppo *Δsym1*, suggerisce che in tale mutante ci sia una produzione difettiva di derivati comuni di questi aminoacidi, α -chetoglutarato e/o ossalacetato, prodotti intermedi del ciclo di Krebs. Il mutante potrebbe quindi essere difettoso nella produzione di intermedi del TCA e quindi in questo caso glutammato, glutammina, aspartato e asparagina potrebbero venire convertiti in intermedi del ciclo del citrato ed entrare nei mitocondri per compensare un difetto del ciclo stesso, o comunque portare ad una diminuzione della richiesta citoplasmatica di α -chetoglutarato. Un'altra possibile spiegazione è che nel mutante ci sia un difetto di trasporto di tali sostanze dal mitocondrio al citosol. Va infatti ricordato che l' α -chetoglutarato prodotto nel mitocondrio serve, oltre che per continuare il ciclo del citrato, anche per molti processi biosintetici. In particolare esso viene trasportato nel citoplasma dove serve per la sintesi *de novo* del glutammato, che a sua volta è precursore per la biosintesi dell'arginina, della prolina e della glutammina. Quest'ultima è donatrice di gruppi NH_2 (attraverso la sua catena laterale) nella via di biosintesi di numerosi composti, tra cui anche i nucleotidi. Inoltre il gruppo α -amminico della maggior parte degli aminoacidi proviene dal glutammato per transaminazione. L' α -chetoglutarato prodotto nel ciclo di Krebs è quindi necessario per la biosintesi di un'ampia gamma di composti tra cui gli aminoacidi e i nucleotidi (figura 3.14). In modo analogo anche l'ossalacetato serve per la biosintesi di aminoacidi, in particolare mediante transaminazione si produce aspartato.

Quindi è chiaro che un difetto nel trasporto di queste sostanze dal mitocondrio, dove sono prodotte dal ciclo di Krebs, al citosol, dove sono utilizzate per processi biosintetici, è deleterio per la cellula e potrebbe essere compensato dall'aggiunta di glutammato al terreno di crescita. L'interpretazione dei dati ottenuti è complicata dal fatto che glutammato ed α -chetoglutarato fanno parte di un intricato *network* omeostatico e una modificazione delle loro concentrazioni cellulari scatena all'interno della cellula risposte fisiologiche complesse, che influenzano inevitabilmente più vie metaboliche.

Complessivamente quindi, questi risultati suggeriscono che nel mutante *Δsym1* ci sia un difetto nel metabolismo degli intermedi del ciclo di Krebs, ma non chiarisce se sia a livello di sintesi o di trasporto. Sono necessarie altre analisi per distinguere qual'è tra le due ipotesi corretta.

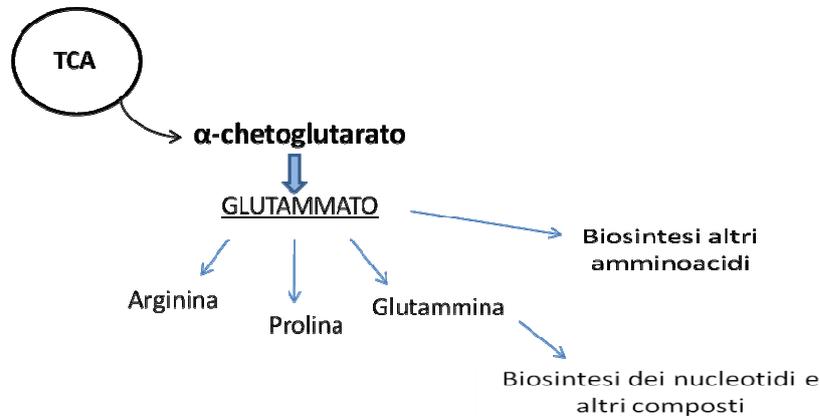


Figura 3.14 L'α-chetoglutarato prodotto nel ciclo di Krebs, essendo il precursore del glutammato, è coinvolto direttamente o indirettamente nella biosintesi di un'ampia gamma di composti.

E' stato inoltre analizzato se l'aggiunta di glutammato, glutamina, aspartato e asparagina fosse in grado di ridurre l'elevata l'instabilità del genoma mitocondriale caratteristica del mutante *Δsym1*.

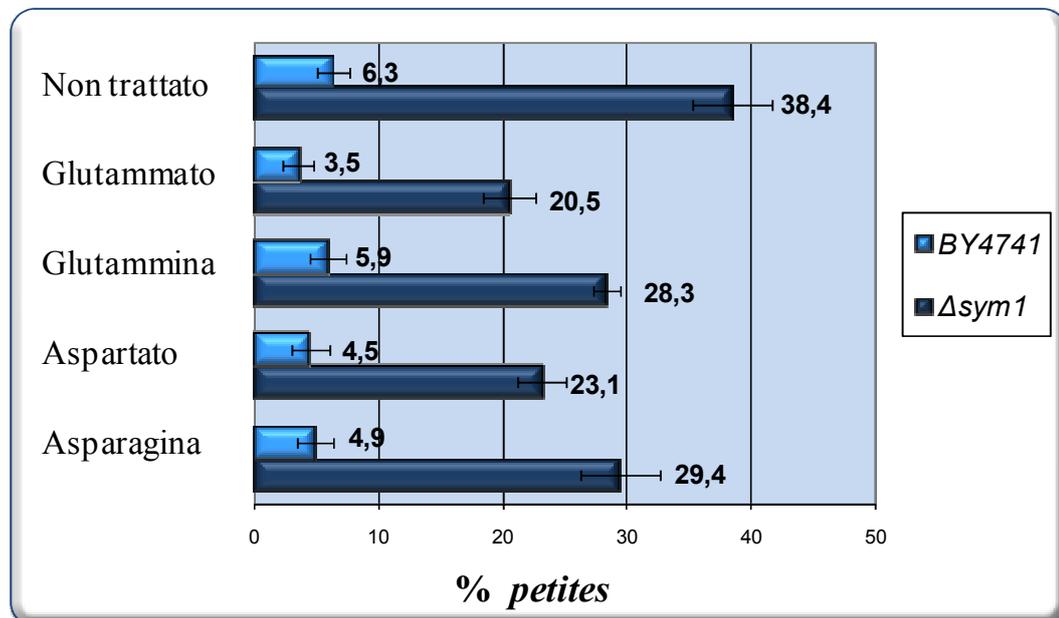


Figura 3.15 Analisi della mutabilità mitocondriale. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 7 generazioni a 37°C in terreno contenente glucosio 2% ed etanolo 2% e l'amminoacido da testare (concentrazione 1 mM).

L'aggiunta di questi amminoacidi determina una parziale riduzione (tra il 24 e il 47%) dell'instabilità dell'mtDNA del mutante (figura 3.15). Questo effetto benefico potrebbe essere legato, come già dimostrato per il glutammato, al rallentamento del metabolismo mitocondriale che oggi si sa essere connesso con la replicazione dell'mtDNA (Liu and Butow, 2006). A supporto di un meccanismo non *SYM1*-specifico, si può osservare che l'aggiunta di queste molecole porta ad un beneficio simile anche al ceppo parentale.

Pur non essendo chiaro il motivo del miglioramento è comunque una interessante osservazione considerando che l'instabilità del mtDNA porta ad una totale incapacità respiratoria. L'analisi dell'effetto di queste molecole andrebbe approfondito soprattutto in relazione ad un loro possibile utilizzo "terapeutico" nei pazienti con mutazioni in MPV17 e forse, data l'indipendenza da *SYM1*, anche nei pazienti affetti in generale da sindromi da deplezione del DNA mitocondriale.

Sulla base dell'ipotesi di un difetto del mutante $\Delta sym1$ nel metabolismo del ciclo di Krebs (sintesi e/o trasporto), abbiamo valutato l'effetto che l'aggiunta di α -chetoglutarato e citrato, due intermedi chiave del ciclo, ha sulla crescita ossidativa a 37°C. In accordo con questa ipotesi, l'aggiunta al terreno di crescita di queste molecole ad una concentrazione di 0,25 mM determina un parziale recupero della crescita del ceppo $\Delta sym1$ in terreno contenente glucosio 0,01% alla temperatura di 37°C (figura 3.16), mentre in condizione di doppio stress (etanolo e temperatura) non si osserva alcun miglioramento.

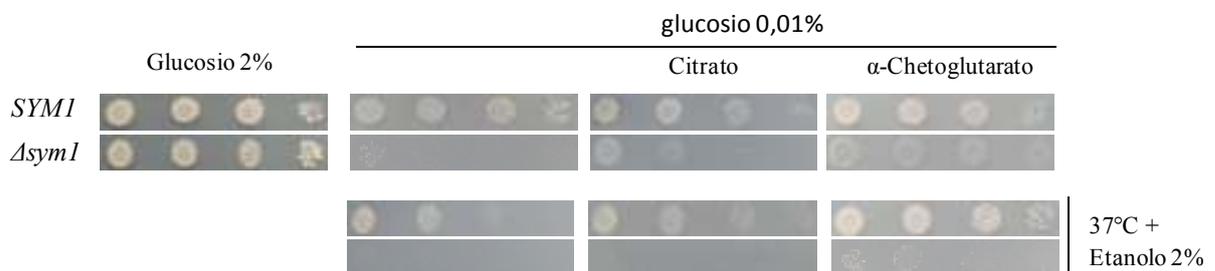


Figura 3.16 Rescue metabolico in terreno minimo minerale (YNB) a 37°C. Citrato e α -chetoglutarato sono stati aggiunti ad una concentrazione di 0,25 mM.

3.3.1 ANALISI DEL DOPPIO MUTANTE $\Delta sym1 \Delta sml1$

Una delle ipotesi suggerite precedentemente è che nel mutante $\Delta sym1$ ci sia una carenza di α -chetoglutarato citoplasmatico che porterebbe ad una diminuzione della concentrazione del glutammato cellulare e di conseguenza della glutammina, e ciò potrebbe influire negativamente sulla biosintesi *de novo* delle purine e delle pirimidine, portando a una diminuzione del *pool* nucleotidico. L'alterato metabolismo dei nucleotidi potrebbe giustificare l'instabilità dell'mtDNA osservata nel ceppo $\Delta sym1$, anche se l'ipotesi sembra in contrasto con altri dati: l'indipendenza del fenotipo OXPHOS e dell'instabilità dell'mtDNA.

Le ribonucleotide reduttasi, catalizzano, attraverso un processo di tipo radicalico, la riduzione del gruppo 2'-OH in gruppo 2'-H nei ribonucleosidi-difosfato o nei ribonucleosidi-trifosfato, che così vengono ridotti, rispettivamente, a dNDP o dNTP. La reazione catalizzata dalla ribonucleotide reduttasi è pertanto fondamentale per la sintesi e la replicazione del DNA (Nordlund and Reichard, 2006). Il gene *RNR1* codifica per la subunità maggiore della ribonucleotide reduttasi che catalizza lo *step* limitante nella sintesi dei dNTP. La sintesi dei dNTP deve essere finemente regolata e poiché lo *step* limitante è la reazione reduttasica, la regolazione avviene a livello di *RNR1*. L'attività di Rnr1 è regolata da Sml1, una proteina che si lega a Rnr1, inibendone l'attività (Zhao *et al.* 2000; Chabes *et al.*, 1999; Chabes *et al.*, 2003). E' stato dimostrato che la delezione di *SML1* in lievito porta ad un aumento del dNTP *pool* (Nordlund and Reichard, 2006; Zhao *et al.*, 1998).

Per vedere se l'aumento del *pool* nucleotidico migliorasse il difetto "instabilità dell'mtDNA" è stato costruito e analizzato un doppio mutante $\Delta sym1 \Delta sml1$.

Per ottenere il doppio mutante $\Delta sym1 \Delta sml1$, sono stati incrociati i ceppi di sesso opposto BY4742 $\Delta sym1$ e BY4741 $\Delta sml1$ della collezione EUROSCARF, deleti mediante sostituzione del gene wild type con la cassetta di delezione Kan^R. In seguito a sporificazione e analisi delle tetradi è stata recuperata la spora $\Delta sym1 \Delta sml1$. E' infatti bastato identificare una tetrade non parentale in cui 2 spore erano in grado di crescere in presenza di geneticina, resistenza conferita da Kan^R, e due no (2+, 2-) (figura 3.17).

BY4742 $\Delta sym1$	x	BY4741 $\Delta sml1$		
Kan ^R		Kan ^R		
<u>PARENTALE</u>		<u>NON PARENTALE</u>		<u>TETRATIPO</u>
<i>sym1 SML1</i> +		<i>SYM1 SML1</i> -		<i>sym1 SML1</i> +
<i>sym1 SML1</i> +		<i>SYM1 SML1</i> -		<i>SYM1 sml1</i> +
<i>SYM1 sml1</i> +		<i>sym1 sml1</i> +		<i>SYM1 SML1</i> -
<i>SYM1 sml1</i> +		<i>sym1 sml1</i> +		<i>sym1 sml1</i> +

Figura 3.17 Analisi delle tetradi. E' indicato il genotipo delle tetradi parentali, non parentali e tetratipo e il fenotipo di crescita in presenza di geneticina (+ cresce, - non cresce).

L'analisi dei *petite* ha mostrato che l'aumento del *pool* nucleotidico conseguente alla delezione del gene *SML1* non portava alcun beneficio relativamente alla stabilità del mtDNA nel ceppo $\Delta sym1$, suggerendo che l'instabilità del genoma mitocondriale non è da ascrivere a difetti nel *pool* di dNTP (figura 3.18).

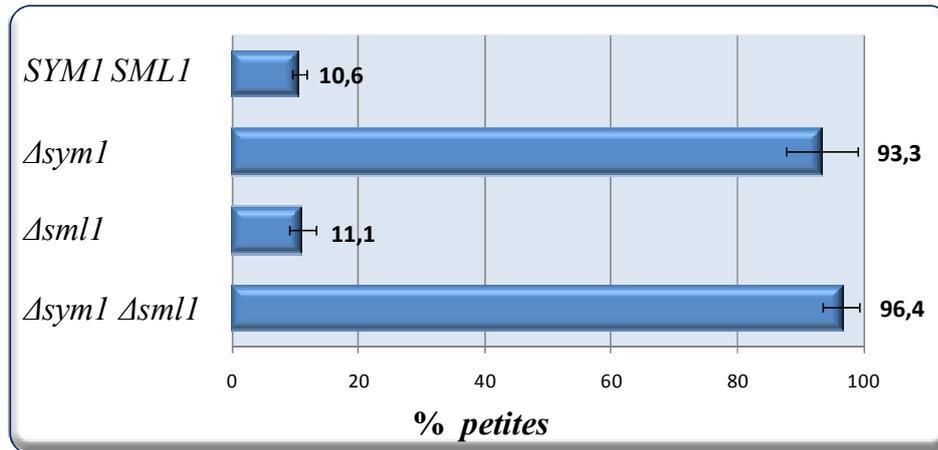


Figura 3.18 Analisi della mutabilità mitocondriale dei ceppi wild type (*SYM1 SML1*), Δ *sym1*, Δ *sml1* e Δ *sym1* Δ *sml1*. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno contenete glucosio 2% ed etanolo 2%.

3.3.2 SAGGI ENZIMATICI DELLA GLUTAMMATO DEIDROGENASI

E' stato inoltre valutato se la mutazione Δ *sym1* alteri le attività enzimatiche della glutammato deidrogenasi (GDH). E' infatti noto che un eventuale difetto nella produzione nel mitocondrio di α -chetoglutarato o nel suo trasporto dal mitocondrio al citoplasma porta a variazioni del metabolismo del glutammato, in particolare a un aumento della NADP-gluttammato deidrogenasi citoplasmatica codificata dal gene *GDHI*, necessaria per la sintesi del glutammato e regolata dal livello di chetoglutarato.

E' stata quindi misurata tale attività enzimatica nel mutante Δ *sym1* cresciuto a 28°C in glucosio 2% e trasferito a 37°C per una notte in presenza di glucosio 0,6% ed etanolo 2%, condizione nella quale mutante e parentale presentano livelli simili di mutabilità del DNA mitocondriale (~ 3%).

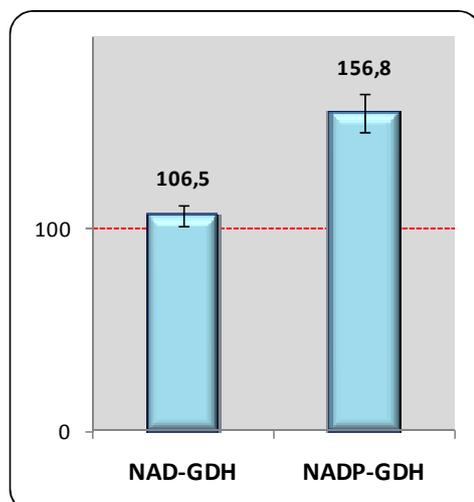


Figura 3.19 Attività glutammico deidrogenasica. E' riportata la percentuale di attività del ceppo Δ *sym1* rispetto al wild type.

I risultati riportati in figura 3.19 indicano che, mentre l'attività glutammato deidrogenasica NADP-dipendente aumenta di circa 1,5 volte nel mutante rispetto al parentale, l'attività della GDH NAD-dipendente, l'enzima catabolico, non subisce alcun cambiamento. L'aumento dell'attività anabolica è compatibile con una diminuzione della quantità di α -chetoglutarato, supportando l'ipotesi di un difetto di produzione/trasporto di intermedi del ciclo di Krebs. L'aumento dell'attività enzimatica NADP-GDH è stata valutata anche attraverso uno zymogramma, saggio enzimatico che si effettua direttamente su gel di poliacrilammide in condizioni native (figura 3.20).

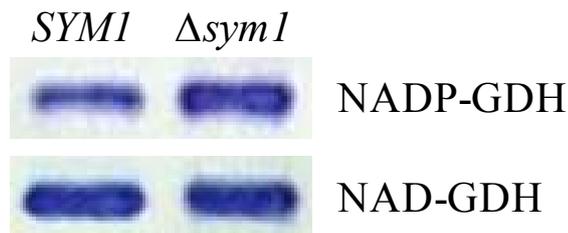


Figura 3.20 Zymogramma delle attività glutammato deidrogenasiche.

3.4 IDENTIFICAZIONE DI SOPPRESSORI MULTICOPIA

Un metodo molto utilizzato in genetica per studiare la funzione di un gene è identificare soppressori multicopia, cioè geni la cui over-espressione è in grado di sopprimere un fenotipo negativo. La scoperta di soppressori genetici è particolarmente utile perché può rivelare connessioni imprevedibili tra *pathway* cellulari.

Nello specifico sono stati cercati soppressori del fenotipo OXPHOS, cioè che fossero in grado di ripristinare la crescita su etanolo a 37°C. A questo scopo è stato trasformato il ceppo $\Delta sym1$ con una libreria genomica e sono stati identificati i cloni in grado di crescere in YPE a 37°C. Sono stati innanzitutto recuperati questi cloni per riconfermare il fenotipo. Successivamente è stata fatta un'analisi di perdita plasmidica per correlare la perdita della capacità di crescita con la perdita del plasmide. Sono stati così ottenuti 4 cloni da caratterizzare. Per escludere i cloni contenenti il gene *SYM1* stesso è stata effettuata un'analisi PCR sui plasmidi estratti dai cloni crescenti su etanolo a 37°C utilizzando due primer in grado di riconoscere sequenze del gene *SYM1*. In questo modo si ottiene amplificazione solo se il plasmide utilizzato come template contiene *SYM1*. Dalla figura 3.21 si può vedere che si è ottenuta amplificazione in 3 casi su 4, indicando quindi che questi tre plasmidi contenevano il gene *SYM1*, e quindi sono stati esclusi da successive analisi. L'altro clone è stato sequenziato alle estremità per determinare quali geni contenesse il frammento e quindi per poter identificare il soppressore.

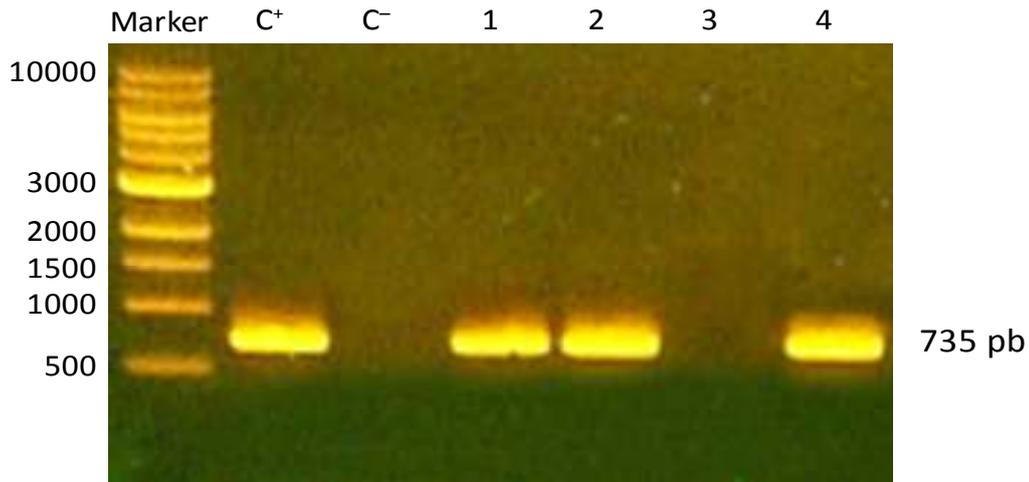


Figura 3.21. Gel ottenuto per elettroforesi dei prodotti di PCR ottenuti mediante amplificazione con i primer SYMseq1 e SYMseq2. C⁺: controllo positivo; C⁻: controllo negativo.

Dall'analisi di sequenza è risultato che l'inserto conteneva tre geni: *BRR1*, che codifica per una proteina dello spliceosoma; *YMC1*, che codifica per una proteina *carrier* mitocondriale; e *ARO7*, che codifica per la corismato mutasi coinvolta nella biosintesi degli aminoacidi fenilalanina e tirosina (figura 3.22).

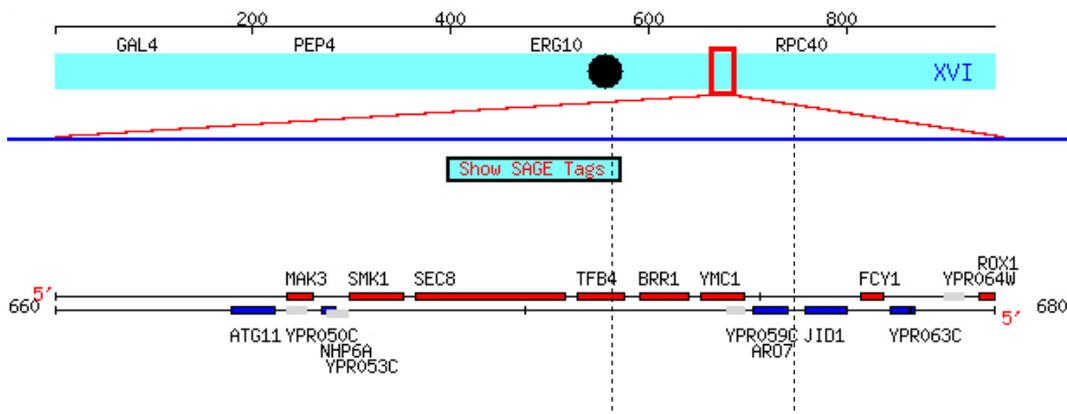


Figura 3.22 L'inserto sequenziato, definito dalle righe tratteggiate, contiene tre geni: *BRR1*, *YMC1* e *ARO7*.

Dal momento che *YMC1* è l'unico gene che codifica per una proteina mitocondriale l'attenzione si è concentrata innanzitutto su questo gene.

3.4.1 ANALISI DEL SOPPRESSORE *YMC1*

YMC1 è stato amplificato (con le sue regioni regolatrici) attraverso PCR e clonato in un vettore multicopia (pFL44) per verificare se fosse la sua overespressione la responsabile della soppressione del fenotipo. In parallelo è stato clonato anche in un plasmide monocopia

(pFL38) per valutare se fosse necessaria la sua overespressione oppure bastasse anche la sola introduzione in singola copia.

Il ceppo delecto $\Delta sym1$ è stato trasformato con i costrutti contenenti *YMC1*, sia monocopia che multicopia. Inoltre è stato trasformato anche con il plasmide vuoto, come controllo negativo, e con il plasmide recante il gene *SYM1*, come controllo positivo. Su questi ceppi è stata effettuata un'analisi di crescita a 37°C su terreno contenente etanolo.

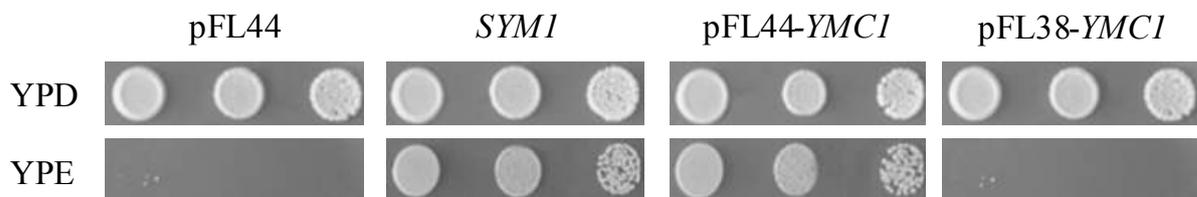


Figura 3.23 Crescita ossidativa a 37°C del ceppo $\Delta sym1$ trasformato con il plasmide vuoto, con il plasmide recante il gene *SYM1* e con i plasmidi mono- e multi-copia contenenti *YMC1*.

Da questa analisi (figura 3.23) è stato possibile concludere che: i) *YMC1* era effettivamente il gene responsabile della soppressione; ii) *YMC1* è in grado di ripristinare la crescita ossidativa solo quando over-espresso.

Ymc1 è una proteina *carrier* localizzata nella membrana mitocondriale interna coinvolta nel trasporto di metaboliti tra perossisomi e mitocondri, con un probabile ruolo nel trasporto di intermedi del ciclo di Krebs (Trotter *et al.*, 2005).

Dal punto di vista strutturale, *Ymc1* è omologo al traslocatore di carnitina/acetilcarnitina, codificato dal gene *CRC1*; mentre dal punto di vista funzionale è correlato ad altri trasportatori localizzati nella membrana mitocondriale interna: *Ymc2*, *Odc1*, *Odc2*. Queste quattro proteine trasportatrici sono necessarie per l'utilizzo di acidi grassi come fonti di carbonio, e quindi sono importanti per coordinare la circolazione di metaboliti tra perossisomi e mitocondri. In lievito, infatti, l'utilizzo degli acidi grassi prevede due fasi: la prima avviene nei perossisomi, dove questi substrati vengono parzialmente degradati, mentre la seconda avviene nei mitocondri, dove viene completata l'ossidazione e viene prodotto ATP.

Quindi, in base alle somiglianze di struttura o funzione, è stata testata l'overespressione anche di questi ulteriori quattro geni, per scoprire se fossero in grado o meno di sopprimere il fenotipo OXPHOS del mutante $\Delta sym1$.

3.4.2 ANALISI DELL'OVER-ESPRESSIONE DI *YMC2*, *ODC1*, *ODC2*, *CRC1*

I geni di interesse sono stati amplificati (con le proprie regioni regolatrici) tramite PCR e clonati nel vettore multicopia pFL44. Successivamente il ceppo delecto $\Delta sym1$ è stato trasformato con questi costrutti e, analogamente a quanto visto per *YMC1*, è stata condotta un'analisi di crescita a 37°C su terreno contenente etanolo.

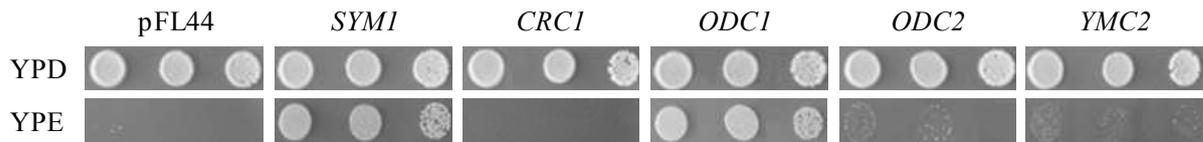


Figura 3.24 Crescita ossidativa del ceppo $\Delta sym1$ recante plasmidi multicopia pFL44 contenenti i vari geni da testare.

Per quanto riguarda *CRC1*, la sua overespressione non porta ad alcun miglioramento del fenotipo OXPHOS del mutante $\Delta sym1$. Al contrario, l'introduzione nel delecto $\Delta sym1$ del plasmide multicopia recante *ODC1* ripristina completamente la crescita, comportandosi quindi in modo analogo a *YMC1*. *ODC2* e *YMC2* invece determinano solo un lievissimo miglioramento della crescita su etanolo.

ODC1 codifica per un trasportatore di oxodicarbossilati tra cui l' α -chetoglutarato e l' α -chetoadipato e altri intermedi del ciclo di Krebs come il citrato. Odc1 è un antiporto, cioè scambia molecole attraverso la membrana mitocondriale interna.

3.4.3 ANALISI DELLA MUTABILITA' MITOCONDRIALE

E' stato valutato anche l'effetto dell'overespressione di questi soppressori sul secondo importante fenotipo del mutante privo di *SYM1*: l'instabilità del genoma mitocondriale.

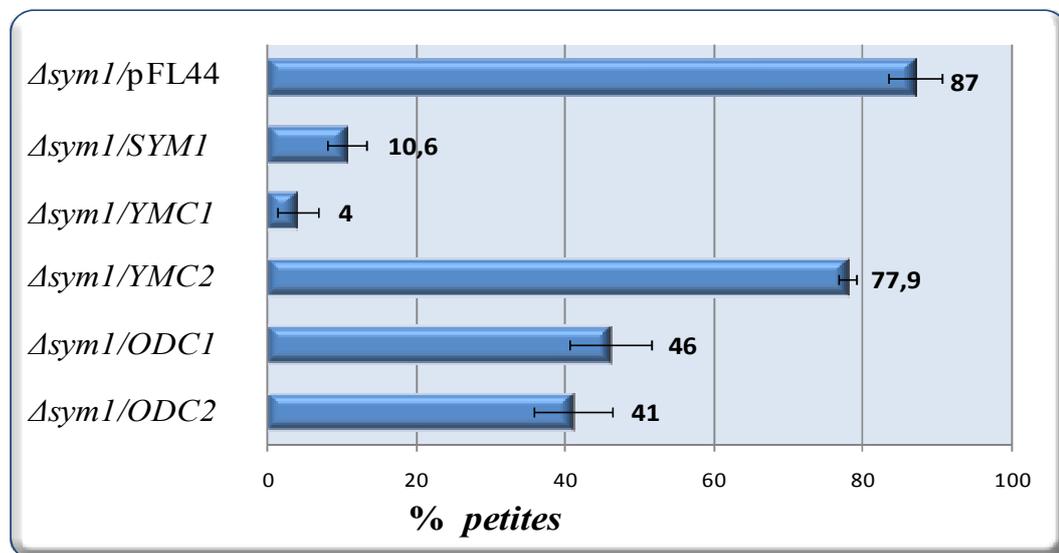


Figura 3.25 Analisi della mutabilità mitocondriale. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno contenete glucosio 2% ed etanolo 2%.

L'analisi dei *petite* ha dato risultati diversi per i vari geni: *YMC1* è in grado, oltre che di compensare il difetto OXPHOS anche di ripristinare la stabilità del genoma mitocondriale; *ODC1*, pur avendo lo stesso effetto di *YMC1* sul difetto di crescita, migliora solo parzialmente l'instabilità dell'mtDNA; *ODC2*, che ha effetto quasi nullo sulla crescita ossidativa riduce

parzialmente la percentuale delle colonie *petite*; e infine *YMC2*, non ha praticamente alcun effetto benefico su nessuno dei due fenotipi del mutante *Δsym1*.

Questi dati sottolineano nuovamente che i due fenotipi (assenza di crescita su fonti respirabili e instabilità del genoma mitocondriale) sono non correlati tra loro e non sono l'uno la conseguenza dell'altro.

3.4.4 COSTRUZIONE E ANALISI DEI DOPPI MUTANTI *Δsym1 Δymc1* E *Δsym1 Δodc1*

Sono stati identificati due soppressori multicopia del fenotipo OXPHOS: *Ymc1* e *Odc1*. Ma qual è il meccanismo di soppressione? *Ymc1* e *Odc1* potrebbero appartenere allo stesso *pathway* di *Sym1*, ad esempio potrebbero essere dei bersagli di *Sym1*, e in questo caso l'overespressione potrebbe consentire ai due *carrier* di funzionare anche in assenza di *Sym1*. Oppure la loro overespressione potrebbe creare un *bypass*, cioè compensare per altra via dei difetti causati dalla mancanza di *Sym1*. Questo secondo modo è il più comune quando si identificano soppressori di mutanti nulli, come in questo caso.

Per capire se *Sym1* faccia parte dello stesso *pathway* metabolico di *YMC1* o *ODC1* è necessario costruire ed analizzare il fenotipo dei doppi mutanti. Un doppio mutante con fenotipo simile a quello del singolo mutante *Δsym1* è indicativo dell'appartenenza allo stesso *pathway*, viceversa una doppia mutazione con fenotipo più grave è indicativo di appartenenza a *pathway* diversi.

3.4.4.1 COSTRUZIONE DEI DOPPI MUTANTI *Δsym1 Δymc1* E *Δsym1 Δodc1*

Il primo doppio mutante costruito è stato *Δsym1 Δymc1*. A tale scopo è stato distrutto il gene *SYMI* nel ceppo *Δymc1*, tramite inserzione della cassetta di resistenza all'igromicina. La cassetta di delezione è stata ottenuta tramite amplificazione PCR utilizzando come template un plasmide contenente il gene *HPH* (che codifica per l'igromicina fosfatasi) che conferisce resistenza all'igromicina (Hyg^{R}) e come primer SYM1HYGF e SYM1HYGR che hanno estremità complementari alle regioni fiancheggianti il gene *SYMI* (figura 3.26).

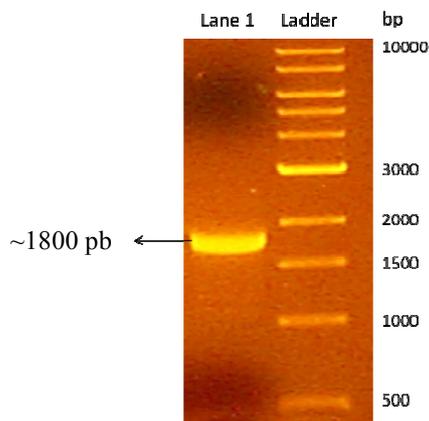


Figura 3.26 Amplificazione mediante PCR della cassetta di delezione Hyg^{R} .

Il costrutto così ottenuto è stato inserito tramite trasformazione nel ceppo delecto $\Delta ymc1$ e sono stati selezionati i trasformanti in grado di crescere in presenza dell'antibiotico igromicina. In questi cloni la cassetta di delezione si è sicuramente integrata, ma non necessariamente al locus desiderato. Infatti, nonostante l'elevata frequenza di ricombinazione omologa propria di *S. cerevisiae*, a volte si verifica ricombinazione non omologa e così la cassetta si inserisce in un locus casuale. Inoltre, dato che la distruzione deve avvenire nel ceppo $\Delta ymc1$ in cui *YMC1* è stato precedentemente delecto con la cassetta di resistenza per la geneticina che possiede le medesime sequenze regolatrici della cassetta di resistenza per l'igromicina, è anche possibile che l'integrazione avvenga al locus $ymc1::Kan^R$, con conseguente perdita della cassetta Kan^R che verrebbe sostituita dalla cassetta Hyg^R (figura 3.27). Per escludere dall'analisi questi cloni, è sufficiente controllare la resistenza alla geneticina, infatti, se l'integrazione è avvenuta al locus $ymc1::Kan^R$, i cloni saranno Hyg^R e Kan^S .

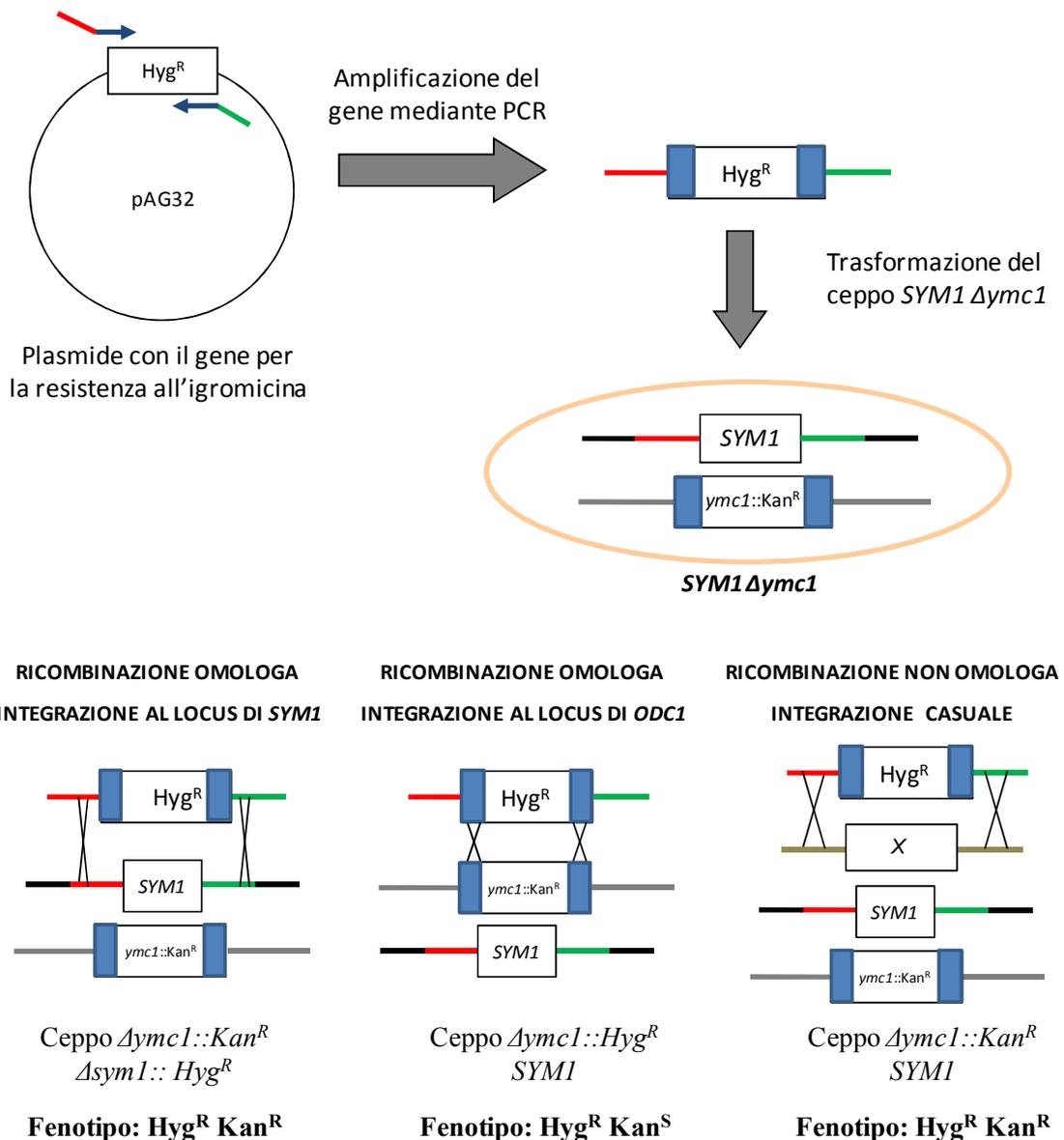


Figura 3.27 Schema della distruzione di *SYM1* nel contesto $ymc1::Kan^R$ e della selezione.

Sui cloni Hyg^R e Kan^R è stato necessario effettuare un'analisi tramite PCR, direttamente sulle colonie di lievito, per controllare che fosse avvenuta la ricombinazione al locus *SYM1*. Per questa analisi sono state utilizzate due strategie. Nel primo caso sono stati utilizzati due primer esterni al gene *SYM1*, *SYMseq1* e *SYMseq2*, e l'identificazione dei cloni corretti si è basata sull'analisi della taglia molecolare dell'amplificato; infatti, il gene Hyg^R è più grande di *SYM1*. Quindi, se la cassetta si è integrata ad un locus casuale si ottiene un amplificato di circa 735pb che corrisponde a *SYM1* wild type; mentre se l'integrazione è avvenuta correttamente si ottiene un amplificato di 1864 pb (Figura 3.28 e 3.29A). Per ulteriore verifica è stato utilizzato un primer *K2* interno al gene Hyg^R e uno (*SYM1est*) esterno a *SYM1*. In questo caso si avrà amplificazione solo ed elusivamente se l'integrazione è avvenuta al locus desiderato e l'amplicone avrà dimensione di 900 pb (Figura 3.28 e 3.29B).

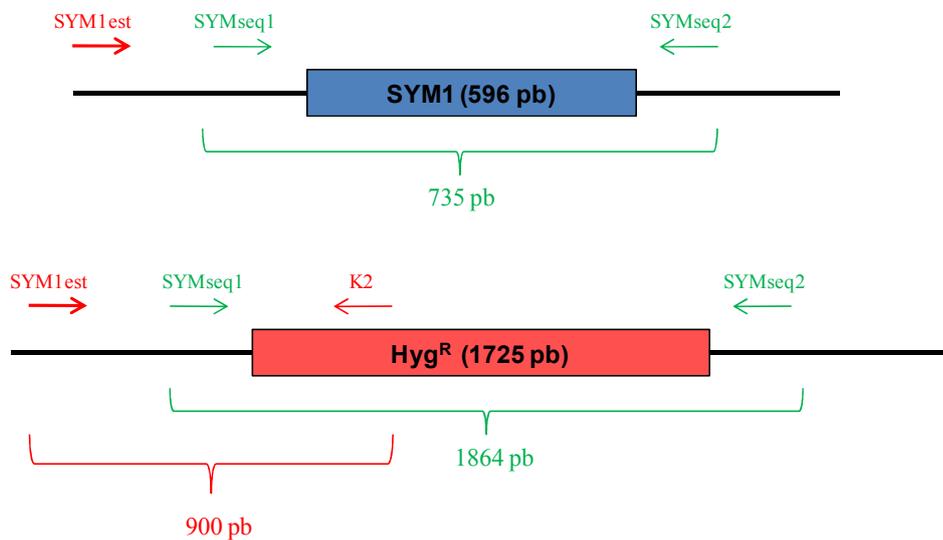


Figura 3.28 Posizione dei primers utilizzati per le PCR di controllo.

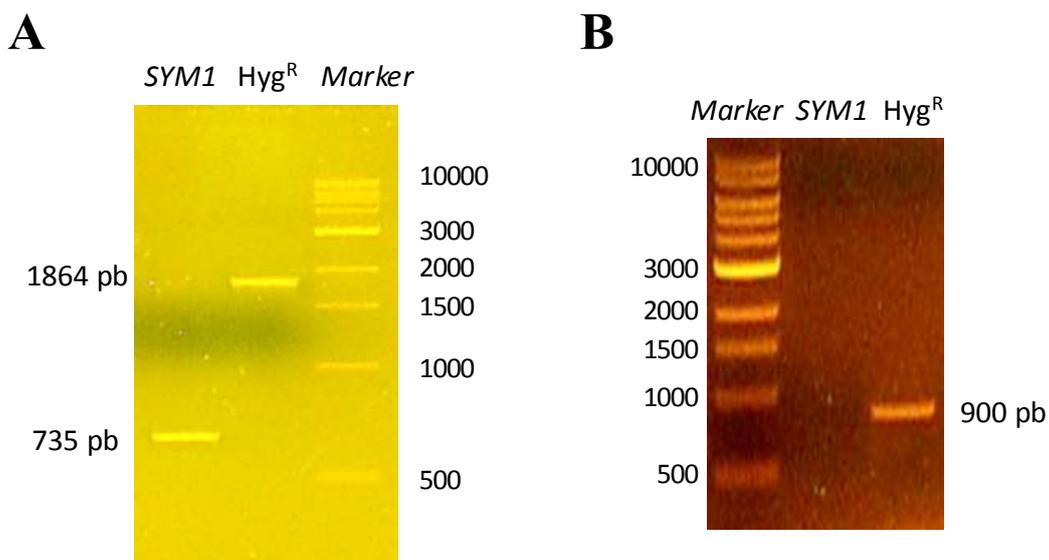


Figura 3.29 Gel elettroforesi dei prodotti di PCR ottenuti con i primer *SYMseq1* e *SYMseq2* in A e con i primer *K2* e *SYM1est* in B.

Per ottenere il doppio mutante $\Delta sym1 \Delta odc1$ la strategia seguita è stata leggermente diversa. Come nel caso precedente è stato distrutto il gene *SYM1* nel ceppo $\Delta odc1$ tramite inserzione della cassetta di resistenza all'igromicina, ma, per minimizzare l'integrazione al locus $odc1::Kan^R$, è stata utilizzata una cassetta di distruzione con le ali più lunghe. Per ottenere tale cassetta, l'amplificazione è avvenuta utilizzando come template il DNA genomico del doppio delecto $\Delta sym1 \Delta ymc1$ appena ottenuto e come primer SYM1up e SYM1low che si appaiano 530 pb a monte e 660 pb a valle del gene *SYM1* (figura 3.30).

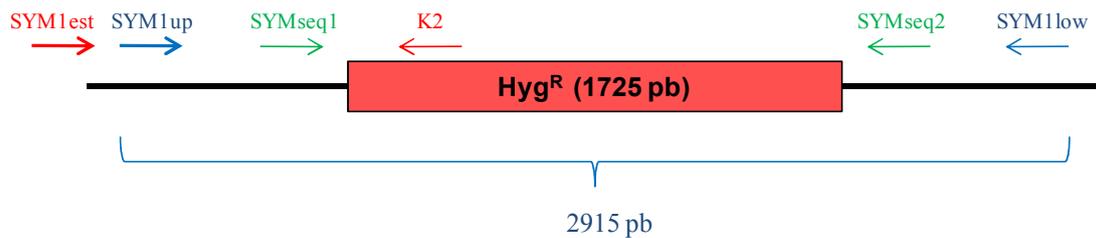


Figura 3.30 Cassetta di distruzione con ali lunghe.

La procedura di selezione dei cloni è avvenuta come descritto precedentemente.

In questo caso però, utilizzando la coppia di primer SYMseq1 e SYMseq2, esterni a *SYM1*, ma comunque interni al costrutto utilizzato per la distruzione, si ottiene un risultato leggermente diverso rispetto a prima. Se l'integrazione è avvenuta correttamente, si otterrà un amplificato di 1864 pb come visto prima, se invece la cassetta si è integrata ad un locus casuale si otterrà sia l'amplificato da 1864 pb che un amplificato di 735 pb che corrisponde a *SYM1* wild type (figura 3.31). Invece utilizzando la coppia di primer K2 e SYM1est si avrà, analogamente a quanto visto prima, amplificazione solo ed elusivamente se l'integrazione è avvenuta al locus desiderato e l'amplicone avrà dimensione di 900 pb.

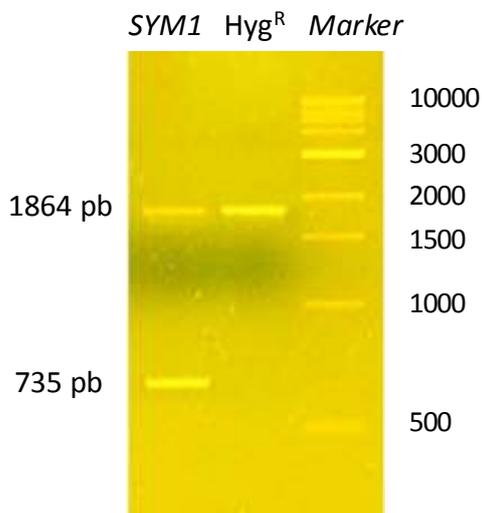


Figura 3.31 Gel elettroforesi dei prodotti di PCR ottenuti con i primer SYMseq1 e SYMseq2.

3.4.4.2 ANALISI DEI DOPPI MUTANTI $\Delta sym1 \Delta ymc1$ E $\Delta sym1 \Delta odc1$

Più analisi fenotipiche sono state eseguite per i singoli e i doppi mutanti: tolleranza all'etanolo, crescita ossidativa e instabilità del genoma mitocondriale.

TOLLERANZA ALL'ETANOLO:

Per quanto riguarda la tolleranza all'etanolo, abbiamo determinato la minima concentrazione di etanolo inibente la crescita in terreno ricco a 37°C del parentale, dei singoli deleti e dei doppi deleti e abbiamo confrontato i risultati (figura 3.32 e tabella 1.4). Abbiamo già visto precedentemente che il ceppo $\Delta sym1$ presenta maggiore sensibilità all'etanolo rispetto al parentale. Al contrario, il ceppo $\Delta ymc1$ non presenta sensibilità all'etanolo, infatti è in grado di crescere fino al 5% di etanolo, addirittura meglio del parentale. Il doppio delecto $\Delta sym1 \Delta ymc1$ mostra un fenotipo peggiorativo rispetto ai singoli deleti, suggerendo un ruolo delle due proteine in *pathway* distinti.

A differenza del mutante $\Delta ymc1$, $\Delta odc1$ non si comporta come il parentale, ma presenta una maggiore sensibilità all'etanolo, anche se non marcata come quella del $\Delta sym1$, indicando un ruolo di Odc1 nella tolleranza all'etanolo. Il doppio delecto $\Delta sym1 \Delta odc1$ mostra un fenotipo peggiorativo rispetto ai singoli deleti, suggerendo un ruolo delle due proteine in *pathway* distinti.

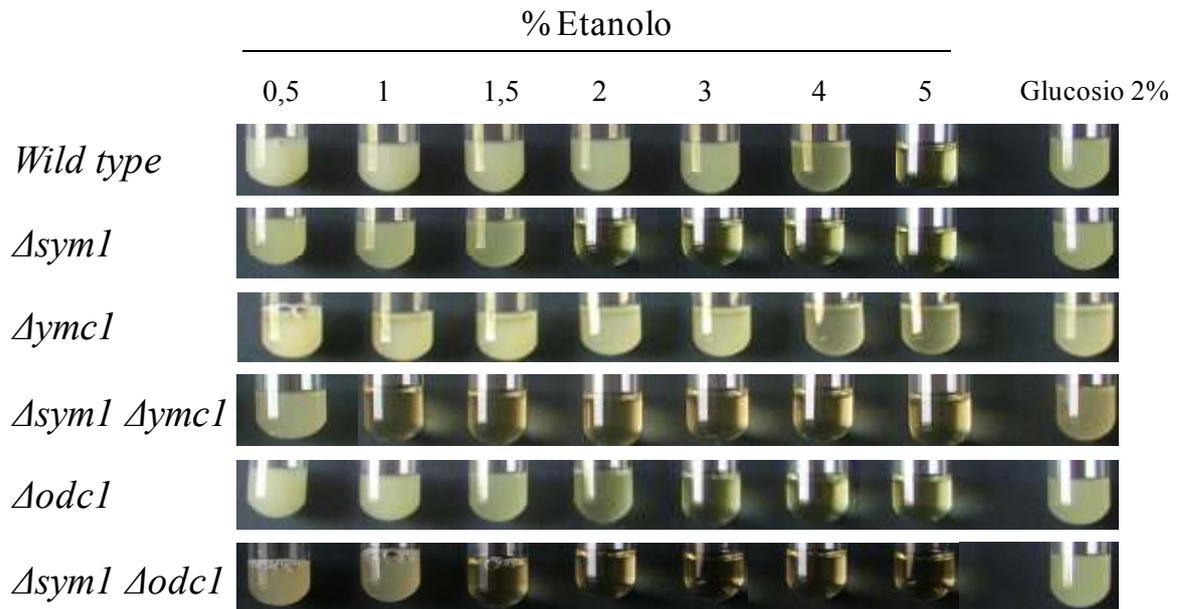


Figura 3.32 Tolleranza all'etanolo. Cellule in fase esponenziale sono state inoculate in terreno YP addizionato con differenti concentrazioni di etanolo. La crescita è stata documentata fotografando le colture cellulari dopo 4 giorni di incubazione a 37°C in agitazione.

37°C							
[Etanolo] %	0,5	1	1,5	2	3	4	5
BY4741	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 Δ <i>sym1</i>	+	+	+	-	-	-	-
BY4741 Δ <i>ymc1</i>	+	+	+	+	+	+	+
BY4741 Δ <i>sym1</i> Δ <i>ymc1</i>	+	-	-	-	-	-	-
BY4741 Δ <i>odc1</i>	+	+	+	+	-	-	-
BY4741 Δ <i>sym1</i> Δ <i>odc1</i>	+	+	-	-	-	-	-

Tabella 3.4 Tolleranza all'etanolo in YP a 37°C. La crescita è stata valutata mediante misurazione della densità ottica della coltura cellulare, ad una lunghezza d'onda di 600 nm (OD₆₀₀). OD₆₀₀> 1, +; OD₆₀₀< 1, -. Tempo di crescita: 4 giorni.

CRESCITA OSSIDATIVA:

E' stata osservata la crescita a 37°C del parentale, dei singoli mutanti e dei doppi deleti in terreno minimo minerale (YNB) contenete differenti fonti di carbonio: glucosio 2%, come controllo positivo, glucosio 0,01%, glicerolo 2%, acetato 2% e etanolo 2%. Ricordiamo che, per garantire la crescita del BY4741 a questa temperatura in terreno minimo, è necessario aggiungere glucosio 0,01% alle fonti di carbonio respirabili. In figura 3.33 sono mostrate le fonti di carbonio maggiormente rappresentative. Per potere vedere un eventuale peggioramento del fenotipo dei doppi mutanti è stato necessario scegliere condizioni nelle quali il Δ *sym1* non mostrasse un'assenza di crescita: nelle condizioni scelte il ceppo Δ *sym1* ha un fenotipo *leaky* (figura 3.33). Al contrario il mutante Δ *ymc1* non presenta un difetto di crescita a 37°C su alcuna fonte di carbonio ossidabile. Il doppio delecto Δ *sym1* Δ *ymc1*, anche per questo fenotipo, presenta un peggioramento rispetto ai singoli deleti.

Per quanto riguarda il ceppo Δ *odc1*, questo mostra un parziale difetto di crescita su alcune fonti di carbonio non fermentabili, indicando un suo possibile ruolo nel metabolismo OXPHOS. Il doppio delecto Δ *sym1* Δ *odc1* presenta un fenotipo peggiore rispetto a entrambi i singoli deleti Δ *sym1* e Δ *odc1*.

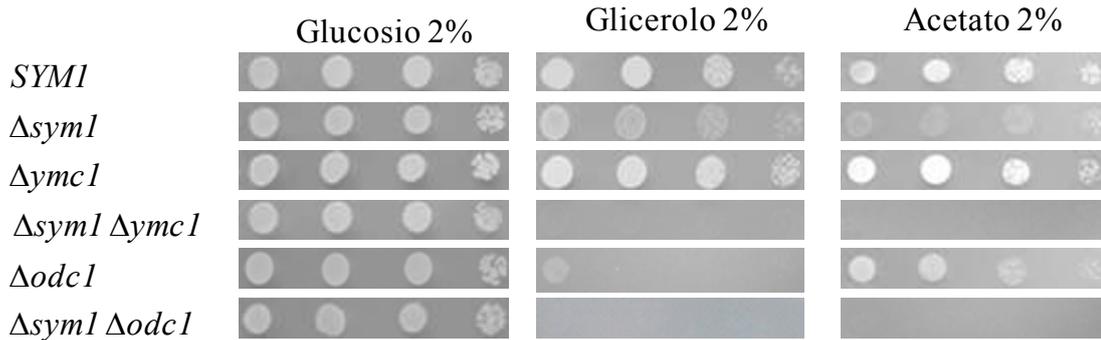


Figura 3.33 Crescita ossidativa a 37°C. Sono state seminate 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cellule ottenute da colture in fase esponenziale, attraverso diluizioni seriali, su piastre di terreno minimo (YNB) addizionate con le fonti di carbonio indicate. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 37°C.

INSTABILITÀ DEL GENOMA MITOCONDRIALE:

Infine abbiamo valutato la stabilità dell'mtDNA nel ceppo parentale, nei singoli deleti e nei doppi deleti (figura 3.34). La delezione di *YMCI* non comporta instabilità del genoma mitocondriale, mentre la doppia delezione di *SYM1* e *YMCI* determina un peggioramento dell'instabilità dell'mtDNA rispetto al ceppo $\Delta sym1$. Al contrario, la delezione di *ODCI*, determina una lieve instabilità del genoma mitocondriale, che è aggravata nel ceppo doppio delecto $\Delta sym1 \Delta odc1$.

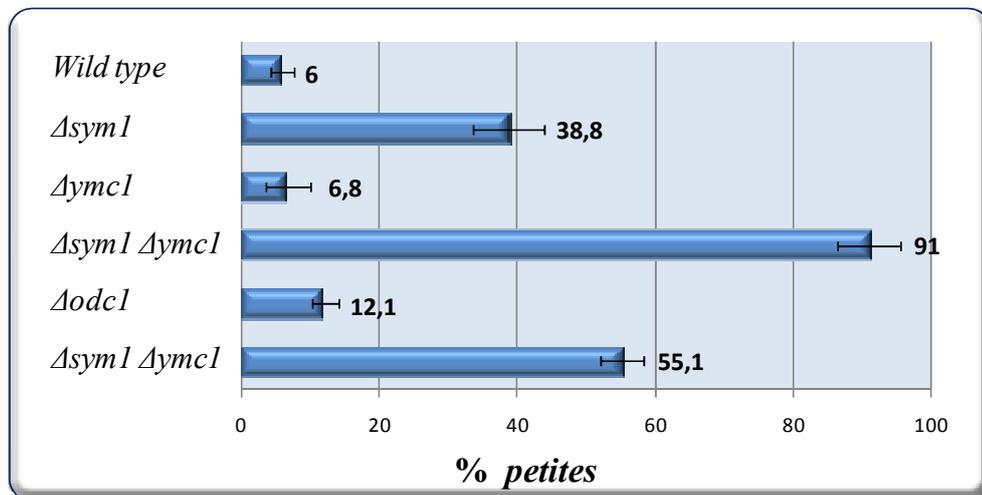


Figura 3.34 Mutabilità mitocondriale. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 7 generazioni a 37°C in terreno minimo minerale contenete glucosio 2% ed etanolo 2%.

Nell'insieme i dati riguardanti *YMCI* indicano che la sua delezione in un contesto *SYM1* wild type non determina alcun difetto né di crescita ossidativa o intolleranza all'etanolo, né di instabilità dell'mtDNA, indicando che, in presenza di Sym1, la proteina Ymc1 non è necessaria. Invece il doppio delecto $\Delta sym1 \Delta ymc1$ presenta, per ognuno dei fenotipi analizzati, un peggioramento rispetto al singolo delecto $\Delta sym1$, indicando che la presenza di Ymc1

diventa cruciale per la crescita ossidativa, la tolleranza all'etanolo e la stabilità del genoma mitocondriale quando manca Sym1, suggerendo che Sym1 possa agire su un *pathway* metabolico che compensa l'assenza di Ymc1. Il fatto che il fenotipo del doppio mutante sia peggiore, indica che le due proteine Ymc1 e Sym1 agiscono su *pathway* diversi e quindi favorisce l'ipotesi che l'overespressione di Ymc1 sia in grado di compensare i difetti metabolici del mutante $\Delta sym1$ in quanto crea un *bypass*.

In relazione a *ODC1*, il risultato è leggermente diverso. Infatti l'assenza di Odc1 determina un difetto sia di crescita ossidativa e intolleranza all'etanolo, sia di instabilità dell'mtDNA, suggerendo che anche questa proteina, come Sym1, abbia un qualche ruolo in questi processi. Comunque il fenotipo del doppio mutante è sempre peggiore rispetto ai singoli deleti, per ognuno dei fenotipi considerati, suggerendo che anche Sym1 e Odc1 agiscano su due *pathway* distinti. Il fatto che il mutante $\Delta sym1$ sia più sensibile all'etanolo rispetto al mutante $\Delta odc1$ ma con un fenotipo di crescita ossidativa meno grave rispetto a quest'ultimo, suggerisce che Sym1 possa svolgere un ruolo più importante nella resistenza all'etanolo rispetto ad Odc1, mentre viceversa Odc1 potrebbe avere un ruolo più importante nel metabolismo ossidativo rispetto a Sym1. Anche per quanto riguarda la stabilità dell'mtDNA, l'assenza di Sym1 ha un impatto maggiore rispetto all'assenza di Odc1.

Quale potrebbe essere il meccanismo di soppressione di Ymc1 e Odc1? Questi due *carrier* potrebbero avere un ruolo anaplerotico sul ciclo di Krebs, trasferendo intermedi dai perossisomi ai mitocondri. Sarebbe quindi l'ingresso supplementare di molecole nel mitocondrio a sopprimere il fenotipo assenza di crescita su fonti ossidabili.

In accordo con i dati di soppressione chimica, nuovamente i risultati ottenuti indicano un possibile difetto a livello del ciclo dell'acido citrico. Questi dati sembrano escludere la seconda ipotesi riguardo al meccanismo di soppressione da parte di glutammato, glutammina, aspartato e asparagina, cioè un difetto di trasporto di α -chetoglutarato dal mitocondrio al citoplasma.

3.5 ANALISI DEI DOPPI MUTANTI $\Delta sym1 \Delta cit1$ E $\Delta sym1 \Delta cit2$

Come visto precedentemente, Odc1 è un trasportatore localizzato nella membrana mitocondriale interna in grado di trasportare dal perossisoma al mitocondrio intermedi del ciclo di Krebs come il citrato.

In *S. cerevisiae* il citrato è prodotto sia nei mitocondri durante il ciclo degli acidi tricarbossilici, attraverso la citrato sintasi codificata dal gene *CIT1*, sia nei perossisomi nel ciclo del glicosilato, grazie ad un'altra isoforma dell'enzima codificata dal gene *CIT2* (Kim *et al.*, 1986). Il gene *CIT2* è un bersaglio della *retrograde regulation*, *pathway* di comunicazione tra il mitocondrio e il nucleo che induce risposte adattative a livello dell'espressione dei geni

nucleari quando le attività dei mitocondri, come la respirazione o la biogenesi, sono compromesse (Liu and Butow, 2006). In cellule con attività mitocondriale compromessa, come per esempio in cellule ρ^0 , prive di mtDNA, l'espressione di *CIT2* è aumentata più di 30 volte (Liao *et al.*, 1991) e il citrato prodotto in grande quantità nei perossisomi viene utilizzato per sostenere il mitocondrio.

E' quindi stato analizzato l'effetto della delezione dei geni che codificano la citrato sintasi perossisomale (*CIT2*) e la citrato sintasi mitocondriale (*CIT1*) sul mutante $\Delta sym1$. L'approccio utilizzato per la costruzione dei doppi mutanti è il medesimo di quello utilizzato nella costruzione del mutante $\Delta sym1 \Delta odc1$, è cioè stato ottenuto un costrutto (con ali lunghe) in grado di conferire resistenza all'antibiotico igromicina e con questo costrutto è stato distrutto il gene *SYM1* nei ceppi BY4741 $\Delta cit1$ e BY4741 $\Delta cit2$.

Le modalità di selezione e di controllo mediante PCR dei doppi deleti sono le stesse utilizzate precedentemente e si rimanda al paragrafo 3.4.4.1.

E' stata quindi effettuata un'analisi della crescita ossidativa, della sensibilità all'etanolo e della stabilità del genoma mitocondriale dei singoli ($\Delta sym1$, $\Delta cit1$, $\Delta cit2$) e dei doppi mutanti ($\Delta sym1 \Delta cit1$, $\Delta sym1 \Delta cit2$).

La crescita ossidativa è stata determinata attraverso *spot assay* a 37°C su terreno minimo minerale (YNB) in presenza di diverse fonti di carbonio: glucosio 2%, come controllo positivo, glucosio 0,01%, glicerolo 2%. Anche in questo caso, non è stato considerato l'etanolo in quanto il fenotipo del mutante $\Delta sym1$ è troppo grave per poter vedere un eventuale effetto peggiorativo. Alle fonti di carbonio non fermentabili è stato necessario aggiungere la solita bassa concentrazione di glucosio (0,01%) per garantire la crescita del ceppo parentale. I risultati ottenuti sono mostrati in figura 3.35.

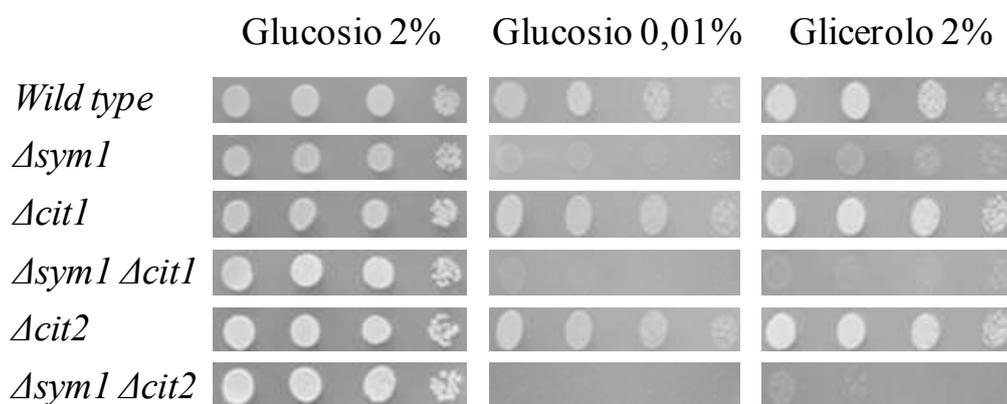


Figura 3.35 Crescita ossidativa a 37°C. Sono state seminate 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cellule ottenute da colture in fase esponenziale attraverso diluizioni seriali su piastre di terreno minimo (YNB) addizionate con le fonti di carbonio indicate. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 37°C.

La tolleranza all'etanolo è stata valutata inoculando cellule cresciute a 28°C in YPD in YP addizionato di concentrazioni crescenti di etanolo e incubandole a 37°C, per quattro giorni, in agitazione (figura 3.36 e tabella 3.5).

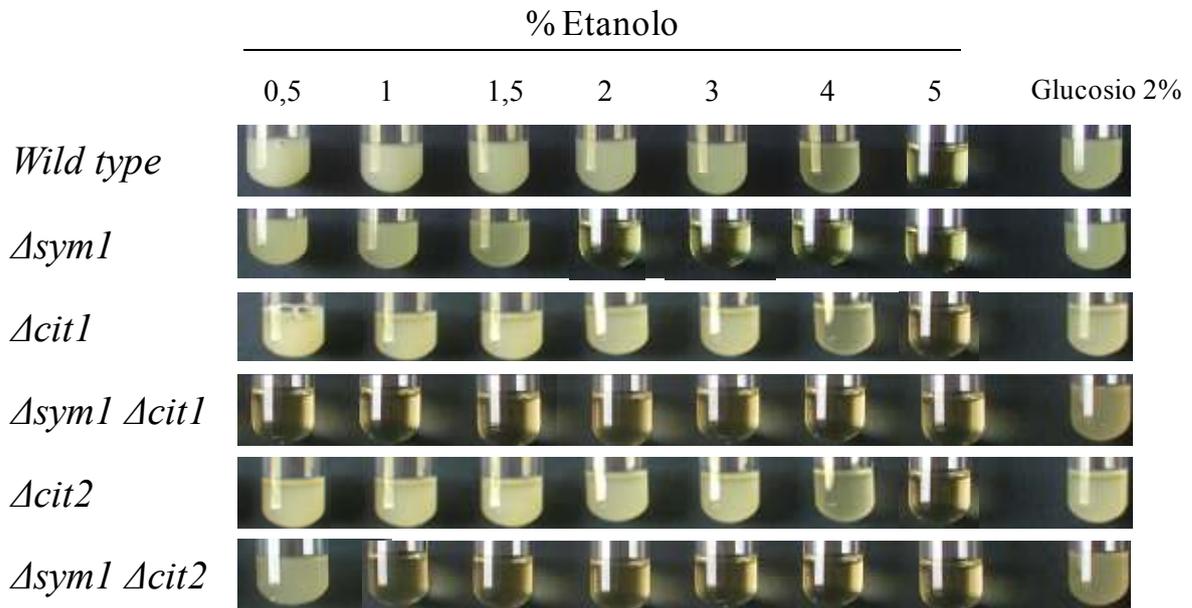


Figura 3.36 Tolleranza all'etanolo. Cellule in fase esponenziale sono state inoculate in terreno YP addizionato con differenti concentrazioni di etanolo. La crescita è stata documentata fotografando le colture cellulari dopo 4 giorni di incubazione a 37°C in agitazione.

37°C							
[Etanolo] %	0,5	1	1,5	2	3	4	5
BY4741	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 <i>Δsym1</i>	+	+	+	-	-	-	-
BY4741 <i>Δcit1</i>	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 <i>Δsym1 Δcit1</i>	-	-	-	-	-	-	-
BY4741 <i>Δcit1</i>	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 <i>Δsym1 Δcit2</i>	+	-	-	-	-	-	-

Tabella 3.4 Resistenza all'etanolo. La crescita è stata valutata mediante misurazione della densità ottica della coltura cellulare, ad una lunghezza d'onda di 600 nm (OD_{600}). $OD_{600} > 1$, +; $OD_{600} < 1$, -. Tempo di crescita: 4 giorni a 37°C, in agitazione.

I risultati ottenuti, sia per la crescita ossidativa che per la tolleranza all'etanolo, indicano che l'assenza di *CIT1* o *CIT2* non determina alcun fenotipo, infatti il fenotipo dei singoli deleti *Δcit1* e *Δcit2* è paragonabile a quello del ceppo wild type. Questo risultato è atteso dal

momento che l'attività di una sola delle due citrato sintasi è sufficiente a sostenere il metabolismo ossidativo (Kim *et al.*, 1986).

Nel contesto genetico $\Delta sym1$, invece, la delezione del gene *CIT1* determina un fenotipo peggiorativo rispetto al singolo mutante $\Delta sym1$. Questo significa che, nelle cellule prive della proteina Sym1, il citrato prodotto da Cit2 non è in grado di sostenere la crescita ossidativa, cosa che invece avviene in presenza Sym1. Questo dato può indicare che, in assenza di Sym1, c'è un difetto nel trasporto del citrato prodotto da Cit2 nel perossisoma al mitocondrio e quindi un ruolo della proteina Sym1 nell'interazione mitocondrio-perossisoma; oppure che la quantità di citrato prodotto da Cit2 non è sufficiente a sostenere la crescita ossidativa, indicando un difetto a livello del ciclo di Krebs. Il fatto che anche il ceppo doppio mutante $\Delta sym1 \Delta cit2$, in cui il citrato è prodotto direttamente dentro il mitocondrio, mostri un fenotipo peggiorativo rispetto al singolo delecto $\Delta sym1$, suggerisce che ci sia un difetto a livello del ciclo di Krebs, di produzione o utilizzazione del citrato, piuttosto che nel suo trasporto.

E' anche stato valutato l'effetto della delezione di *CIT1* e *CIT2*, da soli o in associazione con la distruzione di *SYMI*, sulla mutabilità mitocondriale. Anche per quanto riguarda questo fenotipo, la delezione di *CIT1* o *CIT2*, in presenza di *SYMI*, non determina alcuna alterazione; mentre la loro distruzione in un contesto $\Delta sym1$ provoca un aumento dell'instabilità del genoma mitocondriale rispetto alla singola delezione di *SYMI* (figura 3.37). Questo comportamento potrebbe essere la conseguenza di una degenerazione mitocondriale conseguente alla gravità dell'associazione delle due mutazioni.

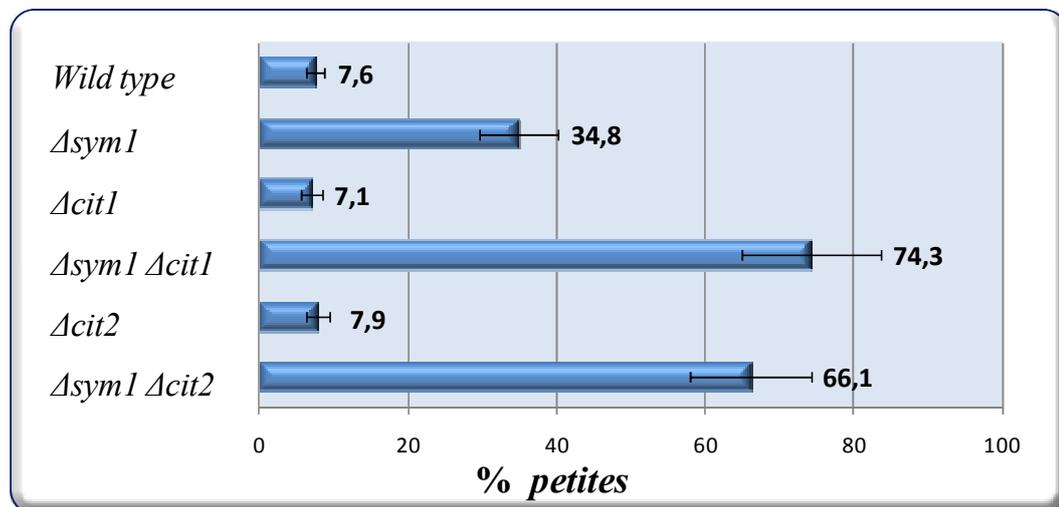


Figura 3.37 Analisi della mutabilità mitocondriale. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 7 generazioni a 37°C in terreno minimo minerale contenete glucosio 2% ed etanolo 2%.

Sulla base di questi dati ipotizziamo quindi che l'overespressione di *YMCI* ed *ODCI* ripristini la crescita ossidativa a 37°C del mutante $\Delta sym1$ attraverso un aumento del flusso di intermedi del ciclo dell'acido citrico dai perossisomi ai mitocondri. A questo proposito si può ricordare

che *ODC1* è stato anche identificato come soppressore multicopia del mutante $\Delta fmc1$, un gene che codifica per una proteina mitocondriale coinvolta nell'assemblaggio e nella stabilità della F_0F_1 -ATP sintasi di lievito specificatamente alla temperatura di 37°C (Schwimmer *et al.*, 2005). La delezione di *FMCI* determina un forte decremento (>90%) del contenuto di ATP sintasi (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2001). Il meccanismo di soppressione che è stato proposto riguardo al ripristino della crescita ossidativa del mutante $\Delta fmc1$ prevede un aumento del flusso di intermedi del ciclo dell'acido citrico dai perossisomi ai mitocondri (attraverso il trasportatore Odc1p) che risulta in un aumento della sintesi di ATP mediante la fosforilazione mitocondriale a livello di substrato (figura 3.38). La sintesi alternativa di ATP attraverso questo *pathway* sembra sufficiente per sostenere la crescita respiratoria nonostante un contenuto molto basso di ATP sintasi (Schwimmer *et al.*, 2005).

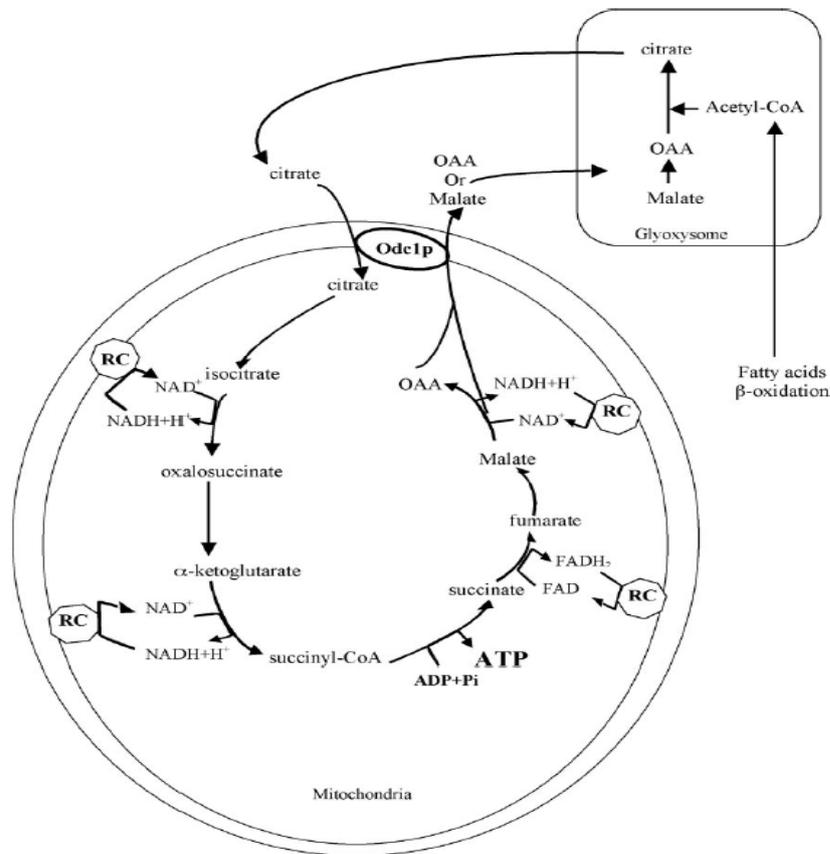


Figura 3.38 Schema del meccanismo di soppressione di Odc1p. Il citrato prodotto nel ciclo del gliossilato è trasportato nel mitocondrio grazie alla proteina Odc1 ed entra nel TCA portando alla produzione di succinato accoppiato alla produzione di ATP attraverso la fosforilazione a livello di substrato. Malato o ossalacetato possono essere trasportati nel citosol grazie ad Odc1p per poi entrare nel ciclo del gliossilato. Questo ciclo di reazioni può essere mantenuto fino a quando l'acetyl-CoA è prodotto dall'ossidazione degli acidi grassi, che è aumentata enormemente durante la *retrograde regulation* grazie alla proliferazione dei perossisomi. RC, catena respiratoria. (Da Schwimmer *et al.*, 2005)

3.6 ANALISI DEGLI ENZIMI DEL CICLO DI KREBS

I dati fin qui ottenuti indicano la possibilità di un ciclo di Krebs difettoso nel mutante $\Delta sym1$. Sono state pertanto misurate le attività di alcuni enzimi del TCA: la citrato sintasi (CS), l'isocitrato deidrogenasi (IDH), la succinato deidrogenasi (SDH) e la malato deidrogenasi (MDH). I primi due enzimi sono coinvolti nella produzione dell' α -chetoglutarato, nella prima parte del ciclo, mentre gli altri due, SDH e MDH, fanno parte della seconda parte del ciclo di Krebs. La succinato deidrogenasi o succinato-coenzima Q reduttasi inoltre fa parte della catena respiratoria (complesso respiratorio II).

Le analisi sono state effettuate in una condizione nella quale non ci fosse perdita del genoma mitocondriale. Le cellule sono state fatte crescere a 28°C in YPD in fase esponenziale, poi trasferite in condizioni di doppio stress (etanolo 2%; 37°C) in presenza di una concentrazione non reprimente di glucosio (0,6%) *over-night* (per 13 ore). Il passaggio a 28°C quindi serve per ottenere la biomassa. La crescita iniziale è stata effettuata in glucosio, e non in etanolo, perché abbiamo osservato che a partire da questa condizione il fenotipo del $\Delta sym1$ è più evidente. Dopo le 13 ore si è proceduto con l'estrazione dei mitocondri, la quantificazione delle proteine e i saggi enzimatici.

Nessuna delle attività enzimatiche misurate è significativamente ridotta nel ceppo $\Delta sym1$, tranne la succinato deidrogenasi che è abbattuta circa del 60% (figura 3.39). Quindi, questo dimostra che c'è effettivamente un difetto a livello del ciclo di Krebs. Ricordiamo che l'SDH è l'unico enzima del TCA ad essere localizzata nella membrana mitocondriale interna, mentre tutti gli altri si trovano nella matrice.

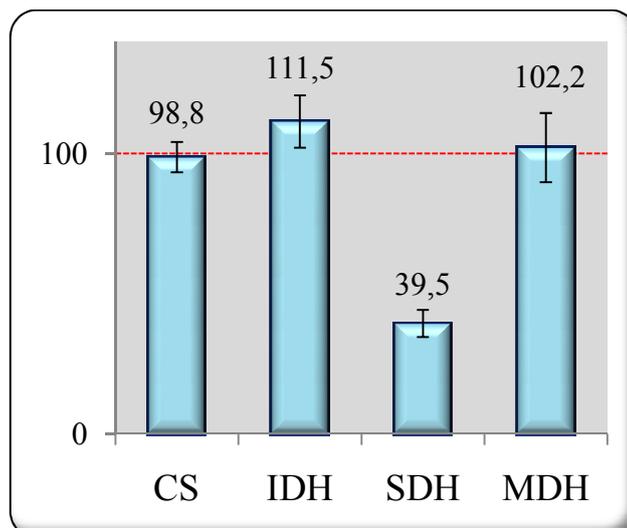


Figura 3.39 Attività degli enzimi del ciclo di Krebs del ceppo $\Delta sym1$. CS, citrato sintasi; IDH, isocitrato deidrogenasi; SDH, succinato deidrogenasi; MDH, malato deidrogenasi. I valori sono rapportati al parentale.

Inoltre è stata valutata la quantità di complesso SDH completamente assemblato tramite gel elettroforesi *blue native* (2D-BNGE) e la quantità di subunità Sdh2 tramite SDS-PAGE, seguiti da *Western blot* e immunorivelazione. In accordo con la riduzione dell'attività enzimatica, si osserva una drastica riduzione sia della quantità di subunità Sdh2 che della quantità di complesso assemblato (figura 3.40).

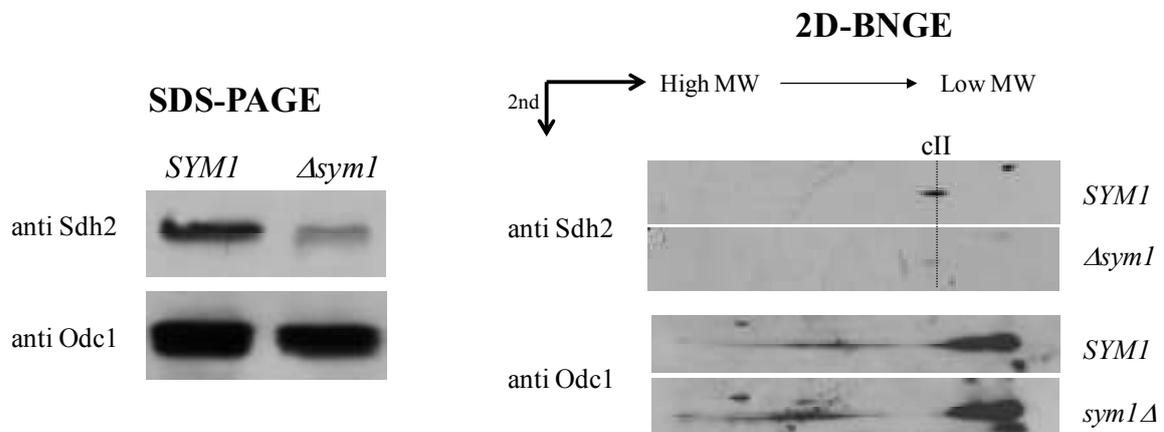


Figura 3.40 A. *Western blot* dell'SDS-PAGE (gel elettroforesi denaturante) effettuato sulle proteine mitocondriali del ceppo parentale e $\Delta sym1$. B. *Western blot* della seconda dimensione (2D) della *blue native gel electrophoresis*. L'immunorivelazione è stata effettuata utilizzando un anticorpo primario contro la subunità Sdh2 e uno contro Odc1 come controllo interno.

3.7 ANALISI DEI COMPLESSI RESPIRATORI

Sono state misurate anche le attività dei complessi respiratori e dell'ATP sintasi, nelle stesse condizioni sperimentali appena descritte (crescita in YP a 28°C, *shift* per 13 ore in YPE + glucosio 0,6%). In particolare sono state analizzate le attività enzimatiche dei complessi III (citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi), IV (citocromo c ossidasi - COX) e V (ATP sintasi). E' stata riscontrata una lieve riduzione (circa 20-30%) di tutte le attività enzimatiche considerate (figura 3.41).

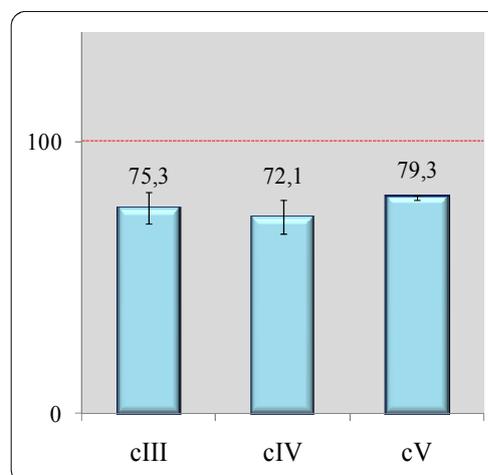


Figura 3.41 Attività dei complessi della fosforilazione ossidativa del ceppo $\Delta sym1$. cIII, complesso III; cIV, complesso IV; cV, complesso V. I valori sono rapportati al parentale.

Anche in questo caso è stata valutata la quantità dei complessi completamente assemblati tramite gel elettroforesi *blue native* (2D-BNGE), seguiti da *Western blot* e immunorivelazione (figura 3.42 A). Per la rivelazione del complesso III è stato utilizzato un anticorpo contro le proteine Core 1 e Core 2, per il complesso IV un anticorpo contro CoIII e per l'ATP sintasi un anticorpo contro la subunità Atp4. Inoltre è stata valutata la quantità di queste subunità tramite SDS-PAGE (figura 3.42 B). In BNGE si può osservare una blanda riduzione di tutti i complessi respiratori analizzati. In SDS-PAGE la riduzione è ancora meno evidente. E' necessario sottolineare che con le due tecniche si vanno a rivelare cose diverse: con la *blue native* si visualizza il complesso assemblato, mentre in gel elettroforesi denaturante si osserva la singola proteina presa in esame.

Complessivamente i dati relativi ai complessi respiratori (attività e quantità) indicano che vi è un lieve difetto a livello della catena respiratoria.

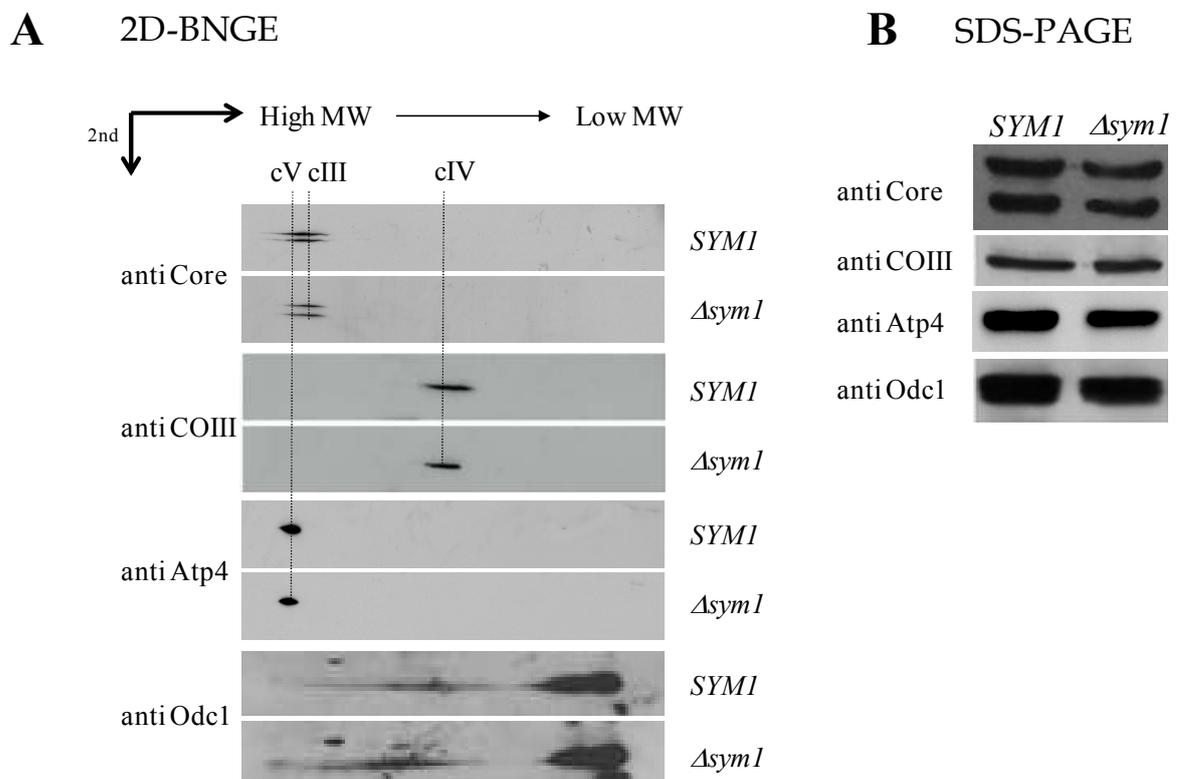


Figura 3.42 A. *Western blot* della seconda dimensione (2D) della *blue native gel electrophoresis* effettuato sulle proteine mitocondriali del ceppo parentale e *Δsym1*. **B.** *Western blot* dell'SDS-PAGE (gel elettroforesi denaturante). L'immunorivelazione è stata effettuata utilizzando gli anticorpi primari contro Core 1 e 2 (complesso III), CoIII (complesso IV), Atp4 (complesso V) e Odc1 come controllo interno.

Nelle stesse condizioni di crescita è anche stato valutato l'effetto della delezione di *SYM1* sulle strutture dei citocromi respiratori attraverso l'analisi degli spettri di assorbimento, in un *range* compreso tra 630 e 530 nm (figura 1.43). In queste condizioni lo spettro di assorbimento del ceppo parentale risulta anomalo, ovvero il picco relativo al citocromo aa₃ a

602 nm (componente della COX) risulta parzialmente spostato a 580 nm, indice di parziale disassemblamento del complesso IV. Questo è presumibilmente dovuto all'effetto che il doppio stress esercita sulle membrane mitocondriali. Per quanto riguarda il ceppo $\Delta sym1$, il disassemblaggio è più consistente in quanto si osserva una riduzione di assorbimento a 603 nm in favore di un aumento di assorbimento a 580 nm, indicativo dell'accumulo di subunità disassemblate della citocromo ossidasi.

Al contrario il citocromi b (componente del complesso III) e il citocromo c appaiono normali.

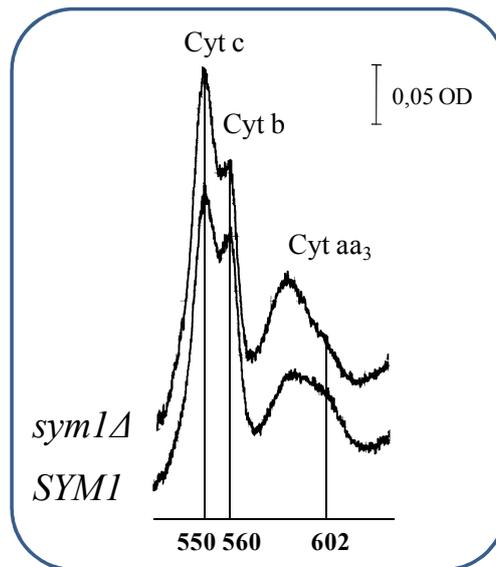


Figura 3.43 Spettro di assorbimento dei citocromi respiratori. I picchi a 602 nm, 560 nm e 550 nm corrispondono al citocromo aa₃, b e c rispettivamente.

Lo spettro dei citocromi dà indicazioni sull'integrità o meno delle strutture respiratorie, mentre per valutare la loro funzionalità è necessario determinare l'attività respiratoria attraverso la misurazione del consumo di ossigeno. La respirazione in queste condizioni di crescita risulta normale (figura 3.44), indicando che le strutture respiratorie, seppur parzialmente compromesse, non riducono la capacità respiratoria delle cellule.

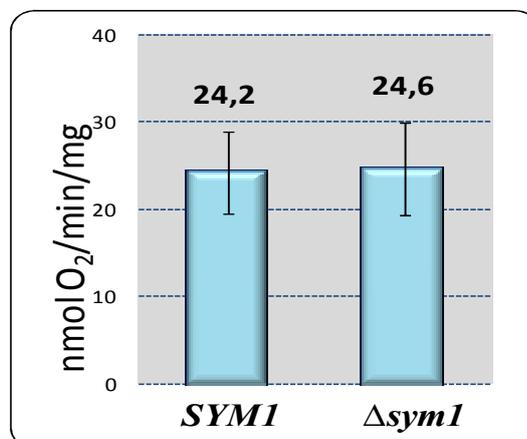


Figura 3.44 Misura dell'attività respiratoria del ceppo parentale e $\Delta sym1$. I valori sono indicato come nmoli di ossigeno consumato/min/mg di cellule.

3.8 ANALISI DEL CONTENUTO CELLULARE DI GLICOGENO

E' stato determinato il contenuto cellulare di glicogeno, che è una riserva energetica della cellula importante nell'adattamento alla crescita respiratoria, nella carenza di nutrimento e nello stress (Lillie and Pringle, 1980; François and Parrou, 2001). Questa analisi è stata fatta in considerazione del fatto che il glicogeno viene costituito per condensazione del glucosio prodotto via gluconeogenesi a partire da intermedi del ciclo di Krebs. Le cellule wild type e $\Delta sym1$ sono state fatte crescere a 28°C in YPD per 4 giorni in modo da consentire l'accumulo del glicogeno; poi sono stati fatti degli *spot* su YPD e YNBD che in seguito sono stati colorati a tempi diversi con una soluzione di KI 0,4% e I₂ 0,2% (Chester, 1968). Questo metodo, largamente utilizzato, permette di rilevare in modo semi-quantitativo il contenuto di glicogeno. Uno *spot* giallo è indicativo dell'assenza di glicogeno, mentre uno *spot* marrone è indicativo della presenza di questo polimero. La tonalità di marrone è invece indicativa della minore o maggiore quantità di glicogeno. Il ceppo $\Delta sym1$ mostra un contenuto di glicogeno molto inferiore rispetto al ceppo parentale in entrambi i terreni considerati (figura 3.45). Il ceppo wild type, dopo un giorno, in seguito a *staining* è marrone e progressivamente la colorazione diminuisce, indicando un consumo di glicogeno; al contrario, il ceppo $\Delta sym1$ risulta difettivo di glicogeno da subito, indicando un difetto di accumulo del polimero. Questo risultato potrebbe essere la conseguenza della ridotta attività succinato deidrogenasica osservata, e quindi di un difetto del flusso di intermedi del ciclo di Krebs dal mitocondrio verso il citosol.

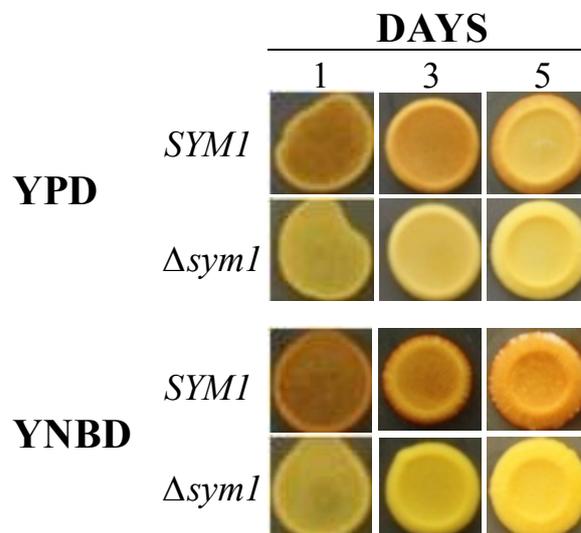


Figura 3.45 Determinazione del contenuto di glicogeno tramite colorazione con soluzione di iodio.

E' interessante notare che i pazienti con mutazioni in MPV17 soffrono di gravi, a volte fatali, crisi ipoglicemiche. I dati ottenuti in lievito suggeriscono che esse siano dovute ad una

carezza di glicogeno nel fegato, fornendo una possibile spiegazione di questo fenotipo clinico, e suggerendo un approfondimento analitico di questo aspetto nei pazienti.

Per rispondere alla domanda se il mancato accumulo di glicogeno è una conseguenza della ridotta attività succinato deidrogenasi osservata nel ceppo $\Delta sym1$ è stato misurato semi-quantitativamente l'accumulo di glicogeno in un ceppo con un allele *sdh2* mutato, caratterizzato da una riduzione di circa il 50% dell'attività succinato deidrogenasica (Goffrini, comunicazione personale). Come controllo è stato analizzato anche l'accumulo del glicogeno nel ceppo $\Delta sdh2$ trasformato con l'allele *SDH2* wild type e i ceppi $\Delta sym1$ recanti l'allele *SYM1* o il plasmide vuoto (pFL38). Come si può vedere dalla figura 3.46 i ceppi parentali ($\Delta sym1/SYM1$ e $\Delta sdh2/SDH2$) mostrano una colorazione marrone, il ceppo $\Delta sym1/pFL38$ non si colora indicando l'assenza di glicogeno e il ceppo $\Delta sdh2/sdh2$ si comporta in modo simile al ceppo privo di *SYM1*, indicando che la mutazione della subunità 2 dell'SDH che compromette parzialmente l'attività enzimatica del complesso, ha un difetto di accumulo di glicogeno nelle condizioni testate: crescita a 28°C in terreno SCD liquido per 4 giorni, *spot* su una piastra di YNBD che è stata incubata a 37°C per 3 giorni e in seguito è stata colorata con la soluzione iodio (KI 0,4% e I₂ 0,2%). Questo dato favorisce l'ipotesi che il difetto di accumulo del glicogeno osservato nel ceppo $\Delta sym1$ sia una conseguenza del difetto a livello del ciclo di Krebs, che come noto è un importante fonte di intermedi per la gluconeogenesi e quindi per la biosintesi del glicogeno.

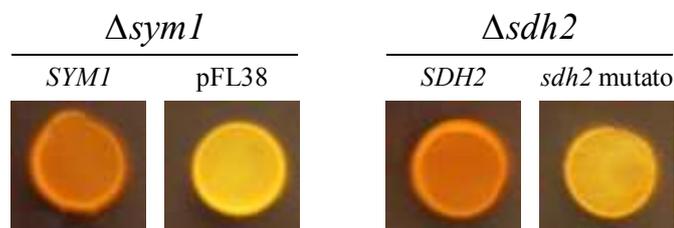


Figura 3.46 Determinazione del contenuto di glicogeno in YNBD a 37°C dopo 3 giorni tramite colorazione con soluzione di iodio.

3.9 ANALISI DELL'OVER-ESPRESSIONE DI AAC2

AAC2 codifica per l'ADP/ATP *carrier*, una delle proteine più abbondanti della membrana mitocondriale interna. Questo trasportatore è specifico per i nucleotidi adeninici infatti, quando la respirazione mitocondriale e la fosforilazione ossidativa sono accoppiate, catalizza lo scambio di ADP citosolico con ATP prodotto nella matrice mitocondriale dall'ATP sintasi. In questo modo rifornisce, da un lato, la cellula con energia metabolica sotto forma di ATP, e dall'altro, l'ATP sintasi con uno dei suoi substrati, l'ADP. L'ADP/ATP translocasi svolge quindi un ruolo chiave nel metabolismo energetico cellulare, poiché connette il compartimento di produzione di ATP con quello di utilizzo (Pfaff and Klingenberg, 1968).

Nel paragrafo 3.7 sono stati presentati i dati relativi alle attività enzimatiche dei complessi respiratori e dell'ATP sintasi. Quest'ultima mostra un abbattimento di circa il 20%. Dato che Aac2 fornisce al complesso V uno dei suoi substrati è stato analizzato l'effetto di una sua over-espressione sul fenotipo di crescita ossidativa e sulla stabilità del DNA mitocondriale nel contesto $\Delta sym1$. Il gene *AAC2* è stato clonato sia nel plasmide monocopia pFL38 (Fontanesi et al., 2004) che nel plasmide multicopia pFL44. Successivamente questi costrutti sono stati introdotti nel ceppo $\Delta sym1$ tramite trasformazione. Il fatto di utilizzare sia un plasmide monocopia che uno multicopia ha permesso di valutare l'effetto che diversi livelli di Aac2 potrebbero avere sul fenotipo del mutante $\Delta sym1$.

Quando l'analisi di *spot assay* viene effettuata in terreno ricco (YP), l'introduzione del gene *AAC2*, sia in un plasmide monocopia che multicopia, è in grado di sopprimere parzialmente il difetto di crescita ossidativa del ceppo $\Delta sym1$ (figura 3.47). Inspiegabilmente, questa soppressione non è riscontrabile se l'esperimento viene effettuato in terreno minimo minerale (YNB) (dato non mostrato).

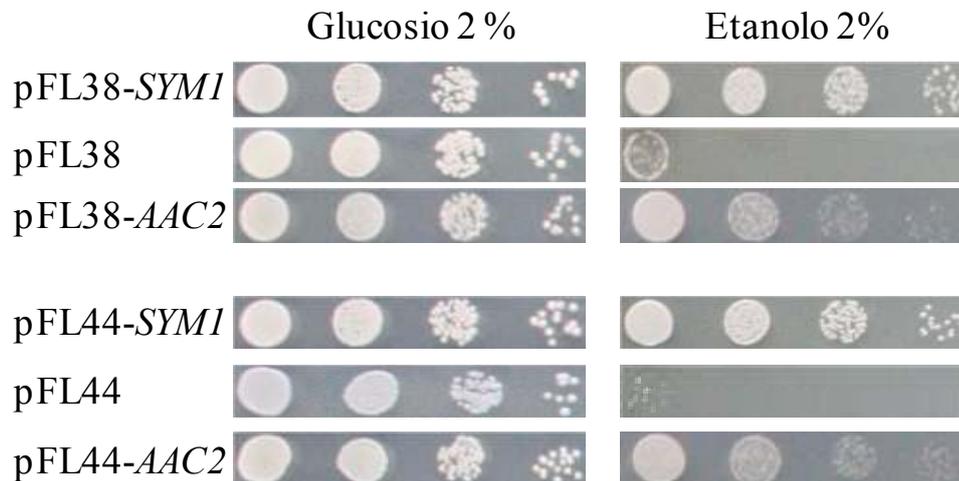


Figura 3.47 Analisi di crescita del ceppo $\Delta sym1$ trasformato con il plasmide vuoto, con il plasmide recante il gene *SYMI* e con i plasmidi mono e multicopia contenenti *AAC2*.

E' stato in seguito analizzato l'effetto dell'over-espressione di *AAC2* sulla mutabilità mitocondriale, per vedere se ci fosse un miglioramento anche di questo fenotipo. L'introduzione del plasmide monocopia contenente *AAC2* riduce marcatamente l'instabilità dell'mtDNA, infatti la percentuale dei mutanti *petite* passa da circa il 90% a circa il 20% rispetto al 9% del ceppo parentale, mentre l'introduzione del plasmide multicopia contenente *AAC2* riduce l'instabilità dell'mtDNA, ma in maniera meno importante, infatti la percentuale dei mutanti *petite* passa dal 90% al 35% rispetto al 11% del ceppo parentale (figura 3.48). Questi dati indicano che Aac2 migliora la stabilità del genoma mitocondriale, in maniera "inversamente dipendente" dalla quantità: un eccesso di Aac2 è meno efficace sulla soppressione del difetto.

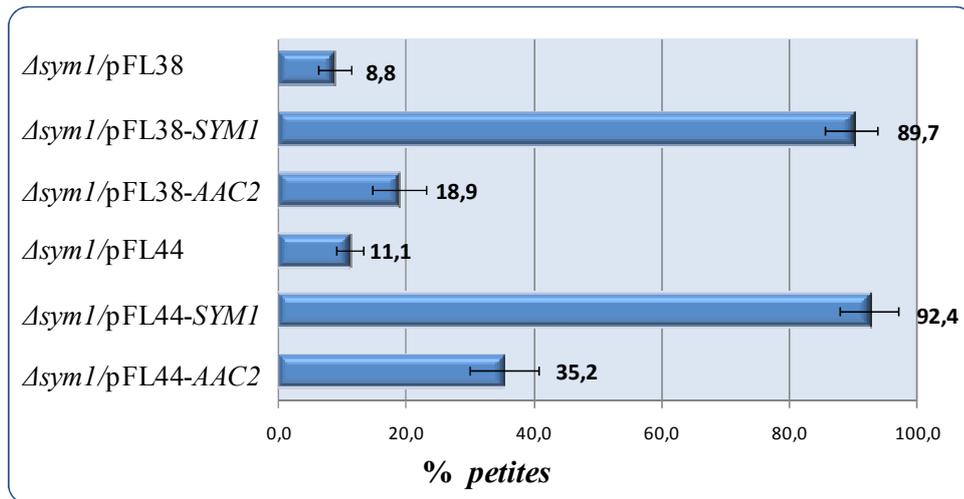


Figura 3.48 Analisi della mutabilità mitocondriale. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno contenente glucosio 2% ed etanolo 2%.

I miglioramenti fenotipici osservati in seguito all'over-espressione di *AAC2*, sia per quanto riguarda la crescita ossidativa che la stabilità del DNA mitocondriale, potrebbero essere dovuti ad un effetto stabilizzante sulla membrana mitocondriale interna, ad un effetto benefico sull'ATP sintasi, o a entrambi.

Infatti, essendo *Aac2* una proteina integrale di membrana, potrebbe avere un importante ruolo strutturale che conferisce una maggiore stabilità al genoma mitocondriale. E' anche noto che *Aac2* fa parte del nucleoide, un complesso proteico che contiene l'mtDNA e quindi una sua overespressione potrebbe stabilizzarlo.

Inoltre, l'aumento dell'ingresso di ADP, il substrato dell'ATP sintasi, potrebbe favorire l'ultima reazione del processo respiratorio.

3.10 RUOLO DEI ROS NELLA MUTABILITA' MITOCONDRIALE

E' noto che il DNA mitocondriale è soggetto all'azione di agenti ossidanti, in particolare specie reattive dell'ossigeno quali l'acqua ossigenata, l'anione superossido e il radicale ossidrilico che si formano come prodotti della riduzione parziale dell'ossigeno durante la respirazione a livello della membrana interna. Il DNA mitocondriale, data la sua vicinanza con il sito di produzione dei ROS, è molto vulnerabile alla loro azione. In particolare, danni ossidativi sull'mtDNA hanno come conseguenza la comparsa di riarrangiamenti dell'mtDNA o la perdita dell'mtDNA (reviewed in Stuart and Brown, 2006).

Per valutare se l'elevata mutabilità mitocondriale osservata nel ceppo $\Delta sym1$ sia, anche in parte, dovuta all'azione dei ROS, esso è stato trattato con due antiossidanti, a nota azione anti-ROS: l'acido diidrolipoico e il mito chinone (Suzuki *et al.*, 1991; Kelso *et al.*, 2001).

L'acido diidrolipoico è uno *scavenger* dei ROS, è in grado cioè di ridurre, ossidandosi, le specie reattive a specie ridotte non tossiche.

L'acido diidrolipoico è formato da una catena di otto atomi di carbonio, fra cui il carbonio 6 e 8 legano gruppi tiolici. Esso è coinvolto in processi di ossidoriduzione, infatti i gruppi tiolici dell'acido diidrolipoico, donando due elettroni e due protoni, possono ossidarsi formando un legame disolfuro e di conseguenza un anello a cinque termini chiamato anello ditiolato. La forma ossidata dell'acido diidrolipoico è chiamata acido α -lipoico, o acido lipoico (figura 3.49).

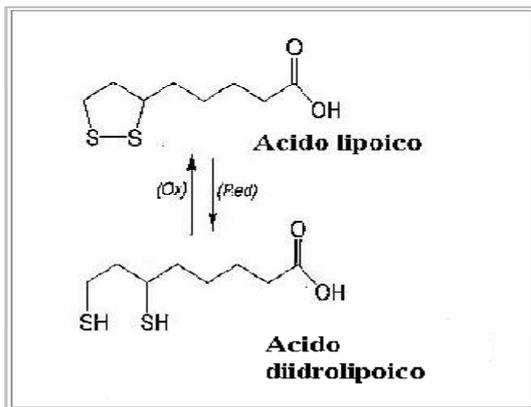


Figura 3.49 Struttura dell'acido lipoico e diidrolipoico.

Il processo è ciclico, infatti, in presenza di un agente meno ossidante, l'acido lipoico può ossidare il composto accettando due atomi di idrogeno, e ritornare alla forma ridotta acido diidrolipoico. Come *scavenger* dei ROS, l'acido diidrolipoico può ridurre diverse specie radicaliche, fra cui radicali perossidi, idrossilici, superossidi e idroperossidi.

Il mitochinolo/mitoquinone, o MitoQ, è una sostanza antiossidante di sintesi ottenuto nel 2001 (Kelso *et al.*, 2001). Il MitoQ deriva dalla modificazione chimica dell'ubichinone, in cui è stato inserito un catione trifenilfosfonio lipofilo legato ad una catena alifatica, come mostrato in figura 3.50.

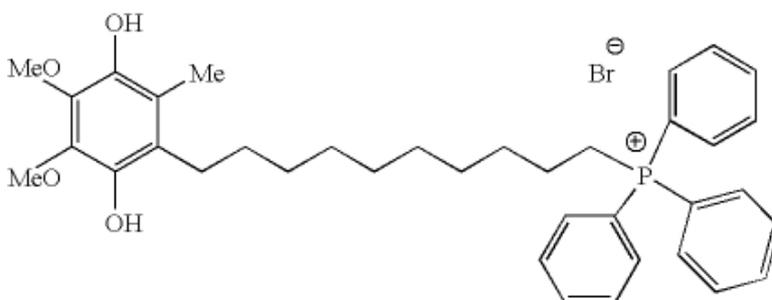


Figura 3.50 Struttura chimica del mitoQ nella forma ridotta (mitochinolo).

Grazie al gruppo cationico, la molecola entra specificatamente nei mitocondri grazie al potenziale di membrana, e il gruppo ubichinonico rimane immerso nella membrana mitocondriale interna, dove, riducendo i ROS, protegge il mitocondrio dal danno ossidativo. Inoltre la forma ossidata (mitochinone) viene di nuovo trasformata, dalla catena respiratoria mitocondriale, nella forma ridotta (mitochinolo) che è in grado di riossidarsi in presenza di ROS e continuare così il processo ciclico che protegge il mitocondrio dall'ossidazione dei ROS. Nello specifico la forma ossidata può essere ridotta dal complesso I, in grado di cedere elettroni al mitochinone grazie alla somiglianza strutturale con l'ubichinone (Kelso *et al.*, 2001).

Per testare la capacità degli antiossidanti di ridurre la mutabilità mitocondriale a 37°C del ceppo $\Delta sym1$, sono stati aggiunti al terreno di crescita durante l'analisi. In particolare l'acido diidrolipoico è stata utilizzata alla concentrazione di 30µM, mentre il MitoQ alle concentrazioni 5µM e 10µM.

Purtroppo, entrambe queste sostanze, che alla temperatura di 28°C agiscono come antiossidanti e abbattano la mutabilità del mtDNA (Fontanesi *et al.*, 2004; Baruffini *et al.*, 2006), alla temperatura di 37°C, mostrano un effetto contrario determinando un aumento della mutabilità mitocondriale anche del ceppo parentale (dato non mostrato).

Per poter quindi valutare gli effetti di queste molecole è necessario coltivare i ceppi a 28°C. Abbiamo quindi analizzato se l'aggiunta di etanolo al terreno minimo minerale addizionato di glucosio 2% determinasse un aumento della mutabilità mitocondriale nel mutante $\Delta sym1$. Come si può vedere dalla figura 3.51 anche alla temperatura ottimale, l'etanolo ha un effetto stressante in assenza di Sym1 determinando instabilità dell'mtDNA, anche se a livelli molto minori rispetto a quanto accade a 37°C.

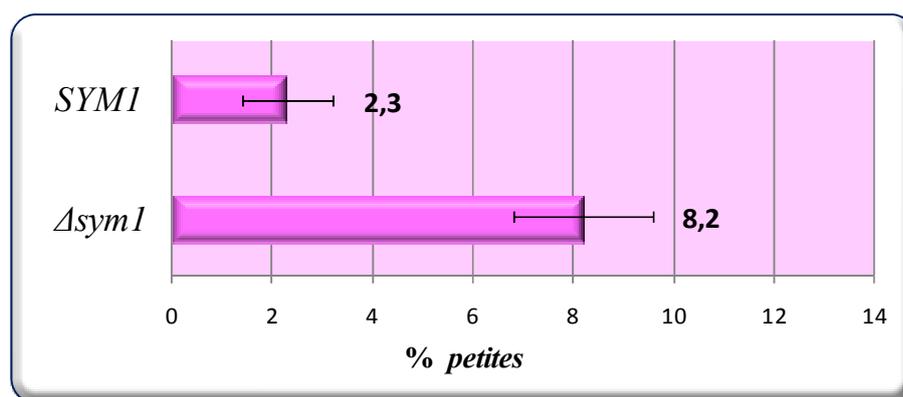


Figura 3.51 Analisi della mutabilità mitocondriale dei ceppi wild type e $\Delta sym1$ trattati con acido diidrolipoico 30 µM. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 28°C in terreno contenente glucosio 2% ed etanolo 2%.

Questa è quindi una condizione nella quale sarà possibile testare l'effetto di molecole anti-ROS. Gli esperimenti sono attualmente in corso.

3.11 MIC DEL VALPROATO

Il valproato, o acido valproico (VPA), è un farmaco molto utilizzato. È stato introdotto nel 1978 come farmaco anti-epilettico ad ampio spettro, ma successivamente, nel 1995, è stato approvato anche come farmaco per il trattamento di svariati sintomi neurologici e psichiatrici (Russell, 2007; Lheureux and Hantson, 2009). Con l'incremento del suo utilizzo sono aumentati anche i casi di tossicità associati all'assunzione di tale farmaco, in particolare in alcuni casi risulta fortemente epato-tossico.

Dato che è un farmaco spesso utilizzato nei pazienti affetti da malattie mitocondriali, comprese le sindromi da deplezione del mtDNA, risulta particolarmente importante capire se ci sono controindicazioni specifiche per determinate patologie.

Ad esempio è stato riportato di pazienti pediatriche affette da Alpers-Huttenlocher associata a mutazioni in POLG, una forma di MDDS epatocerebrale, nei quali vi era una forte epato-tossicità al valproato (Ferrari et al., 2005). Da allora si ritiene che la sua somministrazione potrebbe risultare fatale in alcuni casi di MDDS epatocerebrale.

Sarebbe quindi particolarmente utile capire se c'è il rischio di epato-tossicità nei pazienti con mutazioni in MPV17. Per questo è stato testato l'effetto del farmaco nel ceppo privo di Sym1.

L'acido valproico (VPA) consiste in un acido carbossilico a catena ramificata semplice (Figura 3.52) con una struttura chimica molto simile agli acidi grassi a catena corta.

Anche se il meccanismo d'azione del farmaco non è noto, si pensa che il VPA sia coinvolto nel potenziamento delle funzioni GABA-nergiche attraverso l'incremento sia della sintesi che del rilascio dell'acido gamma-amminobutirrico (GABA).

Il metabolismo del farmaco avviene principalmente a livello del fegato attraverso glucuronazione, β -ossidazione mitocondriale, e ossidazione citosolica.

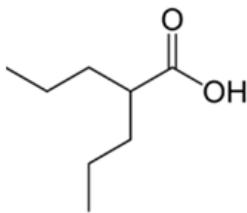


Figura 3.52 Struttura dell'acido valproico

L'esatto meccanismo dell'epatotossicità del farmaco non è del tutto noto e sono state proposte diverse teorie (figura 3.53): a) il VPA si combina con la carnitina nel pathway mitocondriale della carnitina acetiltransferasi, portando ad un estere valproilcarnitina, che viene in seguito trasportato al di fuori del mitocondrio ed eliminato tramite le urine, portando ad una deplezione delle riserve di carnitina dell'organismo; b) il VPA inibisce l'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a lunga catena attraverso un decremento della disponibilità di

CoA; c) il VPA inibisca gli enzimi coinvolti nella β -ossidazione dei metaboliti direttamente coinvolti nell'epatotossicità (Russell, 2007).

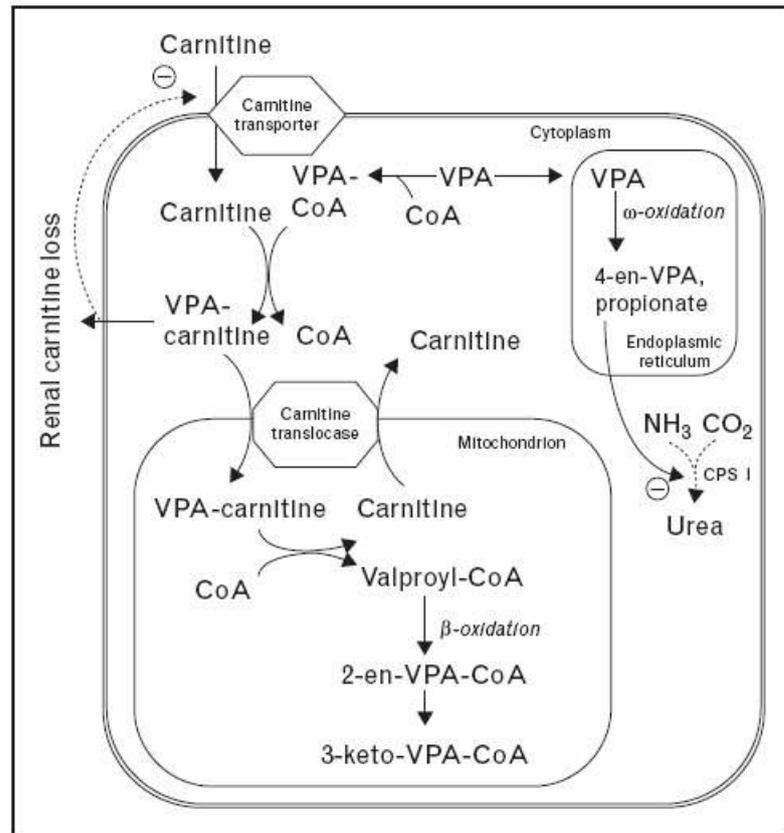


Figura 3.53 Metabolismo del valproato. (Da Russell, 2007)

E' stata determinata la minima concentrazione inibente (MIC) del valproato nel ceppo parentale e $\Delta sym1$. L'esperimento è stato fatto a 28°C in YPE. Come si può vedere dalla figura 3.54 e dalla tabella 3.5, il ceppo $\Delta sym1$ risulta più sensibile al farmaco in quanto mostra una minore MIC rispetto al ceppo parentale (10 mM vs 15 mM). Questo indica che in assenza di *SYM1* vi è una maggiore tossicità del valproato. Nonostante il meccanismo d'azione del farmaco non si conosca con esattezza, sembra che la sua somministrazione determini in qualche modo un decremento di carnitina, che è un cofattore essenziale per la β -ossidazione. La deplezione di carnitina interferisce quindi con la produzione di energia mitocondriale (Sztajnkrycer, 2002). Questo potrebbe spiegare l'intolleranza del ceppo privo di *Sym1* al valproato. Infatti, in un mutante come il $\Delta sym1$, che risulta già essere in crisi energetica, il "blocco" della β -ossidazione sicuramente aggrava la sua condizione.

Questi dati sconsigliano quindi l'uso del valproato in pazienti con mutazioni in MPV17.

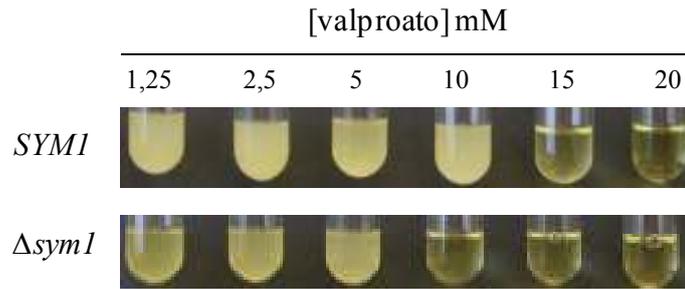


Figura 3.54 Crescita del ceppo wt e $\Delta sym1$ in YPE addizionato di differenti concentrazioni di valproato. Le colture sono state fotografate dopo il terzo giorno di incubazione a 28°C.

[valproato] mM	1,25	2,5	5	10	15	20
<i>SYM1</i>	+	+	+	+	-	-
$\Delta sym1$	+	+	+	-	-	-

Tabella 3.5 MIC al valproato del ceppo BY4741 e $\Delta sym1$. La crescita è stata valutata mediante misurazione della densità ottica della coltura cellulare, ad una lunghezza d'onda di 600 nm (OD_{600}). $OD_{600} > 1$, +; $OD_{600} < 1$, -.

3.12 COSTRUZIONE E ANALISI DI UN CEPPLO CHE ESPRIME UNA VARIANTE DI Sym1 RECANTE UN TAG PER L'IMMUNORIVELAZIONE

Per meglio comprendere la funzione della proteina Sym1, risulta particolarmente informativo, da un lato, capire se essa faccia parte di un complesso proteico e, dall'altro, identificare eventuali interattori fisici.

E' stata quindi utilizzata la tecnica della *blue native polyacrylamide gel electrophoresis* (BN-PAGE) di proteine mitocondriali, che consente di separare complessi proteici intatti, per identificare eventuali complessi sovramolecolari che comprendono la proteina Sym1. Dal momento che questa tecnica richiede l'utilizzo di anticorpi per il rilevamento della proteina, e visto che non esiste un anticorpo commerciale contro Sym1, è stato costruito un ceppo di lievito ingegnerizzato che esprime la proteina Sym1 recante un *tag*.

In particolare sono stati prodotti due diversi costrutti del gene *SYM1*: uno recante la sequenza codificante per il *tag* riconosciuto dall'anticorpo contro l'emoagglutinina (HA) e l'altro recante una sequenza codificante per il *tag* di poly-istidine (6xHis *tag*). In questo modo quindi non si rende necessaria la produzione di anticorpi specifici verso Sym1, procedura alquanto lunga e piuttosto costosa.

3.12.1 COSTRUZIONE DEI CEPPI RECANTI GLI ALLELI *SYM-HA* E *SYM-HIS*

Il gene *SYM1* è stato amplificato con i primer SYM1UP (che si appaia circa 500 pb a monte della ORF di *SYM1*) e SYM1HA per ottenere il costrutto recante l'immunosegnale HA, e SYM1UP e SYM1HIS per ottenere il costrutto recante l'immunosegnale esa-istidinico (figura 3.55). I primer SYM1HA e SYM1HIS, hanno, in ordine dal 3' al 5', una sequenza che si appaia alle 27 pb che precedono il codone di stop di *SYM1*, la sequenza codificante per il tag, il codone di stop (TAA), 13 pb che si appaiano alla regione che segue il codone di stop e il sito di restrizione necessario per il clonaggio.

In questo modo, in pratica, si "inserisce" la sequenza che codifica per il tag (HA o HIS) subito a monte del codone di stop e quindi si ottiene l'allele *SYM1-tag* che codifica per la proteina di fusione Sym1-tag. Inoltre l'amplicone contiene anche la regione promotrice di *SYM1*, ma non il terminatore completo. I prodotti di amplificazione PCR di circa 1800 pb sono stati clonati nel vettore centromerico pFL38 in modo da ottenere i plasmidi pFL38/*SYM1-HAt* e pFL38/*SYM1-HIS*t.

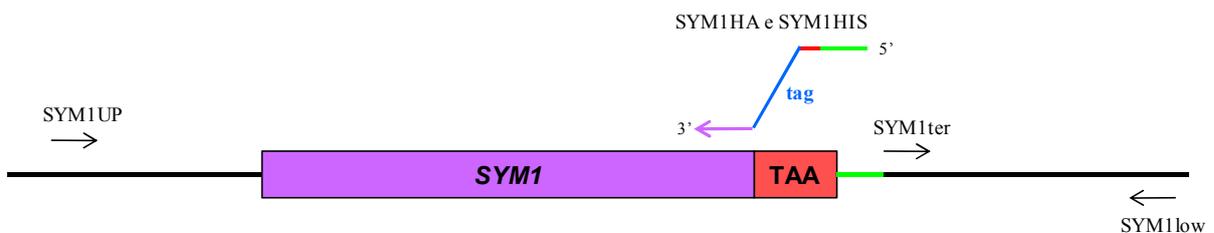


Figura 3.55 Rappresentazione schematica della posizione dei primer.

Successivamente è stato prodotto un secondo costrutto recante, oltre al promotore, anche il terminatore endogeno di *SYM1*. A questo scopo è stata amplificata tramite PCR la regione a valle della ORF di *SYM1* con i primer SYM1ter e SYM1LOW (figura 3.55). L'amplicone di circa 650 pb è stato clonato nei plasmidi pFL38/*SYM1-HAt* e pFL38/*SYM1-HIS*t, in modo da ottenere i vettori pFL38/*SYM1-HA* e pFL38/*SYM1-HIS* (figura 3.56).

Per chiarezza, sottolineo che gli alleli privi del terminatore sono stati denominati *SYM1-HAt* e *SYM1-HIS*t, mentre quelli con il terminatore completo *SYM1-HA* e *SYM1-HIS* e con questa nomenclatura sono state identificate anche le rispettive proteine.

I quattro plasmidi così ottenuti sono stati inseriti per trasformazione nel ceppo $\Delta sym1$.

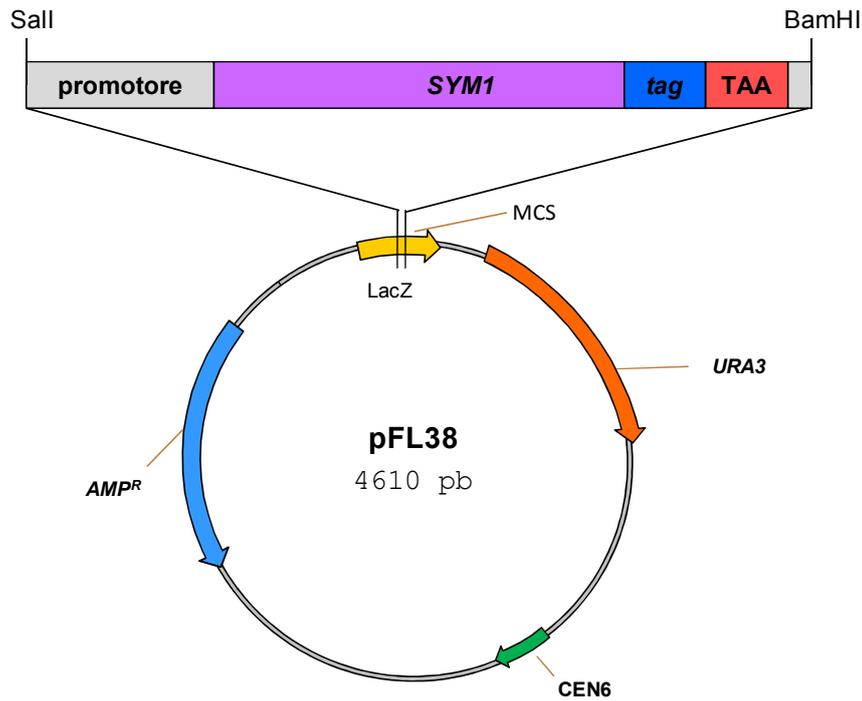
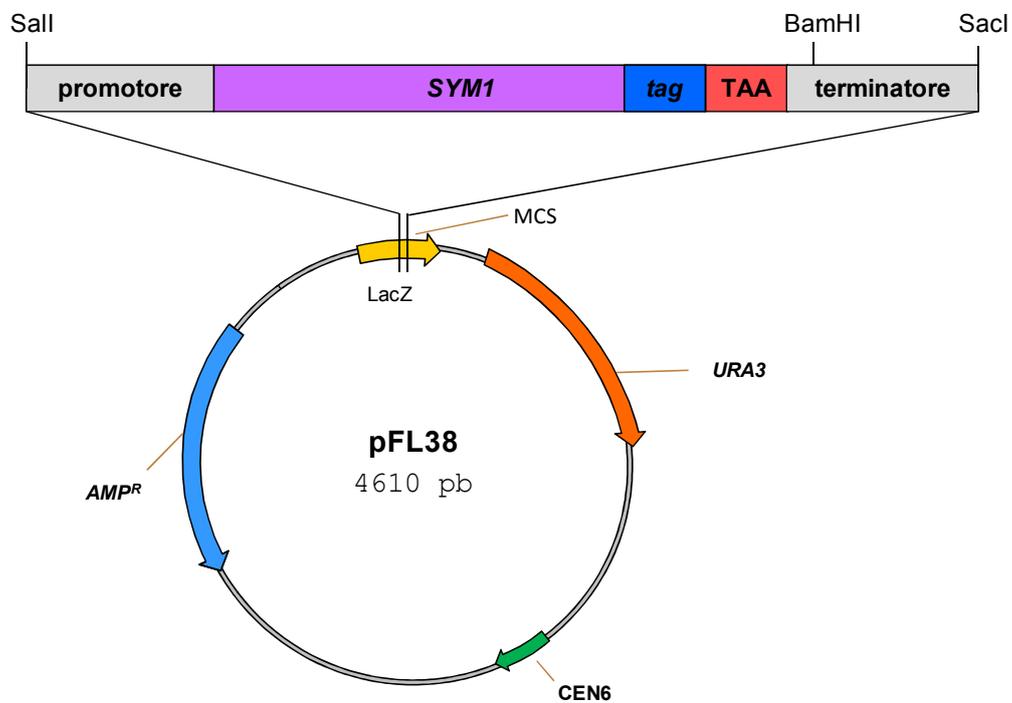
A) pFL38/*SYM1-tagt***B) pFL38/*SYM1-tag***

Figura 3.56 Rappresentazione schematica dei plasmidi che esprimono gli alleli taggati. A) pFL38/*SYM1-tagt* contenente il costrutto senza terminatore e B) pFL38/*SYM1-tag* contenente il costrutto con il terminatore.

3.12.1 ANALISI DI COMPLEMENTAZIONE

Una volta ottenuti i ceppi che esprimono Sym1 recante i due tag di interesse, con o senza terminatore, è stato necessario controllare che tali proteine di fusione fossero funzionali. Quindi è stato necessario verificare che l'introduzione degli alleli *SYMI-HAt*, *SYMI-HA*, *SYMI-HISt* e *SYMI-HIS* fossero in grado di complementare i difetti del ceppo $\Delta sym1$.

Innanzitutto è stata effettuata l'analisi di crescita ossidativa a 37°C tramite *spot assay*. Oltre ai ceppi recanti gli alleli taggati, come controllo, positivo e negativo rispettivamente, è stato utilizzato il ceppo $\Delta sym1$ trasformato con il plasmide recante *SYMI* privo del tag e con il plasmide vuoto. Come si può vedere dalla figura 3.57, gli alleli taggati sono in grado di complementare il difetto di crescita ossidativa a 37°C.

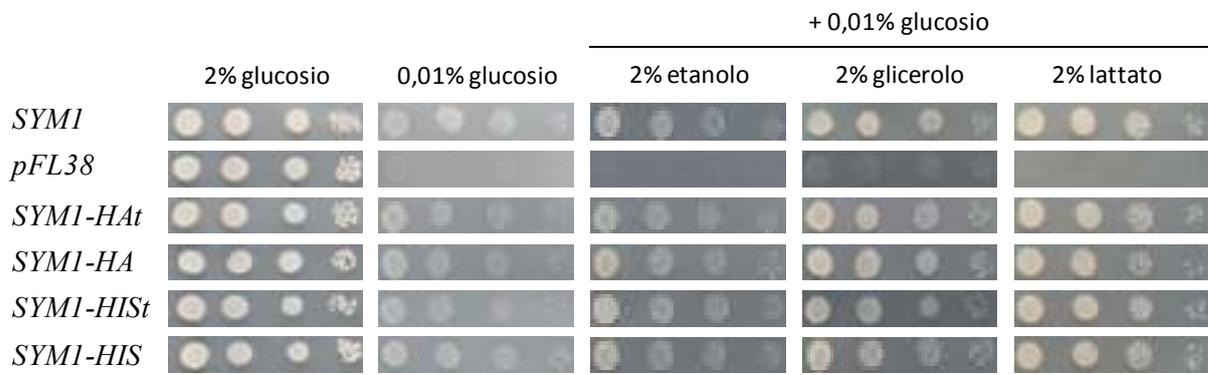


Figura 3.57 Analisi della crescita ossidativa dei ceppi $\Delta sym1$ recanti gli alleli taggati a 37°C in terreno minimo minerale (YNB).

E' stato poi controllato che questi alleli fossero in grado di complementare anche l'instabilità del genoma mitocondriale del ceppo $\Delta sym1$. L'analisi dei *petite* ha mostrato che, pur essendo tutti e quattro gli alleli in grado di migliorare il difetto, quelli con il terminatore funzionavano in maniera più efficiente, portando la percentuale dei *petite* a livelli paragonabili a quello del wild type; al contrario, gli alleli senza il terminatore complementavano solo parzialmente (figura 3.58).

Per quanto riguarda i due diversi tag, la proteina di fusione recante l'immunosegnale esatididico sembra funzionare un po' meglio rispetto alla proteina di fusione Sym1-HA.

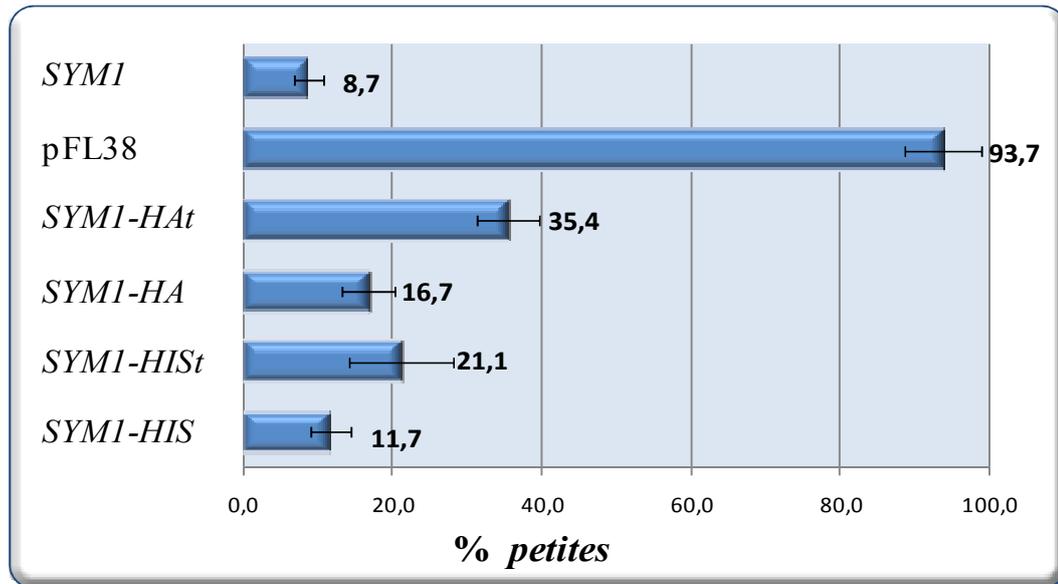


Figura 3.58 Analisi della mutabilità mitocondriale dei ceppi $\Delta sym1$ recanti gli alleli taggati. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno YNB contenete glucosio 2% ed etanolo 2%.

Complessivamente i dati indicano che la presenza dei tag non compromette la funzionalità della proteina Sym1. E' comunque stato notato che l'assenza del terminatore incide negativamente sulla funzionalità dei costrutti stessi. Questo potrebbe essere dovuto ad una minore stabilità dell'mRNA e quindi ad una minore quantità di proteina tradotta. Per confermare o smentire questa ipotesi è stata effettuata una analisi SDS-PAGE.

3.12.2 ANALISI SDS-PAGE

L'analisi SDS-PAGE è stata effettuata sulle proteine mitocondriali del ceppo $\Delta sym1$ trasformato con i costrutti pFL38/*SYM1-HAt* e pFL38/*SYM1-HA*. I ceppi sono stati fatti crescere a 37°C in terreno minimo minerale (YNB) addizionato di glucosio allo 0,6% per 24 ore. In seguito sono stati estratti i mitocondri ed è stata effettuata la corsa elettroforetica su gel di acrilammide al 15% caricando 30 µg di proteine mitocondriali. Come controllo negativo sono state utilizzate le proteine mitocondriali del ceppo $\Delta sym1$ trasformato con il plasmide pFL38/*SYM1*, codificante per Sym1 senza tag. Le proteine sono state quindi trasferite mediante *electroblotting* dal gel a una membrana di nitrocellulosa che poi è stata sottoposta ad analisi *Western* utilizzando un anticorpo primario monoclonale anti-HA. L'immunorivelazione tramite l'anticorpo contro l'epitopo dell'emoagglutinina permette in pratica di rivelare la proteina Sym1. Come si può vedere dalla figura 3.59, effettivamente la presenza del terminatore coincide con un aumento della quantità di proteina di fusione. Questi dati confermano che la presenza del terminatore porta ad un beneficio e quindi verrà utilizzato solamente tale costrutto per le analisi successive.

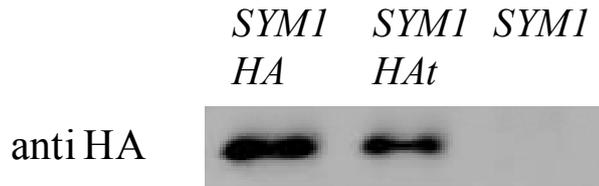


Figura 3.59 *Western blot* dell' SDS-PAGE (gel elettroforesi denaturante) effettuato sulle proteine mitocondriali del ceppo $\Delta sym1$ trasformato con i costrutti pFL38/*SYM1-HA*, pFL38/*SYM1-HAh* e pFL38/*SYM1*.

3.12.3 BLUE NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (BN-PAGE)

Dopo aver controllato accuratamente la funzionalità della proteina di fusione Sym-HA, è stato valutato se questa facesse parte di un complesso sovramolecolare. E' quindi stata effettuata un'analisi *western* sul filtro ottenuto dalla seconda dimensione della gel elettroforesi *blue native* effettuata sulle proteine mitocondriali del ceppo $\Delta sym1$ trasformato con il vettore recante l'allele *SYM1-HA*. Il ceppo è stato fatto crescere per 24 ore a 37°C in YNB addizionato di 0,6% di glucosio e successivamente sono stati estratti i mitocondri. La proteina di fusione Sym1-HA, rilevata utilizzando l'anticorpo anti HA, fa parte di un complesso ad alto peso molecolare (figura 3.60). E' inoltre stato rilevato il complesso V, che pesa circa 600 kDa, tramite l'utilizzo di un anticorpo contro la subunità 4 (Atp4). Si può quindi affermare che il complesso di cui fa parte Sym1 ha un peso molecolare maggiore di 600 kDa. E' stato rilevato anche il complesso II (SDH), tramite l'utilizzo di un anticorpo contro la subunità 2 (Sdh2), che è chiaramente distinto dal complesso che contiene Sym1. Questo dato è particolarmente interessante, perché, dato il difetto dell'attività della succinato deidrogenasi osservato nel ceppo privo di Sym1, era possibile che la proteina Sym1 interagisse direttamente con il complesso II. Questo esperimento permette di affermare che Sym1 non forma un complesso stabile con l'SDH.

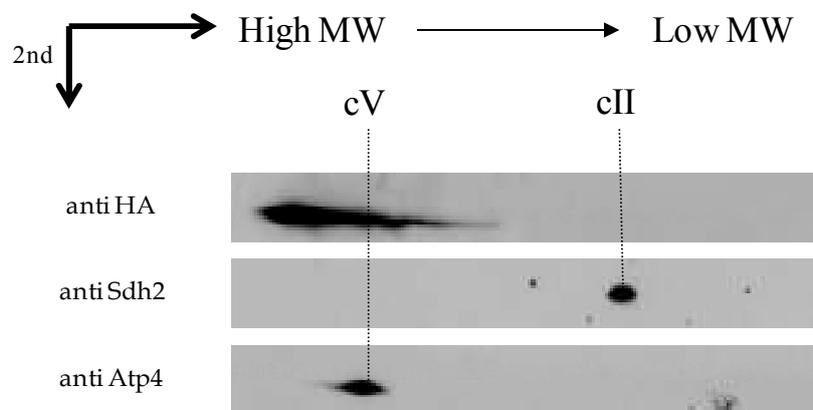


Figura 3.60 A. *Western blot* della seconda dimensione della *blue native polyacrilamide gel electrophoresis* (2D BN-PAGE) effettuato sulle proteine mitocondriali del ceppo $\Delta sym1$ trasformato con il costrutto pFL38/*SYM1-HA*.

Il fatto di aver identificato un complesso ad alto peso molecolare contenente Sym1 è un dato molto rilevante e apre le porte a uno sviluppo interessante per l'identificazione della sua funzione. Infatti la caratterizzazione del complesso potrebbe fornire importantissime informazioni riguardo alla funzione biologica di Sym1.

A tale scopo verranno effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione seguita da analisi di spettrometria di massa per identificare le proteine che fanno parte del complesso. E' proprio in questa seconda parte che verrà utilizzato l'altro costrutto molecolare prodotto: *SYM-HIS*. Infatti il tag poly-istidinico offre il vantaggio di poter utilizzare, oltre ad un anticorpo specifico, direttamente delle colonnine di nichel (o cobalto). In questo modo si può purificare il complesso in modo piuttosto semplice e in un'unica tappa.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

(II parte)

“ANALISI DI GENI OMOLOGHI DI *SYM1*”

4.1 ANALISI DEL PARALOGO DI *SYM1:YOR292C*

Il lievito *S. cerevisiae* possiede un gene paralogo di *SYM1*: *YOR292C*. La proteina Yor292c ha una similarità di sequenza del 36% rispetto a Sym1 e fa parte della famiglia di proteine Mpv17/Pmp22, come Sym1.

YOR292C viene indicata come una ORF a funzione sconosciuta. La proteina di fusione con la GFP (*green fluorescent protein*) è stata localizzata nel vacuolo.

E' stata analizzata la crescita su diverse fonti di carbonio ossidabili a 28°C e 37°C dove il delecto $\Delta yor292c$ non mostra alcun difetto di crescita (figura 4.1), suggerendo che non sia essenziale per la crescita ossidativa, almeno quando è presente *SYM1* wild type.

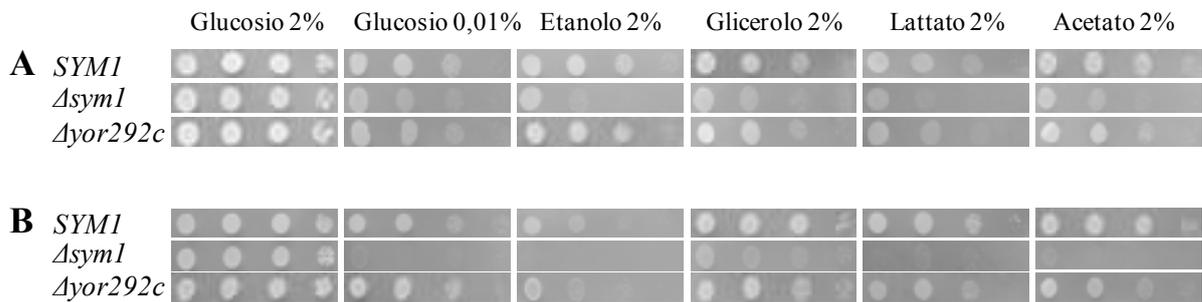


Figura 4.1 Crescita ossidativa

Anche per quanto riguarda la tolleranza all'etanolo, sia a 28°C che a 37°C, il ceppo privo di *YOR292C* non mostra alcun difetto evidente (figura 4.2 e tabella 4.1)

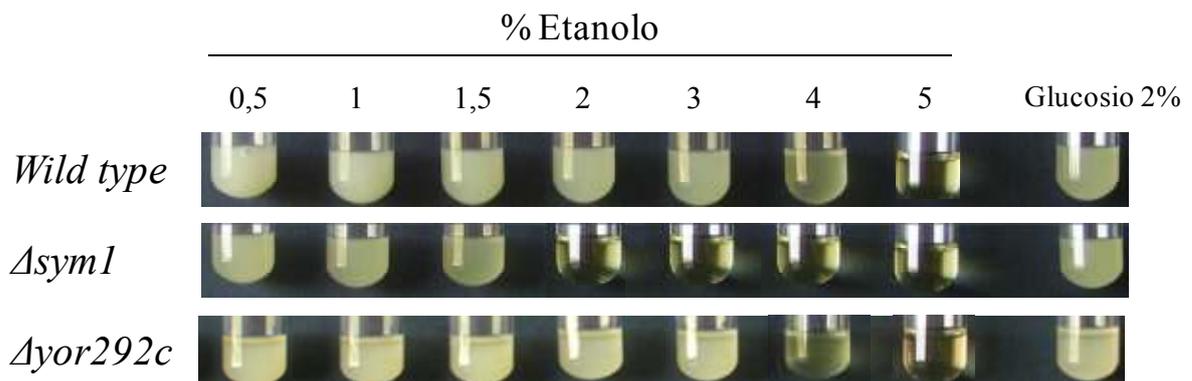


Figura 4.2 Tolleranza all'etanolo. Cellule in fase esponenziale sono state inoculate in terreno YP addizionato con differenti concentrazioni di etanolo. La crescita è stata documentata fotografando le colture cellulari dopo 3 giorni di incubazione a 37°C in agitazione.

37°C							
[Etanolo] %	0,5	1	1,5	2	3	4	5
BY4741	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 Δ <i>sym1</i>	+	+	+	-	-	-	-
BY4741 Δ <i>yor292c</i>	+	+	+	+	+	+	-

Tabella 4.1 Tolleranza all'etanolo del ceppo BY4741 Δ *sym1*. La crescita è stata valutata mediante misurazione della densità ottica della coltura cellulare, ad una lunghezza d'onda di 600 nm (OD_{600}). $OD_{600} > 1$, +; $OD_{600} < 1$, -. Tempo di crescita: 3 giorni a 28°C; 4 giorni a 37°C.

Dato che nei mammiferi, compreso l'uomo, esistono diversi paraloghi di MPV17, l'ortologo di *SYM1*, e che alcune proteine sono localizzate nei perossisomi, è stato valutato un fenotipo di crescita tipico dei geni coinvolti nei *pathway* perossisomali: la crescita in presenza di acido oleico.

Anche in questo caso, il ceppo Δ *yor292c* non presenta alcun difetto di crescita (figura 4.3). Al contrario, come atteso, il ceppo Δ *sym1* non è in grado di crescere su acido oleico. In lievito, infatti, l'utilizzo degli acidi grassi prevede due fasi: la prima avviene nei perossisomi, dove questi substrati vengono parzialmente degradati, mentre la seconda avviene nei mitocondri, dove l'ossidazione è completata e viene prodotto ATP. Per questo, i mutanti come Δ *sym1* che hanno un difetto nell'utilizzazione di fonti di carbonio non fermentabili, ovviamente non riescono neanche a utilizzare gli acidi grassi.

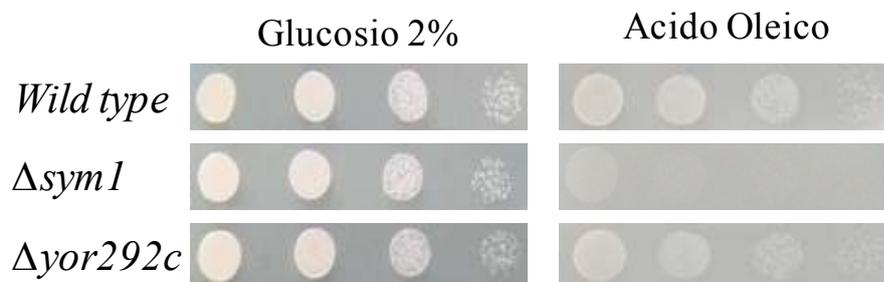


Figura 4.3 Analisi della crescita su acido oleico

E' stata effettuata anche l'analisi della mutabilità mitocondriale attraverso la determinazione della frequenza dei *petite*. Anche per questo fenotipo, non c'è differenza tra il ceppo parentale e il ceppo Δ *yor292c* (figura 4.4).

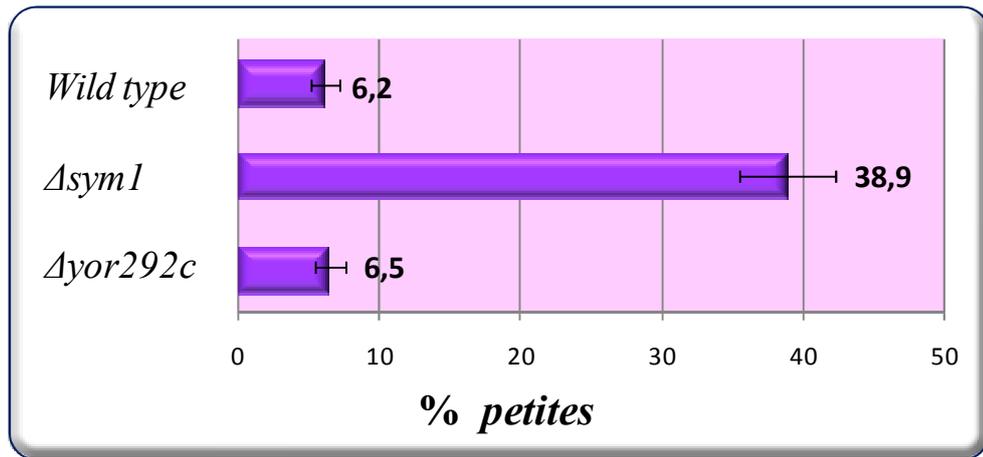


Figura 4.4 Analisi della mutabilità mitocondriale.

E' stato quindi costruito il doppio mutante $\Delta sym1 \Delta yor292c$, distruggendo *SYM1* nel contesto $\Delta yor292c$ tramite un costrutto che conferisce resistenza all'igromicina. La distruzione e la selezione del doppio mutante è stata eseguita come nel caso del doppio delecto $\Delta sym1 \Delta odc1$, quindi si rimanda a quel paragrafo per i dettagli.

4.1.2 ANALISI DOPPIO DELETO $\Delta sym1 \Delta yor292c$

E' stata innanzitutto valutata la crescita ossidativa tramite analisi *spot assay*, sia in terreno ricco (YP) che in terreno minimo minerale (YNB). Non si osserva alcun peggioramento significativo del fenotipo del doppio delecto $\Delta sym1 \Delta yor292c$ rispetto al singolo delecto $\Delta sym1$ né alla temperatura di 28°C (dato non mostrato), né alla temperatura di 37°C (figura 4.5).

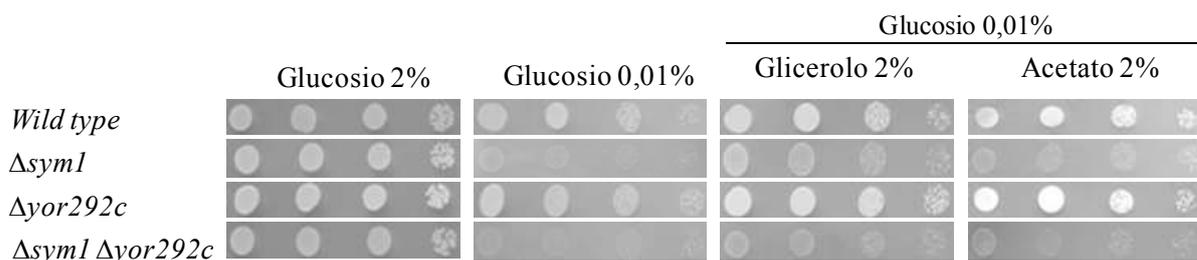


Figura 4.5 Fenotipo di crescita ossidativa a 37°C. Sono state seminate 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cellule ottenute da colture in fase esponenziale attraverso diluizioni seriali su piastre di terreno minimo (YNB) addizionate con le fonti di carbonio indicate. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 37°C.

Risultati analoghi sono stati ottenuti per quanto riguarda la tolleranza all'etanolo. Infatti, il doppio delecto $\Delta sym1 \Delta yor292c$ mostra la stessa MIC all'etanolo rispetto al singolo delecto $\Delta sym1$ (figura 4.6 e tabella 4.2)

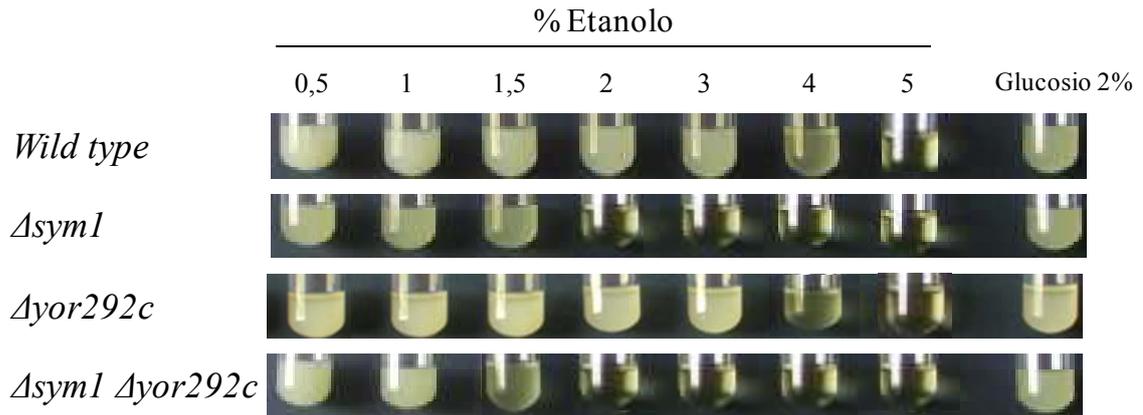


Figura 4.6 Tolleranza all'etanolo. Cellule in fase esponenziale sono state inoculate in terreno YP addizionato con differenti concentrazioni di etanolo. La crescita è stata documentata fotografando le colture cellulari dopo 3 giorni di incubazione a 37°C in agitazione.

37°C							
[Etanolo] %	0,5	1	1,5	2	3	4	5
BY4741	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 <i>Δsym1</i>	+	+	+	-	-	-	-
BY4741 <i>Δyor292c</i>	+	+	+	+	+	+	-
BY4741 <i>Δsym1 Δyor292c</i>	+	+	+	-	-	-	-

Tabella 4.2 Tolleranza all'etanolo del ceppo BY4741 *Δsym1*. La crescita è stata valutata mediante misurazione della densità ottica della coltura cellulare, ad una lunghezza d'onda di 600 nm (OD_{600}). $OD_{600} > 1$, +; $OD_{600} < 1$, -. Tempo di crescita: 3 giorni a 28°C; 4 giorni a 37°C.

Infine, anche per quanto riguarda la mutabilità mitocondriale a 37°C, non si riscontrano differenze significative tra il singolo delecto *Δsym1* e il doppio delecto *Δsym1 Δyor292c* (figura 4.7).

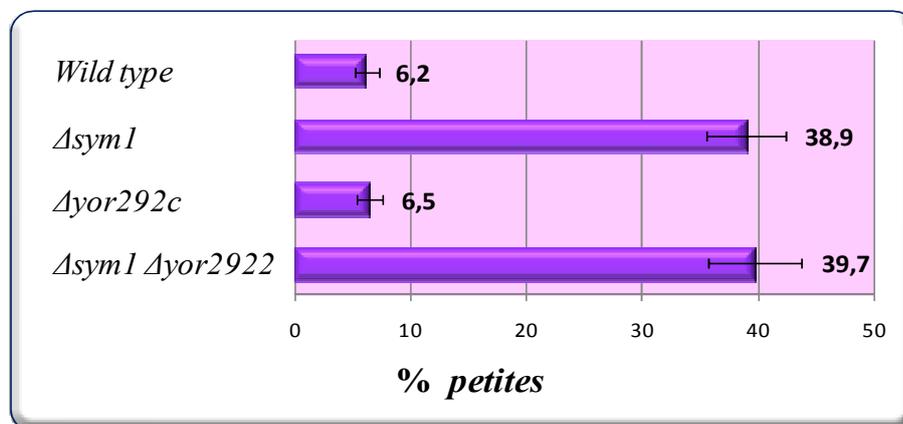


Figura 4.7 Analisi della mutabilità mitocondriale. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 7 generazioni a 37°C in terreno minimo minerale contenete glucosio 2% ed etanolo 2%.

Complessivamente i dati indicano che *YOR292C* non ha alcun ruolo né nella crescita ossidativa/tolleranza all'etanolo, né nella stabilità del DNA mitocondriale, né in un contesto *SYMI* né in un contesto *Δsym1*.

Dato che non è stato trovato alcun difetto evidente né del singolo delecto *Δyor292* né nel doppio delecto *Δsym1 Δyor292*, non è possibile dire nulla sulla eventuale funzione di *Yor292c*.

4.2 ANALISI DI COMPLEMENTAZIONE DEI GENI UMANI

MPV17 fa parte di una famiglia di proteine: Mpv17/Pmp22. Nell'uomo esistono quattro paraloghi: *MPV17*, *MPV17-like*, *FKSG24* e *PMP22*.

Mpv17p e Fksg24p sono a localizzazione mitocondriale, Pmp22p è una proteina perossisomale e Mpv17-like è presente in entrambi gli organelli (Zeviani, comunicazione personale).

Come già dimostrato il gene umano MPV-17 è in grado di complementare il difetto del ceppo di lievito privo di *SYMI* (Trott and Morano 2004; Spinazzola et al. 2006). Nulla invece si sa degli effetti che altri paraloghi umani hanno sul mutante di lievito. E' stato quindi valutato se l'espressione di due di questi geni, *FKSG24* o *PMP22*, fosse in grado di complementare il fenotipo del ceppo *Δsym1*.

A tale scopo il delecto *Δsym1* è stato trasformato con il vettore d'espressione pYEX recante i vari geni umani: *MPV17*, *FKSG24* o *PMP22*. Come controllo negativo, il ceppo è stato trasformato anche con il plasmide vuoto.

Il primo fenotipo valutato è stata la crescita ossidativa a 37°C. Come si può vedere dalla figura 4.8, l'introduzione del gene umano MPV-17 è in grado di complementare, anche se non totalmente, il difetto del ceppo *Δsym1*, come precedentemente dimostrato (Trott e Morano, 2004; Spinazzola et al., 2006). Anche l'introduzione del gene umano FKSG24, che codifica per una proteina mitocondriale, è in grado di complementare parzialmente il difetto OXPHOS del ceppo *Δsym1*, indicando che entrambe le proteine umane sono in grado di "sostituirsi" a *Sym1*. Viceversa, l'introduzione del gene umano PMP22, che codifica per una proteina perossisomale, non è in grado di ripristinare la crescita ossidativa.

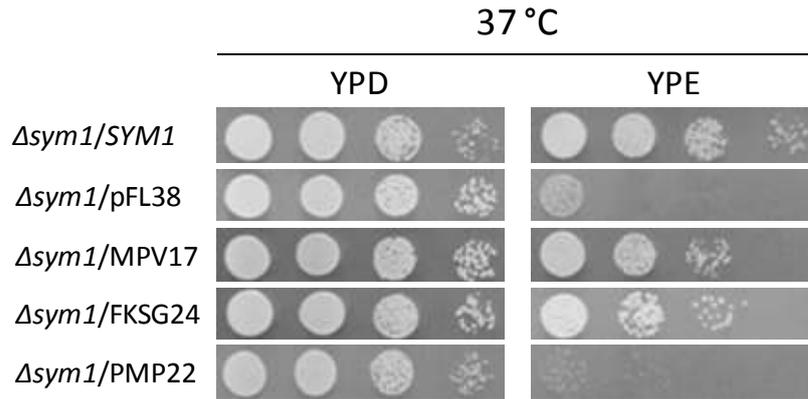


Figura 4.8 Spot assay a 37°C del ceppo *Δsym* trasformato con il plasmide vuoto e i plasmidi recanti il gene di lievito *SYM1* e i geni umani MPV17, FKSG24 e PMP22.

Il fatto che l'ortologo umano sia in grado di compensare il difetto OXPHOS, indica che la proteina umana espressa nel lievito viene prodotta a livelli sufficienti per la funzionalità e che, almeno una frazione, ha una corretta localizzazione. La complementazione però non è totale e questo è abbastanza comune in quanto il *codon usage* tra uomo e lievito è piuttosto diverso e quindi è plausibile una minore espressione del gene umano e ciò potrebbe giustificare la minore funzionalità.

La parziale complementazione potrebbe inoltre essere dovuta al fatto che le proteine umane non sono in grado di interagire in maniera ottimale con i normali interattori di Sym1.

Inoltre è stato valutato se l'introduzione dei geni umani nel ceppo *Δsym1* fosse in grado di compensare anche l'instabilità del genoma mitocondriale, il secondo importante fenotipo caratteristico del ceppo privo di *SYM1*.

Quindi è stata determinata la percentuale di mutanti *petite* nei vari ceppi. In nessun caso i geni umani sono stati in grado di complementare il difetto "instabilità del genoma mitocondriale" caratteristico del ceppo *Δsym1* (figura 4.9).

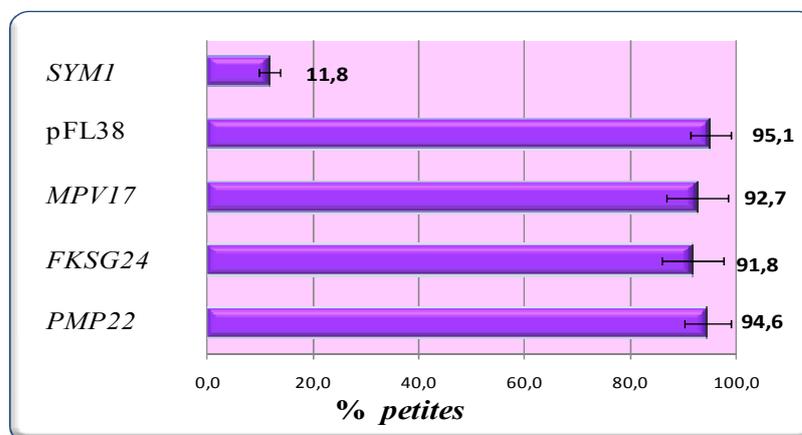


Figura 4.9 Mutabilità mitocondriale del ceppo *Δsym1* esprimente i vari geni da testare. E' riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno minimo minerale contenente glucosio 2% ed etanolo 2%.

Dato che Sym1 è stato trovato in un complesso ad alto peso molecolare è abbastanza ovvio pensare che per la sua funzione la proteina debba interagire stabilmente con varie proteine e quindi è comprensibile che la proteina umana Mpv17, seppur omologa funzionalmente e con una buona similarità di sequenza (~60%), non sia in grado di sostituire la proteina di lievito in modo efficiente.

Più difficile è invece argomentare sul fatto che l'ortologo umano sia in grado di compensare il difetto OXPHOS, ma non l'instabilità dell'mtDNA. Una possibile interpretazione è che MPV17 riesca a rendere il complesso sufficientemente funzionale relativamente al suo ruolo nella OXPHOS ma non riesca a vicariare la funzione di Sym1 necessaria per il mantenimento dell'integrità del mtDNA, ad esempio nell'interazione con la membrana interna mitocondriale alla quale l'mtDNA è legato o a proteine che sono associate all'mtDNA.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

(III parte)

“ANALISI DELL’ORF IPOTETICA *YLR252W*”

Il gene *SYM1* (YLR251W) è parzialmente sovrapposto ad una ORF dubbia: *YLR252W* (figura 5.1) (The *Saccharomyces* Genome Database (SGD); <http://www.yeastgenome.org>; Engel *et al.*, 2010).

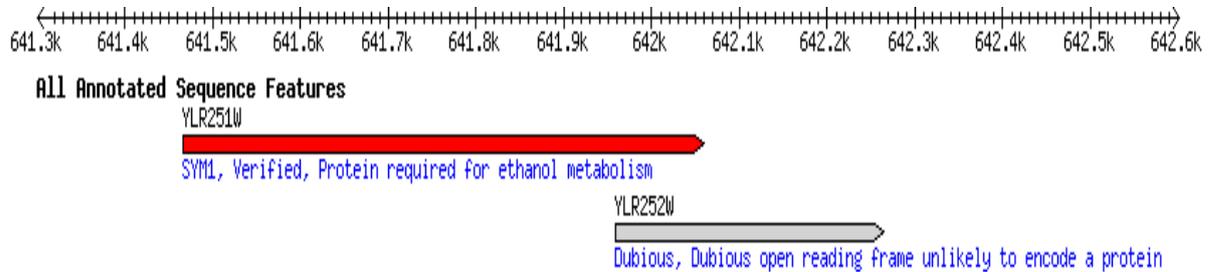


Figura 5.1 Schema della regione genomica che contiene le due ORF sovrapposte.

Uno *screening* effettuato sulla collezione EUROSCARF, eseguita nel nostro laboratorio, aveva peraltro identificato un fenotipo OXPPOS del mutante a 37°C.

E' stato quindi analizzato in maniera più dettagliata il fenotipo di crescita ossidativa del delecto $\Delta ylr252w$ della collezione EUROSCARF tramite *spot assay*. L'analisi è stata effettuata sia in terreno massimo (YP) che in terreno minimo minerale (YNB). Come fonti di carbonio è stato utilizzato glucosio 2% come controllo positivo, lattato 2%, etanolo 2% e glucosio 0,01%. Nel caso del terreno minimo (YNB) alle fonti di carbonio non fermentabili (lattato ed etanolo) è stato necessario aggiungere glucosio 0,01% per garantire la crescita del ceppo parentale. Come si può osservare il ceppo $\Delta ylr252w$ presenta un fenotipo OXPPOS simile a quello del mutante $\Delta sym1$ (ridotta crescita a 37°C su terreno contenente fonti di carbonio ossidabili), se non addirittura più grave (figura 5.2).

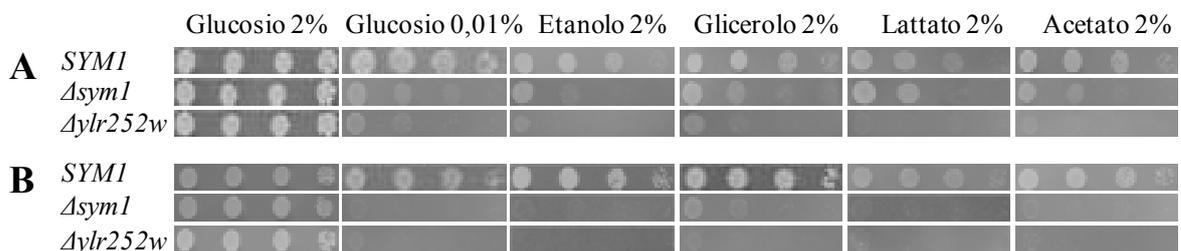


Figura 5.2 Analisi della crescita ossidativa del ceppo parentale, del $\Delta sym1$ e $\Delta ylr252w$ a 37°C.

Però, nella costruzione del delecto $\Delta ylr252w$ presente nella collezione EUROSCARF, la rimozione dell'ORF dubbia *YLR252W* ha interessato anche una parte del gene *SYM1*, in particolare la regione 3' che è sovrapposta all'ORF dubbia.

E' quindi la mancanza di questa regione del gene *SYMI* a conferire il fenotipo respiratorio deficiente a 37°C al ceppo $\Delta ylr252w$, oppure la ORF dubbia *YLR252W* codifica per una proteina importante per la crescita ossidativa?

Per rispondere a questa domanda è stato inizialmente analizzato il fenotipo del mutante $\Delta ylr252w$ trasformato con due diversi costrutti clonati in plasmidi monocopia. Il primo costrutto recava entrambe le ORF, *SYMI* e *YLR252W* con le regioni regolatrici endogene. Questo è stato ottenuto tramite PCR utilizzando primer esterni a entrambe le ORF (figura 5.3a). Ci si attende che la sua introduzione sia in grado di complementare il difetto del mutante $\Delta ylr252w$. Il secondo costrutto, invece, conteneva il solo gene *SYMI* con il proprio promotore ma non il terminatore. E' stato quindi utilizzato un plasmide, gentilmente donato da Kevin Morano, in cui la regione codificante *SYMI* è stata clonata *in frame* con il gene che codifica per la *green fluorescent protein* (GFP) (Trott and Morano, 2004). Per ottenere questo costrutto la ORF di *SYMI* e circa 650 pb a monte del codone di inizio sono stati amplificati tramite PCR e l'amplicone è stato clonato nel plasmide centromerico pRS416GPD contenente il terminatore di *CYCI*. E' stato generato un sito NotI interno al codone di stop di *SYMI* in modo da poter inserire il frammento codificante per la GFP al 3' di *SYMI*. In questo modo è stato ottenuto un gene di fusione *SYMI-GFP* sotto il controllo del promotore di *SYMI* e il terminatore del plasmide (figura 5.3b). L'utilizzo di questo secondo costrutto ci permette di valutare se il difetto OXPHOS del ceppo $\Delta ylr252w$ sia causato dalla delezione della porzione finale di *SYMI*.

A) *SYM1-YLR252W*



B) *SYM1*



Figura 5.3 Rappresentazione schematica dei costrutti molecolari utilizzati.

Dopo aver introdotto questi costrutti, e il plasmide vuoto come controllo negativo, nel ceppo $\Delta ylr252w$, è stata valutata la crescita ossidativa tramite *spot assay* a 37°C in terreno ricco (YP) e minimo minerale (YNB) addizionati di glucosio 2%, come controllo positivo, glicerolo 2%, lattato 2% e etanolo 2%.

L'introduzione di entrambi i costrutti molecolari complementa il fenotipo del ceppo $\Delta ylr252w$ su tutte le fonti di carbonio testate. Il fatto che anche l'espressione della sola ORF *SYMI* ripristini il fenotipo selvatico del mutante $\Delta ylr252w$ suggerisce che il suo fenotipo OXPPOS dipenda dalla mancanza dell'ultima porzione del gene *SYMI*, che è deleta in tale ceppo in quanto sovrapposta alla ORF di interesse (figura 5.4).

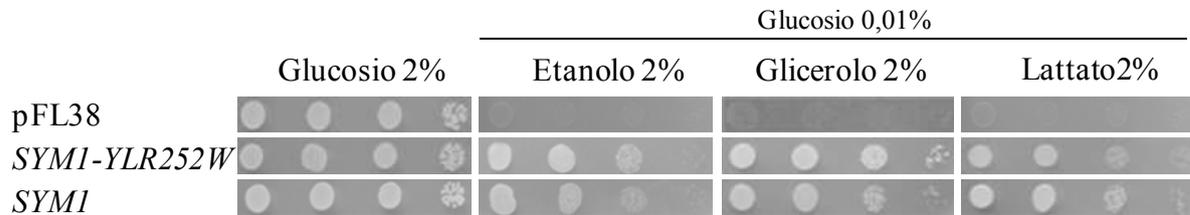


Figura 5.4 Crescita ossidativa del ceppo $\Delta ylr252w$ in cui è stato introdotto il plasmide vuoto, il costrutto recante *SYMI* e il costrutto recante entrambe le ORF (*SYMI* e *YLR252W*).

Una serie di analisi bioinformatiche, qui di seguito descritte, suggeriscono peraltro che *YLR252W* non sia una regione codificante.

E' stata innanzitutto ottenuta l'ipotetica sequenza proteica traducendo l'ORF *YLR252W* ed è stata eseguita un'analisi BlastP (protein-Blast) in modo da identificare quali organismi possiedono una proteina "simile". La ricerca in banca dati ha rivelato che solo *S. cerevisiae* avrebbe tale proteina.

Inoltre, è stato effettuato un BlastN (nucleotide-Blast) ristretto ai funghi, utilizzando come *entry* la sequenza contenente sia *SYMI* che *YLR252W*. Questa regione è stata trovata in altri tre funghi: *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis* e *Pichia pastoris*. Innanzitutto il codone di inizio della ORF *YLR252W* (ATG) non è conservata in *K. lactis*, quindi in questo organismo non c'è la ORF sovrapposta. Inoltre, in *C. glabrata* e *P. pastoris*, pur essendo conservato il codone di inizio, non esiste l'ORF sovrapposta, in quanto nella regione a valle dell'ATG è presente dopo pochi codoni un codone di stop.

Questi dati sfavoriscono fortemente l'ipotesi che *YLR252W* codifichi per una proteina, supportando l'ipotesi che il fenotipo del delete $\Delta ylr252w$ sia in realtà dovuto alla delezione della porzione 3' di *SYMI*. Il fatto che $\Delta ylr252w$ abbia un fenotipo peggiore rispetto al mutante $\Delta sym1$ potrebbe dipendere dal fatto che la presenza della proteina Sym1 tronca produce più danni rispetto all'assenza della proteina.

6. CONCLUSIONI

Il ceppo *Δsym1* presenta un chiaro fenotipo mutato solo in condizioni di stress (elevata temperatura e presenza di etanolo) indicando per Sym1 un ruolo nella tolleranza allo stress, in accordo con quanto ipotizzato precedentemente (Trott and Morano, 2004). Inoltre *SYM1* è indotto in cellule prive di DNA mitocondriale indicando per questa proteina un ruolo nella risposta retrograda. A conferma di ciò, l'induzione di *SYM1* è abolita nei mutanti privi dei regolatori positivi del *pathway*, *Artg1* e *Artg3* (Liu and Butow, 2006). Sia nel lievito che nell'uomo, la regolazione retrograda viene indotta da disfunzioni mitocondriali e scatena un meccanismo di adattamento che implica l'espressione di vari geni: geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo energetico, nel *nutrient sensing*, nel trasporto e nei pathway di stress (Epstein *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2003). In accordo con un ruolo di Sym1 in risposta ai vari stress, l'analisi della regione promotrice ha identificato numerosi potenziali siti di legame di fattori di trascrizione, la maggior parte dei quali sono coinvolti nella risposta a stress di varia natura.

Alla temperatura di 37°C, il mutante *Δsym1* mostra un ampio spettro di difetti: i) diminuzione/assenza di crescita su fonti di carbonio ossidabili come etanolo, acetato, lattato e glicerolo (difetto OXPHOS); ii) maggiore sensibilità all'etanolo; iii) alterata morfologia dei mitocondri (i mitocondri sono sferici con *crístae* mitocondriali appiattite o assenti e vi è la presenza di corpi elettrondensi); iv) elevata instabilità del genoma mitocondriale; v) diminuzione della quantità e dell'attività del complesso della succinato deidrogenasi; vi) difetto nell'accumulo del glicogeno.

Complessivamente i dati ottenuti indicano che il difetto di crescita ossidativa e l'instabilità dell'mtDNA sono indipendenti l'uno dall'altro. Da un lato, il difetto OXPHOS non è la conseguenza dell'instabilità dell'mtDNA, in quanto sono state identificate condizioni sperimentali che determinano un arresto della crescita ossidativa senza aumento di colonie *petite*. Dall'altro lato, l'instabilità del genoma mitocondriale non è la conseguenza del difetto OXPHOS in quanto, dopo trasferimento e mantenimento del mutante *Δsym1* in presenza di fonti di carbonio ossidabili, le cellule non hanno mostrato instabilità del genoma mitocondriale, in altre parole non sono diventate *petite*. Una prova ulteriore a supporto dell'indipendenza dei fenotipi è consistita nell'identificazione di soppressori multicopia e metabolici in grado di compensare in maniera totalmente diversa l'uno o l'altro fenotipo. L'overespressione sia di *YMCI* che di *ODCI* sopprime infatti il difetto di crescita, ma solo il primo gene è in grado di sopprimere completamente anche il fenotipo di elevata mutabilità mitocondriale. Viceversa, solo l'overespressione di *ODCI*, e non di *ODC2*, è in grado di compensare il difetto di crescita ossidativa nonostante entrambi riducano con la stessa

efficienza l'instabilità mitocondriale. Infine, l'aggiunta al terreno di coltura degli aminoacidi glutammato, glutammina, aspartato e asparagina migliora il difetto OXPHOS ma solo parzialmente il difetto *petite* e in modo Sym1-indipendente.

Quale ruolo si può ipotizzare per Sym1 nel metabolismo OXPHOS? Il miglioramento della crescita ossidativa osservato quando venivano aggiunti al terreno di coltura glutammato, glutammina, aspartato e asparagina suggerisce che ci sia un difetto nella produzione di loro derivati comuni come l' α -chetoglutarato e l'ossalacetato, supportando l'ipotesi che Sym1 sia coinvolto nel controllo omeostatico degli intermedi del ciclo di Krebs. A questo proposito abbiamo dimostrato che il mutante $\Delta sym1$ ha una ridotta attività della succinato deidrogenasi, un enzima che fa parte del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e ciò è compatibile con la riduzione o lo sbilanciamento di intermedi del ciclo di Krebs.

Al contrario le attività degli altri enzimi del TCA che abbiamo misurato (citrato sintasi – CS, isocitrato deidrogenasi – IDH, e malato deidrogenasi – MDH) risultano normali. E' interessante notare che l'SDH è l'unico enzima del ciclo di Krebs a essere localizzato nella membrana mitocondriale interna, nella quale è inserita la proteina Sym1. Si potrebbe ipotizzare che la mancanza di tale proteina possa compromettere l'assemblaggio/inserimento nella membrana/stabilità del complesso SDH e di conseguenza ridurre l'attività enzimatica. In questa ottica verrebbe ipotizzato per Sym1 un ruolo strutturale.

Una riduzione dell'attività succinato deidrogenasica è stata osservata anche nel fegato di due pazienti con mutazioni in MPV17: la mutazione omozigote c.70+5G>A in posizione +5 nell'introne 1 (Navarro-Sastre *et al.*, 2008) e la mutazione 498C>A che determina la sostituzione aminoacidica N166K (Sarzi *et al.*, 2007b). Questi sembrano comunque dei casi occasionali in quanto lo stesso difetto non è stato osservato né nella maggior parte dei pazienti (Spinazzola *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007; Kaji *et al.*, 2009), né nel topo *Mpv17^{-/-}* modello per la forma epatocerebrale della sindrome da deplezione del mtDNA (Viscomi *et al.*, 2009). Questa differenza potrebbe essere dovuta alla presenza nell'uomo di almeno tre proteine simili a Mpv17 (M. Zeviani, comunicazione personale) che sono localizzate o nei mitocondri, o nei perossisomi, o in entrambi gli organelli e la cui espressione potrebbe parzialmente compensare le conseguenze derivanti dalla presenza della proteina Mpv17 mutata. Nel lievito *S. cerevisiae*, infatti, non esiste questa ridondanza. Esiste un paralogo di *SYM1*, ma questo non sembra coinvolto né nella fosforilazione ossidativa, né nella tolleranza all'etanolo e tanto meno nel mantenimento della stabilità dell'mtDNA, indicando che non ha una funzione sovrapponibile a *SYM1*. A supporto dell'omologia funzionale oltreché strutturale delle proteine mitocondriali umane Mpv17 è l'osservazione che l'espressione nel ceppo di lievito

Δsym1 di entrambe le proteine mitocondriali umane, ma non della proteina perossisomale, è in grado di complementare il fenotipo OXPHOS.

Sono stati inoltre identificati due soppressori multicopia del difetto metabolico del ceppo *Δsym1*: *YMCI* e *ODCI*, entrambi codificanti per trasportatori mitocondriali. Questi trasportatori, di cui non è completamente chiaro il ruolo, sono sicuramente importanti nella coordinazione tra perossisomi e mitocondri, permettendo il rifornimento mitocondriale di intermedi del ciclo di Krebs che derivano dalla degradazione degli acidi grassi. Mentre lo specifico substrato di *Ymc1* non è noto, *Odc1* è un antiporto e trasporta diversi intermedi del ciclo di Krebs quali α -chetoglutarato e citrato attraverso la membrana mitocondriale e quindi controlla il *pool* mitocondriale e citoplasmatico di queste molecole (Palmieri *et al.*, 2001). *Odc1* e *Ymc1* potrebbero avere un ruolo anaplerotico nel ciclo dell'acido citrico, trasferendo intermedi dai perossisomi ai mitocondri, contribuendo così all'utilizzo di substrati energetici, come ad esempio acidi grassi (Trotter *et al.*, 2005).

Qual'è il meccanismo di soppressione di *Ymc1* e *Odc1*? Per capire se *Sym1* faccia parte dello stesso *pathway* metabolico di *YMCI* o *ODCI* sono stati costruiti e analizzati i fenotipi dei doppi mutanti. *Δsym1 Δymc1* e *Δsym1 Δodc1* hanno un fenotipo aggravato rispetto a quello del singolo mutante *Δsym1* indicando che *Ymc1* e *Odc1* non appartengono allo stesso *pathway* di *Sym1* e suggerendo che il meccanismo di soppressione potrebbe creare un *bypass*. L'aggravamento del fenotipo suggerisce inoltre che un parziale difetto del TCA, probabilmente dovuto alla riduzione dell'attività SDH, venga peggiorato da una concomitante riduzione del rifornimento del ciclo di Krebs. In accordo con ciò, la soppressione del fenotipo del mutante *Δsym1* da overespressione dei trasportatori *Ymc1* e *Odc1* sarebbe dovuta a un incremento nel trasporto di intermedi del ciclo dell'acido citrico.

Una delle molecole trasportate da *Odc1* è il citrato. Per valutare se la soppressione da parte di *Odc1* fosse strettamente legata a un aumento del trasporto del citrato in quanto nel mutante *Δsym1* il suo ingresso nel mitocondrio era compromesso o in quanto era compromesso il ciclo di Krebs, è stato analizzato l'effetto della delezione dei geni che codificano la citrato sintasi perossisomale (*CIT2*) e la citrato sintasi mitocondriale (*CIT1*) sul mutante *Δsym1*. Se fosse stato un problema di trasporto ci saremmo aspettati un peggioramento del fenotipo solamente nel mutante *Δsym1 Δcit11* in quanto in tale mutante il citrato veniva prodotto a livello del perossisoma. L'osservazione che entrambi i doppi mutanti *Δsym1 Δcit11* e *Δsym1 Δcit2* hanno un fenotipo peggiore rispetto a quello del singolo delecto *Δsym1* indica che il problema non è unicamente di trasporto e può essere spiegato da un utilizzo difettoso del citrato in condizioni di stress.

Il gene *ODCI* è stato recentemente identificato come soppressore multicopia di un mutante deleto del gene *FMCI*, che codifica per una proteina mitocondriale coinvolta nell'assemblaggio/stabilizzazione della F_0 - F_1 ATP sintasi alla temperatura di 37°C (Schwimmer *et al.*, 2005). Il meccanismo di *rescue* proposto per *ODCI* riguarda un aumento del flusso degli intermedi del ciclo di Krebs dai perossisomi ai mitocondri, con un concomitante aumento della sintesi di ATP mitocondriale attraverso la fosforilazione a livello di substrato. Questo stesso meccanismo potrebbe contribuire alla soppressione *ODCI*-dipendente del fenotipo del mutante *Δsym1*.

Nel complesso i dati indicano che i *pathway* anaplerotici mitocondriali correlati al ciclo di Krebs sono difettivi in mancanza di Sym1. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che l'accumulo di glicogeno è ridotto nel ceppo *Δsym1*. La quantità di glicogeno dipende dalla gluconeogenesi, che a sua volta è dipendente dal flusso di intermedi del ciclo di Krebs dai mitocondri al citosol (Dickinson, 1999). La ridotta attività della succinato deidrogenasi osservata in assenza di Sym1 è compatibile con un decremento degli intermedi del ciclo del citrato, che a loro volta sono necessari per la sintesi di glicogeno. Infatti, in un mutante della subunità Sdh2, che mostra una attività del complesso SDH ridotta di circa il 50%, difetto paragonabile a quanto osservato nel mutante *Δsym1*, mostra un decremento dell'accumulo di glicogeno in condizioni di stress (37°C).

L'incapacità del mutante *Δsym1* di accumulare glicogeno può parzialmente spiegare la difficoltà del ceppo di adattarsi agli stress, infatti il glicogeno è una riserva energetica della cellula importante nell'adattamento alla crescita respiratoria, nella carenza di nutrimento e nello stress (Lillie and Pringle, 1980; François and Parrou, 2001).

Vale la pena di ricordare che pazienti con mutazioni in MPV17 soffrono di gravi, a volte fatali, crisi ipoglicemiche. I dati ottenuti in lievito porterebbero a ipotizzare che queste possano essere dovute ad una carenza di glicogeno nel fegato, fornendo una possibile spiegazione di questo fenotipo clinico, e suggerendo un approfondimento analitico di questo aspetto nei pazienti.

Per quanto riguarda l'alterata morfologia mitocondriale, i nostri dati indicano che Sym1 sia cruciale per il mantenimento delle *cristae* mitocondriali in condizioni di stress. Inoltre, il fatto che si osservi la scomparsa delle *cristae* indipendentemente dal fenotipo *petite* indica che l'effetto morfogenetico di Sym1 probabilmente precede, e forse determina, l'instabilità del genoma mitocondriale. Un'anomala morfologia delle *cristae* è ritenuta responsabile dell'instabilità del mtDNA in svariati mutanti di lievito (Contamine and Picard, 2000; Stuart, 2008).

La scomparsa delle *cristae* mitocondriali, l'osservazione di corpi elettrondensi, e la proliferazione di organelli sferici è stata osservata anche nelle cellule di fegato dei topi Mpv17^{-/-} (Viscomi *et al.*, 2009). Inoltre, anche in alcuni pazienti è stata osservata la presenza di mitocondri con *cristae* distorte o dilatate (Wong *et al.*, 2007).

L'effetto dell'assenza di Sym1 sulla morfologia del mitocondrio suggerisce una destabilizzazione della membrana mitocondriale interna, che potrebbe essere la causa dell'instabilità del mtDNA. Infatti le molecole di DNA mitocondriale fanno parte del nucleoide, un complesso DNA-proteine fisicamente associato alla membrana mitocondriale interna; di conseguenza la disorganizzazione di quest'ultima può portare alla replicazione difettiva del mtDNA. Inoltre è noto che l'integrità del genoma mitocondriale può essere compromessa anche a causa dall'assenza di numerose proteine, non direttamente coinvolte nella sintesi del mtDNA, localizzate nella membrane mitocondriale interna (Contamine and Picard, 2000; Fontanesi *et al.*, 2004).

E' interessante notare che la proteina wsc (*woroning sorting complex*) di *Neurospora crassa*, omologa alla famiglia di proteine Mpv17/Pmp22 (Liu *et al.*, 2008) ha una funzione nella corretta biogenesi dei *woroning bodies* (WB) che sono organelli, unici dei funghi filamentosi, che derivano dai perossisomi e che servono per sigillare i *septal pore* in risposta a lesioni cellulari (Trinci and Collinge, 1974 ; Markham and Collinge, 1987).

Il ceppo Δ *sym1* ha una ridotta attività e quantità del complesso SDH, ma questo difetto difficilmente può spiegare, e quindi essere la causa, di tutti i difetti osservati nel mutante privo di Sym1. Infatti, difetti della succinato deidrogenasi non sono associati, o lo sono solo marginalmente, all'instabilità dell'mtDNA in lievito (Smith *et al.*, 2007; Goffrini *et al.*, 2009). Inoltre non ci sono evidenze di un ruolo morfogenetico della succinato deidrogenasi nella biogenesi mitocondriale. Tra l'altro abbiamo dimostrato che, *in vivo*, Sym1 fa parte di un complesso ad alto peso molecolare (>600 kDa) che è molto più grande e chiaramente distinto dal complesso dell'SDH, rendendo molto improbabile che l'effetto di Sym1 sull'assemblaggio/mantenimento della succinato deidrogenasi sia il solo ruolo o sia il ruolo primario della proteina Sym1.

Nonostante il ruolo primario di Sym1 non sia stato ancora chiaramente identificato, i nostri dati indicano che Sym1 è coinvolto nella stabilità strutturale e funzionale della membrana mitocondriale interna, e quindi controlla meccanismi cruciali legati a questo compartimento, inclusi l'attività dei complessi respiratori, la morfogenesi dei mitocondri e l'integrità dei nucleoidi.

Per meglio comprendere la funzione della proteina Sym1 risulta particolarmente informativo identificare gli interattori fisici. Allo scopo è stato costruito un ceppo di lievito ingegnerizzato che esprima la proteina Sym1 recante un *tag* esaistidinico che permetta di effettuare l'immunoprecipitazione del complesso sovramolecolare che include Sym1. La successiva analisi di spettrometria di massa ci consentirà di identificare quali altre proteine facciano parte di questo enorme supercomplesso.

L'identificazione di interattori fisici contribuirà a chiarire i punti ancora oscuri e a far luce sulla funzione specifica di Sym1 e quindi di MPV17. Questo potrà aiutare a comprendere le basi molecolari della patologia ed eventualmente a suggerire una possibile terapia. A riguardo abbiamo identificato diversi soppressori metabolici (glutammato, glutammina, aspartato, asparagina, α -chetoglutarato e citrato) che aggiunti al terreno di crescita sono in grado di compensare parzialmente il difetto OXPHOS e di ridurre, seppur in modo Sym-indipendente, la mutabilità mitocondriale. Pur non essendo chiara la causa del miglioramento, questa è comunque una osservazione interessante, considerando che la deplezione del mtDNA è considerato l'evento che scatena la patologia nei pazienti. L'analisi dell'effetto di queste molecole andrebbe approfondito soprattutto in relazione a un loro possibile utilizzo "terapeutico" nei pazienti con mutazioni in MPV17 e forse, data l'indipendenza da *SYM1*, anche nei pazienti affetti in generale da sindromi da deplezione del DNA mitocondriale. A questo proposito merita di essere menzionato il lavoro di Weinberg e colleghi (Weinberg *et al.*, 2000) nel quale si dimostra che l'aggiunta di intermedi del ciclo di Krebs a colture cellulari di tubuli prossimali renali era in grado di compensare la disfunzione mitocondriale.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abrahams, J. P.; A. G. Leslie; R. Lutter and J. E. Walker.** 1994. "Structure at 2.8 Å Resolution of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria." *Nature*, 370(6491), pp. 621-8.
- Ackerman, S. H.** 2002. "Atp11p and Atp12p Are Chaperones for F(1)-ATPase Biogenesis in Mitochondria." *Biochim Biophys Acta*, 1555(1-3), pp. 101-5.
- Ackerman, S. H. and A. Tzagoloff.** 1990. "Identification of Two Nuclear Genes (Atp11, Atp12) Required for Assembly of the Yeast F1-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(13), pp. 4986-90.
- Akman, H. O.; B. Dorado; L. C. Lopez; A. Garcia-Cazorla; M. R. Vila; L. M. Tanabe; W. T. Dauer; E. Bonilla; K. Tanji and M. Hirano.** 2008. "Thymidine Kinase 2 (H126n) Knockin Mice Show the Essential Role of Balanced Deoxynucleotide Pools for Mitochondrial DNA Maintenance." *Hum Mol Genet*, 17(16), pp. 2433-40.
- Alberio, S.; R. Mineri; V. Tiranti and M. Zeviani.** 2007. "Depletion of Mtdna: Syndromes and Genes." *Mitochondrion*, 7(1-2), pp. 6-12.
- Alexander, C.; M. Votruba; U. E. Pesch; D. L. Thiselton; S. Mayer; A. Moore; M. Rodriguez; U. Kellner; B. Leo-Kottler; G. Auburger, et al.** 2000. "Opa1, Encoding a Dynamin-Related GTPase, Is Mutated in Autosomal Dominant Optic Atrophy Linked to Chromosome 3q28." *Nat Genet*, 26(2), pp. 211-5.
- Allen, R. D.; C. C. Schroeder and A. K. Fok.** 1989. "An Investigation of Mitochondrial Inner Membranes by Rapid-Freeze Deep-Etch Techniques." *J Cell Biol*, 108(6), pp. 2233-40.
- Allen, R.D.** 1995. "Membrane tubulation and proton pumps." *Protoplasma*, 189, pp. 1-8.
- Ames, B. N.; M. K. Shigenaga and T. M. Hagen.** 1993. "Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17), pp. 7915-22.
- Anderson, S.; A. T. Bankier; B. G. Barrell; M. H. de Bruijn; A. R. Coulson; J. Drouin; I. C. Eperon; D. P. Nierlich; B. A. Roe; F. Sanger, et al.** 1981. "Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome." *Nature*, 290(5806), pp. 457-65.
- Appenzeller, O.; M. Kornfeld and R. Snyder.** 1976. "Acromutilating, Paralyzing Neuropathy with Corneal Ulceration in Navajo Children." *Arch Neurol*, 33(11), pp. 733-8.
- Arnold, I.; K. Pfeiffer; W. Neupert; R. A. Stuart and H. Schagger.** 1998. "Yeast Mitochondrial F1F0-ATP Synthase Exists as a Dimer: Identification of Three Dimer-Specific Subunits." *EMBO J*, 17(24), pp. 7170-8.
- Arselin, G.; J. Vaillier; B. Salin; J. Schaeffer; M. F. Giraud; A. Dautant; D. Brethes and J. Velours.** 2004. "The Modulation in Subunits E and G Amounts of Yeast ATP Synthase Modifies Mitochondrial Cristae Morphology." *J Biol Chem*, 279(39), pp. 40392-9.
- Ashley, N.; S. Adams; A. Slama; M. Zeviani; A. Suomalainen; A. L. Andreu; R. K. Naviaux and J. Poulton.** 2007. "Defects in Maintenance of Mitochondrial DNA Are Associated with Intramitochondrial Nucleotide Imbalances." *Hum Mol Genet*, 16(12), pp. 1400-11.
- Attardi, G.** 1986. "The Elucidation of the Human Mitochondrial Genome: A Historical Perspective." *Bioessays*, 5(1), pp. 34-9.
- Attardi, G. and G. Schatz.** 1988. "Biogenesis of Mitochondria." *Annu Rev Cell Biol*, 4, pp. 289-333.
- Ausubel, F. M.; R. Brent; R. E. Kingston; D. D. Moore; J. G. Seidman; J.A. Smith and K. Struhl.** 1994. *Saccharomyces cerevisiae. Current protocols in molecular biology.* Vol. 2. Wiley, NY.
- Barrientos, A.; M. H. Barros; I. Valnot; A. Rotig; P. Rustin and A. Tzagoloff.** 2002. "Cytochrome Oxidase in Health and Disease." *Gene*, 286(1), pp. 53-63.
- Barrientos, A.** 2003. "Yeast Models of Human Mitochondrial Diseases." *IUBMB Life*, 55(2), pp. 83-95.
- Barrientos, A.; K. Gouget; D. Horn; I. C. Soto and F. Fontanesi.** 2009. "Suppression Mechanisms of Cox Assembly Defects in Yeast and Human: Insights into the Cox Assembly Process." *Biochim Biophys Acta*, 1793(1), pp. 97-107.
- Barthelemy, C.; H. Ogier de Baulny; J. Diaz; M. A. Cheval; P. Frachon; N. Romero; F. Goutieres; M. Fardeau and A. Lombes.** 2001. "Late-Onset Mitochondrial DNA Depletion: DNA Copy Number, Multiple Deletions, and Compensation." *Ann Neurol*, 49(5), pp. 607-17.
- Baruffini, E.; I. Ferrero and F. Foury.** 2007. "Mitochondrial DNA Defects in *Saccharomyces Cerevisiae* Caused by Functional Interactions between DNA Polymerase Gamma Mutations Associated with Disease in Human." *Biochim Biophys Acta*, 1772(11-12), pp. 1225-35.
- Baruffini, E.; T. Lodi; C. Dallabona; A. Puglisi; M. Zeviani and I. Ferrero.** 2006. "Genetic and Chemical Rescue of the *Saccharomyces Cerevisiae* Phenotype Induced by Mitochondrial DNA Polymerase Mutations Associated with Progressive External Ophthalmoplegia in Humans." *Hum Mol Genet*, 15(19), pp. 2846-55.
- Basset D. E.; M.S. Boguski; P. Hieter.** 1996. "Yeast genes and human diseases." *Nature*, 379, pp. 589-90.

- Bassett, D. E., Jr.; M. S. Boguski; F. Spencer; R. Reeves; S. Kim; T. Weaver and P. Hieter.** 1997. "Genome Cross-Referencing and Xrefdb: Implications for the Identification and Analysis of Genes Mutated in Human Disease." *Nat Genet*, 15(4), pp. 339-44.
- Beal M. F.** 2002. "Mitochondria in neurodegeneration." In: Desnuelle C, DiMauro S (eds). "Mitochondrial disorders: from pathophysiology to acquired defects." *New York: Springer*, pp. 17-35.
- Belevich, I.; M. I. Verkhovsky and M. Wikstrom.** 2006. "Proton-Coupled Electron Transfer Drives the Proton Pump of Cytochrome C Oxidase." *Nature*, 440(7085), pp. 829-32.
- Bendich, A. J.** 1996. "Structural Analysis of Mitochondrial DNA Molecules from Fungi and Plants Using Moving Pictures and Pulsed-Field Gel Electrophoresis." *J Mol Biol*, 255(4), pp. 564-88.
- Bereiter-Hahn, J. and M. Voth.** 1994. "Dynamics of Mitochondria in Living Cells: Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria." *Microsc Res Tech*, 27(3), pp. 198-219.
- Berry, E. A.; M. Guergova-Kuras; L. S. Huang and A. R. Crofts.** 2000. "Structure and Function of Cytochrome Bc Complexes." *Annu Rev Biochem*, 69, pp. 1005-75.
- Binder, C. J.; H. Weiher; M. Exner and D. Kerjaschki.** 1999. "Glomerular Overproduction of Oxygen Radicals in Mpv17 Gene-Inactivated Mice Causes Podocyte Foot Process Flattening and Proteinuria: A Model of Steroid-Resistant Nephrosis Sensitive to Radical Scavenger Therapy." *Am J Pathol*, 154(4), pp. 1067-75.
- Birky C. W.** 1994. "Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws." *J Heredity*, 85, pp. 355-65.
- Birky, C. W.** 2001. "The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models." *Annu Rev Genet*, 35, pp. 125-48.
- Biswas, G.; H. K. Anandatheerthavarada; M. Zaidi and N. G. Avadhani.** 2003. "Mitochondria to Nucleus Stress Signaling: A Distinctive Mechanism of Nfkapab/Rel Activation through Calcineurin-Mediated Inactivation of Ikappabeta." *J Cell Biol*, 161(3), pp. 507-19.
- Blandin, G.; P. Durrens; F. Tekaia; M. Aigle; M. Bolotin-Fukuhara; E. Bon; S. Casaregola; J. de Montigny; C. Gaillardin; A. Lepingle, et al.** 2000. "Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 4. The Genome of *Saccharomyces Cerevisiae* Revisited." *FEBS Lett*, 487(1), pp. 31-6.
- Blattner, F. R.; G. Plunkett, 3rd; C. A. Bloch; N. T. Perna; V. Burland; M. Riley; J. Collado-Vides; J. D. Glasner; C. K. Rode; G. F. Mayhew, et al.** 1997. "The Complete Genome Sequence of *Escherichia Coli* K-12." *Science*, 277(5331), pp. 1453-62.
- Boekema, E. J. and H. P. Braun.** 2007. "Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System." *J Biol Chem*, 282(1), pp. 1-4.
- Bogenhagen, D. and D. A. Clayton.** 1976. "Thymidylate Nucleotide Supply for Mitochondrial DNA Synthesis in Mouse L-Cells. Effect of 5-Fluorodeoxyuridine and Methotrexate in Thymidine Kinase Plus and Thymidine Kinase Minus Cells." *J Biol Chem*, 251(10), pp. 2938-44.
- Bogenhagen, D. and D. A. Clayton.** 1977. "Mouse L Cell Mitochondrial DNA Molecules Are Selected Randomly for Replication Throughout the Cell Cycle." *Cell*, 11(4), pp. 719-27.
- Bogenhagen, D. F.; Y. Wang; E. L. Shen and R. Kobayashi.** 2003. "Protein Components of Mitochondrial DNA Nucleoids in Higher Eukaryotes." *Mol Cell Proteomics*, 2(11), pp. 1205-16.
- Bonneaud, N.; O. Ozier-Kalogeropoulos; G. Y. Li; M. Labouesse; L. Minvielle-Sebastia and F. Lacroute.** 1991. "A Family of Low and High Copy Replicative, Integrative and Single-Stranded S. *Cerevisiae*/E. *Coli* Shuttle Vectors." *Yeast*, 7(6), pp. 609-15.
- Bonnefoy, N.; M. Kermorgant; O. Groudinsky; M. Minet; P. P. Slonimski and G. Dujardin.** 1994. "Cloning of a Human Gene Involved in Cytochrome Oxidase Assembly by Functional Complementation of an Oxa1-Mutation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(25), pp. 11978-82.
- Bornstein, B.; E. Area; K. M. Flanigan; J. Ganesh; P. Jayakar; K. J. Swoboda; J. Coku; A. Naini; S. Shanske; K. Tanji, et al.** 2008. "Mitochondrial DNA Depletion Syndrome Due to Mutations in the Rrm2b Gene." *Neuromuscul Disord*, 18(6), pp. 453-9.
- Botstein, D.** 1991. "Why Yeast?" *Hosp Pract (Off Ed)*, 26(10), pp. 157-61, 64.
- Boumans, H.; L. A. Grivell and J. A. Berden.** 1998. "The Respiratory Chain in Yeast Behaves as a Single Functional Unit." *J Biol Chem*, 273(9), pp. 4872-7.
- Bourdon, A.; L. Minai; V. Serre; J. P. Jais; E. Sarzi; S. Aubert; D. Chretien; P. de Lonlay; V. Paquis-Flucklinger; H. Arakawa, et al.** 2007. "Mutation of Rrm2b, Encoding P53-Controlled Ribonucleotide Reductase (P53r2), Causes Severe Mitochondrial DNA Depletion." *Nat Genet*, 39(6), pp. 776-80.
- Bourgeron, T.; D. Chretien; A. Rotig; A. Munnich and P. Rustin.** 1993. "Fate and Expression of the Deleted Mitochondrial DNA Differ between Human Heteroplasmic Skin Fibroblast and Epstein-Barr Virus-Transformed Lymphocyte Cultures." *J Biol Chem*, 268(26), pp. 19369-76.

- Boyer PD.** 1993. "The Binding Change Mechanism for Atp Synthase--Some Probabilities and Possibilities." *Biochim Biophys Acta*, 1140(3), pp. 215-50.
- Boyer, P. D.** 1997. "The Atp Synthase--a Splendid Molecular Machine." *Annu Rev Biochem*, 66, pp. 717-49.
- Bradford, M. M.** 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Brandt, U.; S. Uribe; H. Schagger and B. L. Trumpower.** 1994. "Isolation and Characterization of Qcr10, the Nuclear Gene Encoding the 8.5-Kda Subunit 10 of the Saccharomyces Cerevisiae Cytochrome Bc1 Complex." *J Biol Chem*, 269(17), pp. 12947-53.
- Brenner, D. M. and G. C. Carroll.** 1968. "Fine-Structural Correlates of Growth in Hyphae of Ascodesmis Sphaerospora." *J Bacteriol*, 95(2), pp. 658-71.
- Bruel, C.; R. Brasseur and B. L. Trumpower.** 1996. "Subunit 8 of the Saccharomyces Cerevisiae Cytochrome Bc1 Complex Interacts with Succinate-Ubiquinone Reductase Complex." *J Bioenerg Biomembr*, 28(1), pp. 59-68.
- Brunori, M.; A. Giuffre and P. Sarti.** 2005. "Cytochrome C Oxidase, Ligands and Electrons." *J Inorg Biochem*, 99(1), pp. 324-36.
- Brunori, M.; A. Giuffre; F. Malatesta and P. Sarti.** 1998. "Investigating the Mechanism of Electron Transfer to the Binuclear Center in Cu-Heme Oxidases." *J Bioenerg Biomembr*, 30(1), pp. 41-5.
- Bullis, B. L. and B. D. Lemire.** 1994. "Isolation and Characterization of the Saccharomyces Cerevisiae Sdh4 Gene Encoding a Membrane Anchor Subunit of Succinate Dehydrogenase." *J Biol Chem*, 269(9), pp. 6543-9.
- Butow, R. A. and N. G. Avadhani.** 2004. "Mitochondrial Signaling: The Retrograde Response." *Mol Cell*, 14(1), pp. 1-15.
- Calvo, S.; M. Jain; X. Xie; S. A. Sheth; B. Chang; O. A. Goldberger; A. Spinazzola; M. Zeviani; S. A. Carr and V. K. Mootha.** 2006. "Systematic Identification of Human Mitochondrial Disease Genes through Integrative Genomics." *Nat Genet*, 38(5), pp. 576-82.
- Camp, R.R.** 1977. "Association of microbodies, Woronin bodies, and septa in intercellular hyphae of *Cymadothea trifolii*." *Can J Bot*, 55, pp. 1856 - 59.
- Campbell, I. and J. H. Duffus.** 1988. "Yeast, A Practical Approach." *IRL Press, UK.*
- Carrozzo, R.; C. Dionisi-Vici; U. Steuerwald; S. Lucieli; F. Deodato; S. Di Giandomenico; E. Bertini; B. Franke; L. A. Kluijtmans; M. C. Meschini, et al.** 2007. "Sucla2 Mutations Are Associated with Mild Methylmalonic Aciduria, Leigh-Like Encephalomyopathy, Dystonia and Deafness." *Brain*, 130(Pt 3), pp. 862-74.
- Chabes, A.; B. Georgieva; V. Domkin; X. Zhao; R. Rothstein and L. Thelander.** 2003. "Survival of DNA Damage in Yeast Directly Depends on Increased Dntp Levels Allowed by Relaxed Feedback Inhibition of Ribonucleotide Reductase." *Cell*, 112(3), pp. 391-401.
- Chabes, A.; V. Domkin and L. Thelander.** 1999. "Yeast Sml1, a Protein Inhibitor of Ribonucleotide Reductase." *J Biol Chem*, 274(51), pp. 36679-83.
- Chelstowska, A.; Z. Liu; Y. Jia; D. Amberg and R. A. Butow.** 1999. "Signalling between Mitochondria and the Nucleus Regulates the Expression of a New D-Lactate Dehydrogenase Activity in Yeast." *Yeast*, 15(13), pp. 1377-91.
- Chen, E. J. and C. A. Kaiser.** 2002. "Amino Acids Regulate the Intracellular Trafficking of the General Amino Acid Permease of Saccharomycescerevisiae." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), pp. 14837-42.
- Chen, X. J. and R. A. Butow.** 2005. "The Organization and Inheritance of the Mitochondrial Genome." *Nat Rev Genet*, 6(11), pp. 815-25.
- Chen, X. J.; X. Wang; B. A. Kaufman and R. A. Butow.** 2005. "Aconitase Couples Metabolic Regulation to Mitochondrial DNA Maintenance." *Science*, 307(5710), pp. 714-7.
- Chen, X.; R. Prosser; S. Simonetti; J. Sadlock; G. Jagiello and E. A. Schon.** 1995. "Rearranged Mitochondrial Genomes Are Present in Human Oocytes." *Am J Hum Genet*, 57(2), pp. 239-47.
- Chester, V. E.** 1968. "Heritable Glycogen-Storage Deficiency in Yeast and Its Induction by Ultra-Violet Light." *J Gen Microbiol*, 51(1), pp. 49-56.
- Chinnery, P. F.** 2003. "Searching for Nuclear-Mitochondrial Genes." *Trends Genet*, 19(2), pp. 60-2.
- Chinnery, P. F. and D. C. Samuels.** 1999. "Relaxed Replication of Mtdna: A Model with Implications for the Expression of Disease." *Am J Hum Genet*, 64(4), pp. 1158-65.
- Chinnery, P. F.; D. R. Thorburn; D. C. Samuels; S. L. White; H. M. Dahl; D. M. Turnbull; R. N. Lightowers and N. Howell.** 2000. "The Inheritance of Mitochondrial DNA Heteroplasmy: Random Drift, Selection or Both?" *Trends Genet*, 16(11), pp. 500-5.
- Chua, G.; Q. D. Morris; R. Sopko; M. D. Robinson; O. Ryan; E. T. Chan; B. J. Frey; B. J. Andrews; C. Boone and T. R. Hughes.** 2006. "Identifying Transcription Factor Functions and Targets by Phenotypic Activation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(32), pp. 12045-50.

- Clayton, D. A.** 1992. "Structure and Function of the Mitochondrial Genome." *J Inherit Metab Dis*, 15(4), pp. 439-47.
- Colby, G.; Y. Ishii and A. Tzagoloff.** 1998. "Suppression of Sdh1 Mutations by the Sdh1b Gene of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast*, 14(11), pp. 1001-6.
- Coleman, S. T.; T. K. Fang; S. A. Rovinsky; F. J. Turano and W. S. Moye-Rowley.** 2001. "Expression of a Glutamate Decarboxylase Homologue Is Required for Normal Oxidative Stress Tolerance in *Saccharomyces Cerevisiae*." *J Biol Chem*, 276(1), pp. 244-50.
- Collins, F. S.** 1995. "Positional Cloning Moves from Perditional to Traditional." *Nat Genet*, 9(4), pp. 347-50.
- Collinson, I. R.; J. M. Skehel; I. M. Fearnley; M. J. Runswick and J. E. Walker.** 1996. "The F1f0-ATPase Complex from Bovine Heart Mitochondria: The Molar Ratio of the Subunits in the Stalk Region Linking the F1 and F0 Domains." *Biochemistry*, 35(38), pp. 12640-6.
- Contamine, V. and M. Picard.** 2000. "Maintenance and Integrity of the Mitochondrial Genome: A Plethora of Nuclear Genes in the Budding Yeast." *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(2), pp. 281-315.
- Costanzo, M. C.; M. E. Crawford; J. E. Hirschman; J. E. Kranz; P. Olsen; L. S. Robertson; M. S. Skrzypek; B. R. Braun; K. L. Hopkins; P. Kondu, et al.** 2001. "Ypd, PombePd and WormPd: Model Organism Volumes of the BioKnowledge Library, an Integrated Resource for Protein Information." *Nucleic Acids Res*, 29(1), pp. 75-9.
- Crivellone, M. D.** 1994. "Characterization of Cbp4, a New Gene Essential for the Expression of Ubiquinol-Cytochrome C Reductase in *Saccharomyces Cerevisiae*." *J Biol Chem*, 269(33), pp. 21284-92.
- Cronin, V. B.; B. Maras; D. Barra and S. Doonan.** 1991. "The Amino Acid Sequence of the Aspartate Aminotransferase from Baker's Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*)." *Biochem J*, 277 (Pt 2), pp. 335-40.
- Croteau, D. L.; R. H. Stierum and V. A. Bohr.** 1999. "Mitochondrial DNA Repair Pathways." *Mutat Res*, 434(3), pp. 137-48.
- Cruciat, C. M.; K. Hell; H. Folsch; W. Neupert and R. A. Stuart.** 1999. "Bcs1p, an Aaa-Family Member, Is a Chaperone for the Assembly of the Cytochrome Bc(1) Complex." *EMBO J*, 18(19), pp. 5226-33.
- Cruciat, C. M.; S. Brunner; F. Baumann; W. Neupert and R. A. Stuart.** 2000. "The Cytochrome Bc1 and Cytochrome C Oxidase Complexes Associate to Form a Single Supracomplex in Yeast Mitochondria." *J Biol Chem*, 275(24), pp. 18093-8.
- Dallabona, C.; R. M. Marsano; P. Arzuffi; D. Ghezzi; P. Mancini; M. Zeviani; I. Ferrero and C. Donnini.** 2009. "Sym1, the Yeast Ortholog of the Mpv17 Human Disease Protein, Is a Stress-Induced Bioenergetic and Morphogenetic Mitochondrial Modulator." *Hum Mol Genet*.
- De Haan, M.; A. P. van Loon; J. Kreike; R. T. Vaessen and L. A. Grivell.** 1984. "The Biosynthesis of the Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Complex in Yeast. DNA Sequence Analysis of the Nuclear Gene Coding for the 14-Kda Subunit." *Eur J Biochem*, 138(1), pp. 169-77.
- de Lonlay, P.; I. Valnot; A. Barrientos; M. Gorbatyuk; A. Tzagoloff; J. W. Taanman; E. Benayoun; D. Chretien; N. Kadhon; A. Lombes, et al.** 2001. "A Mutant Mitochondrial Respiratory Chain Assembly Protein Causes Complex Iii Deficiency in Patients with Tubulopathy, Encephalopathy and Liver Failure." *Nat Genet*, 29(1), pp. 57-60.
- de Zamaroczy, M. and G. Bernardi.** 1985. "Sequence Organization of the Mitochondrial Genome of Yeast--a Review." *Gene*, 37(1-3), pp. 1-17.
- Delarue, A.; O. Paut; J. M. Guys; M. F. Montfort; V. Lethel; B. Roquelaure; J. F. Pellissier; J. Sarles and J. Camboulives.** 2000. "Inappropriate Liver Transplantation in a Child with Alpers-Huttenlocher Syndrome Misdiagnosed as Valproate-Induced Acute Liver Failure." *Pediatr Transplant*, 4(1), pp. 67-71.
- Delettre, C.; G. Lenaers; J. M. Griffoin; N. Gigarel; C. Lorenzo; P. Belenguer; L. Pelloquin; J. Grosgeorge; C. Turc-Carel; E. Perret, et al.** 2000. "Nuclear Gene Opa1, Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy." *Nat Genet*, 26(2), pp. 207-10.
- DeLuna, A.; A. Avendano; L. Riego and A. Gonzalez.** 2001. "Nadp-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces Cerevisiae*. Purification, Kinetic Properties, and Physiological Roles." *J Biol Chem*, 276(47), pp. 43775-83.
- Di Fonzo, A.; D. Ronchi; T. Lodi; E. Fassone; M. Tigano; C. Lamperti; S. Corti; A. Bordoni; F. Fortunato; M. Nizzardo, et al.** 2009. "The Mitochondrial Disulfide Relay System Protein Gfer Is Mutated in Autosomal-Recessive Myopathy with Cataract and Combined Respiratory-Chain Deficiency." *Am J Hum Genet*, 84(5), pp. 594-604.
- Dickinson, R.** 1999. "Carbon metabolism." Dickinson, J.R. and M. Schweizer (eds), "The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*." *Taylor and Francis Ltd*, pp. 23-55.

- Dickson, V. K.; J. A. Silvester; I. M. Fearnley; A. G. Leslie and J. E. Walker.** 2006. "On the Structure of the Stator of the Mitochondrial Atp Synthase." *EMBO J*, 25(12), pp. 2911-8.
- Diffley, J. F. and B. Stillman.** 1991. "A Close Relative of the Nuclear, Chromosomal High-Mobility Group Protein Hmg1 in Yeast Mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17), pp. 7864-8.
- Diffley, J. F. and B. Stillman.** 1992. "DNA Binding Properties of an Hmg1-Related Protein from Yeast Mitochondria." *J Biol Chem*, 267(5), pp. 3368-74.
- Dilova, I.; C. Y. Chen and T. Powers.** 2002. "Mks1 in Concert with Tor Signaling Negatively Regulates Rtg Target Gene Expression in *S. Cerevisiae*." *Curr Biol*, 12(5), pp. 389-95.
- Dilova, I.; S. Aronova; J. C. Chen and T. Powers.** 2004. "Tor Signaling and Nutrient-Based Signals Converge on Mks1p Phosphorylation to Regulate Expression of Rtg1.Rtg3p-Dependent Target Genes." *J Biol Chem*, 279(45), pp. 46527-35.
- DiMauro, S.** 2004. "Mitochondrial Diseases." *Biochim Biophys Acta*, 1658(1-2), pp. 80-8.
- DiMauro, S. and E. A. Schon.** 2003. "Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases." *N Engl J Med*, 348(26), pp. 2656-68.
- DiMauro, S.; E. Bonilla; M. Davidson; M. Hirano and E. A. Schon.** 1998. "Mitochondria in Neuromuscular Disorders." *Biochim Biophys Acta*, 1366(1-2), pp. 199-210.
- DiMauro, S.; M. Hirano and E. A. Schon.** 2000. "Mitochondrial Encephalomyopathies: Therapeutic Approaches." *Neurol Sci*, 21(5 Suppl), pp. S901-8.
- Dmitriev, O. Y.; P. C. Jones and R. H. Fillingame.** 1999. "Structure of the Subunit C Oligomer in the F1fo Atp Synthase: Model Derived from Solution Structure of the Monomer and Cross-Linking in the Native Enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), pp. 7785-90.
- Dower, W. J.; J. F. Miller and C. W. Ragsdale.** 1988. "High Efficiency Transformation of *E. Coli* by High Voltage Electroporation." *Nucleic Acids Res*, 16(13), pp. 6127-45.
- Dubern, B.; P. Broue; C. Dubuisson; V. Cormier-Daire; D. Habes; C. Chardot; D. Devictor; A. Munnich and O. Bernard.** 2001. "Orthotopic Liver Transplantation for Mitochondrial Respiratory Chain Disorders: A Study of 5 Children." *Transplantation*, 71(5), pp. 633-7.
- Dudkina, N. V.; H. Eubel; W. Keegstra; E. J. Boekema and H. P. Braun.** 2005. "Structure of a Mitochondrial Supercomplex Formed by Respiratory-Chain Complexes I and Iii." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9), pp. 3225-9.
- Dudkina, N. V.; S. Sunderhaus; H. P. Braun and E. J. Boekema.** 2006. "Characterization of Dimeric Atp Synthase and Cristae Membrane Ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* Mitochondria." *FEBS Lett*, 580(14), pp. 3427-32.
- Dujon B.** 1981. "Mitochondrial genetics and functions. Molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Eastmond, D. L. and H. C. Nelson.** 2006. "Genome-Wide Analysis Reveals New Roles for the Activation Domains of the *Saccharomyces Cerevisiae* Heat Shock Transcription Factor (Hsf1) During the Transient Heat Shock Response." *J Biol Chem*, 281(43), pp. 32909-21.
- Elgersma, Y.; C. W. van Roermund; R. J. Wanders and H. F. Tabak.** 1995. "Peroxisomal and Mitochondrial Carnitine Acetyltransferases of *Saccharomyces Cerevisiae* Are Encoded by a Single Gene." *EMBO J*, 14(14), pp. 3472-9.
- Elpeleg, O.; C. Miller; E. Hershkovitz; M. Bitner-Glindzicz; G. Bondi-Rubinstein; S. Rahman; A. Pagnamenta; S. Eshhar and A. Saada.** 2005. "Deficiency of the Adp-Forming Succinyl-Coa Synthase Activity Is Associated with Encephalomyopathy and Mitochondrial DNA Depletion." *Am J Hum Genet*, 76(6), pp. 1081-6.
- Engel, S. R.; R. Balakrishnan; G. Binkley; K. R. Christie; M. C. Costanzo; S. S. Dwight; D. G. Fisk; J. E. Hirschman; B. C. Hitz; E. L. Hong, et al.** 2010. "Saccharomyces Genome Database Provides Mutant Phenotype Data." *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue), pp. D433-6.
- Ephrussi, B. ; H. Hottinguer and J. Tavlitzi.** 1949. "Action de l'acri flavine sur les levures. II. Ittude gdnetique du mutant "petite colonie." " *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 76, pp. 419-50.
- Epstein, C. B.; J. A. Waddle; W. th Hale; V. Dave; J. Thornton; T. L. Macatee; H. R. Garner and R. A. Butow.** 2001. "Genome-Wide Responses to Mitochondrial Dysfunction." *Mol Biol Cell*, 12(2), pp. 297-308.
- Everard-Gigot, V.; C. D. Dunn; B. M. Dolan; S. Brunner; R. E. Jensen and R. A. Stuart.** 2005. "Functional Analysis of Subunit E of the F1fo-Atp Synthase of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: Importance of the N-Terminal Membrane Anchor Region." *Eukaryot Cell*, 4(2), pp. 346-55.

- Falkenberg, M.; M. Gaspari; A. Rantanen; A. Trifunovic; N. G. Larsson and C. M. Gustafsson.** 2002. "Mitochondrial Transcription Factors B1 and B2 Activate Transcription of Human Mtdna." *Nat Genet*, 31(3), pp. 289-94.
- Fawcett D.W.** 1981. "Mitochondria" *W.B. Saunders (Ed.), The Cell, Philadelphia.*
- Fernandez-Vizarra, E.; M. Bugiani; P. Goffrini; F. Carrara; L. Farina; E. Procopio; A. Donati; G. Uziel; I. Ferrero and M. Zeviani.** 2007. "Impaired Complex Iii Assembly Associated with Bcs1l Gene Mutations in Isolated Mitochondrial Encephalopathy." *Hum Mol Genet*, 16(10), pp. 1241-52.
- Ferrari, G.; E. Lamantea; A. Donati; M. Filosto; E. Briem; F. Carrara; R. Parini; A. Simonati; R. Santer and M. Zeviani.** 2005. "Infantile Hepatocerebral Syndromes Associated with Mutations in the Mitochondrial DNA Polymerase-Gamma." *Brain*, 128(Pt 4), pp. 723-31.
- Ferrero, I.; A. M. Viola and A. Goffeau.** 1981. "Induction by Glucose of an Antimycin-Insensitive, Azide-Sensitive Respiration in the Yeast *Kluyveromyces Lactis*." *Antonie Van Leeuwenhoek*, 47(1), pp. 11-24.
- Fillingame RH, Angevine CM, Dmitriev OY.** 2003. "Mechanics of Coupling Proton Movements to C-Ring Rotation in Atp Synthase." *FEBS Lett*, 555(1), pp. 29-34.
- Fillingame, R. H. and O. Y. Dmitriev.** 2002. "Structural Model of the Transmembrane Fo Rotary Sector of H⁺-Transporting Atp Synthase Derived by Solution Nmr and Intersubunit Cross-Linking in Situ." *Biochim Biophys Acta*, 1565(2), pp. 232-45.
- Fillingame, R. H.; C. M. Angevine and O. Y. Dmitriev.** 2002. "Coupling Proton Movements to C-Ring Rotation in F(1)F(O) Atp Synthase: Aqueous Access Channels and Helix Rotations at the a-C Interface." *Biochim Biophys Acta*, 1555(1-3), pp. 29-36.
- Fontanesi, F.; I. C. Soto; D. Horn and A. Barrientos.** 2006. "Assembly of Mitochondrial Cytochrome C-Oxidase, a Complicated and Highly Regulated Cellular Process." *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(6), pp. C1129-47.
- Fontanesi, F.; L. Palmieri; P. Scarcia; T. Lodi; C. Donnini; A. Limongelli; V. Tiranti; M. Zeviani; I. Ferrero and A. M. Viola.** 2004. "Mutations in Aac2, Equivalent to Human Adpeo-Associated Ant1 Mutations, Lead to Defective Oxidative Phosphorylation in *Saccharomyces Cerevisiae* and Affect Mitochondrial DNA Stability." *Hum Mol Genet*, 13(9), pp. 923-34.
- Forsburg, S. L.; Guarente L.** 1989b. "Identification and Characterization of Hap4: A Third Component of the Ccaat-Bound Hap2/Hap3 Heteromer." *Genes Dev*, 3(8), pp. 1166-78.
- Forsburg, S. L. and L. Guarente.** 1989a. "Communication between Mitochondria and the Nucleus in Regulation of Cytochrome Genes in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Annu Rev Cell Biol*, 5, pp. 153-80.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B.** 1998. "The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEBS Lett*, 440(3), pp. 325-31.
- Foury, F.** 1997. "Human Genetic Diseases: A Cross-Talk between Man and Yeast." *Gene*, 195(1), pp. 1-10.
- Foury, F. and M. Kucej.** 2002. "Yeast Mitochondrial Biogenesis: A Model System for Humans?" *Curr Opin Chem Biol*, 6(1), pp. 106-11.
- Fox, T. D.** 1996. "Translational Control of Endogenous and Recoded Nuclear Genes in Yeast Mitochondria: Regulation and Membrane Targeting." *Experientia*, 52(12), pp. 1130-5.
- Francois, J. and J. L. Parrou.** 2001. "Reserve Carbohydrates Metabolism in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEMS Microbiol Rev*, 25(1), pp. 125-45.
- Frey, T. G. and C. A. Mannella.** 2000. "The Internal Structure of Mitochondria." *Trends Biochem Sci*, 25(7), pp. 319-24.
- Frey, T. G.; C. W. Renken and G. A. Perkins.** 2002. "Insight into Mitochondrial Structure and Function from Electron Tomography." *Biochim Biophys Acta*, 1555(1-3), pp. 196-203.
- Fronzes, R.; T. Weimann; J. Vaillier; J. Velours and D. Brethes.** 2006. "The Peripheral Stalk Participates in the Yeast Atp Synthase Dimerization Independently of E and G Subunits." *Biochemistry*, 45(21), pp. 6715-23.
- Fukuhara, H. and M. Wesolowski.** 1977. "Preferential loss of a specific region of mitochondrial DNA by rho-mutation." *Mitochondria 1977: Genetics and biogenesis of mitochondria. DeGruyter, Berlin.*
- Futai, M.; T. Noumi and M. Maeda.** 1989. "Atp Synthase (H⁺-Atpase): Results by Combined Biochemical and Molecular Biological Approaches." *Annu Rev Biochem*, 58, pp. 111-36.
- Gakh, O.; P. Cavadini and G. Isaya.** 2002. "Mitochondrial Processing Peptidases." *Biochim Biophys Acta*, 1592(1), pp. 63-77.
- Gangloff, S. P.; D. Marguet and G. J. Lauquin.** 1990. "Molecular Cloning of the Yeast Mitochondrial Aconitase Gene (Aco1) and Evidence of a Synergistic Regulation of Expression by Glucose Plus Glutamate." *Mol Cell Biol*, 10(7), pp. 3551-61.
- Garrido, N.; L. Griparic; E. Jokitalo; J. Wartiovaara; A. M. van der Blik and J. N. Spelbrink.** 2003. "Composition and Dynamics of Human Mitochondrial Nucleoids." *Mol Biol Cell*, 14(4), pp. 1583-96.

- Gasser, T.; M. Dichgans; J. Finsterer; I. Hausmanowa-Petrusewicz; K. Jurkat-Rott; T. Klopstock; E. Leguern; A. E. Lehesjoki; F. Lehmann-Horn; T. Lynch, et al.** 2001. "Efn's Task Force on Molecular Diagnosis of Neurologic Disorders: Guidelines for the Molecular Diagnosis of Inherited Neurologic Diseases. Second of Two Parts." *Eur J Neurol*, 8(5), pp. 407-24.
- Gavin, P. D.; M. Prescott and R. J. Devenish.** 2005. "F1f0-Atp Synthase Complex Interactions in Vivo Can Occur in the Absence of the Dimer Specific Subunit E." *J Bioenerg Biomembr*, 37(2), pp. 55-66.
- Gbelska, Y.; J. Subik; A. Svoboda; A. Goffeau and L. Kovac.** 1983. "Intramitochondrial Atp and Cell Functions: Yeast Cells Depleted of Intramitochondrial Atp Lose the Ability to Grow and Multiply." *Eur J Biochem*, 130(2), pp. 281-6.
- Ghezzi, D.; P. Goffrini; G. Uziel; R. Horvath; T. Klopstock; H. Lochmuller; P. D'Adamo; P. Gasparini; T. M. Strom; H. Prokisch, et al.** 2009. "Sdhaf1, Encoding a Lyr Complex-Ii Specific Assembly Factor, Is Mutated in Sdh-Defective Infantile Leukoencephalopathy." *Nat Genet*.
- Giaever, G.; A. M. Chu; L. Ni; C. Connelly; L. Riles; S. Veronneau; S. Dow; A. Lucau-Danila; K. Anderson; B. Andre, et al.** 2002. "Functional Profiling of the Saccharomyces Cerevisiae Genome." *Nature*, 418(6896), pp. 387-91.
- Gibbons, C.; M. G. Montgomery; A. G. Leslie and J. E. Walker.** 2000. "The Structure of the Central Stalk in Bovine F(1)-Atpase at 2.4 Å Resolution." *Nat Struct Biol*, 7(11), pp. 1055-61.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods.** 2002. "Transformation of Yeast by Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier DNA/Polyethylene Glycol Method." *Methods Enzymol*, 350, pp. 87-96.
- Giles, R. E.; H. Blanc; H. M. Cann and D. C. Wallace.** 1980. "Maternal Inheritance of Human Mitochondrial DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(11), pp. 6715-9.
- Giraud, M. F. and J. Velours.** 1994. "Atp Synthase of Yeast Mitochondria. Isolation of the F1 Delta Subunit, Sequence and Disruption of the Structural Gene." *Eur J Biochem*, 222(3), pp. 851-9.
- Giraud, M. F. and J. Velours.** 1997. "The Absence of the Mitochondrial Atp Synthase Delta Subunit Promotes a Slow Growth Phenotype of Rho- Yeast Cells by a Lack of Assembly of the Catalytic Sector F1." *Eur J Biochem*, 245(3), pp. 813-8.
- Glerum, D. M. and A. Tzagoloff.** 1994. "Isolation of a Human Cdna for Heme A:Farnesyltransferase by Functional Complementation of a Yeast Cox10 Mutant." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(18), pp. 8452-6.
- Glick, B. and G. Schatz.** 1991. "Import of Proteins into Mitochondria." *Annu Rev Genet*, 25, pp. 21-44.
- Goffeau, A.; B. G. Barrell; H. Bussey; R. W. Davis; B. Dujon; H. Feldmann; F. Galibert; J. D. Hoheisel; C. Jacq; M. Johnston, et al.** 1996. "Life with 6000 Genes." *Science*, 274(5287), pp. 546, 63-7.
- Goffrini, P.; T. Ercolino; E. Panizza; V. Giache; L. Cavone; A. Chiarugi; V. Dima; I. Ferrero and M. Mannelli.** 2009. "Functional Study in a Yeast Model of a Novel Succinate Dehydrogenase Subunit B Gene Germline Missense Mutation (C191y) Diagnosed in a Patient Affected by a Glomus Tumor." *Hum Mol Genet*, 18(10), pp. 1860-8.
- Goldstein, A. L. and J. H. McCusker.** 1999. "Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in Saccharomyces Cerevisiae." *Yeast*, 15(14), pp. 1541-53.
- Grandier-Vazeille, X.; K. Bathany; S. Chaignepain; N. Camougrand; S. Manon and J. M. Schmitter.** 2001. "Yeast Mitochondrial Dehydrogenases Are Associated in a Supramolecular Complex." *Biochemistry*, 40(33), pp. 9758-69.
- Griparic, L. and A. M. van der Blik.** 2001. "The Many Shapes of Mitochondrial Membranes." *Traffic*, 2(4), pp. 235-44.
- Grivell, L. A.** 1989. "Nucleo-Mitochondrial Interactions in Yeast Mitochondrial Biogenesis." *Eur J Biochem*, 182(3), pp. 477-93.
- Grossman, L. I. and E. A. Shoubridge.** 1996. "Mitochondrial Genetics and Human Disease." *Bioessays*, 18(12), pp. 983-91.
- Guelin, E.; J. Chevallier; M. Rigoulet; B. Guerin and J. Velours.** 1993. "Atp Synthase of Yeast Mitochondria. Isolation and Disruption of the Atp Epsilon Gene." *J Biol Chem*, 268(1), pp. 161-7.
- Guthrie C. and G. R. Fink.** 1991. "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Part A: Methods in Enzymology." *Accademic Press, San Diego, CA*.
- Guthrie C. and G. R. Fink.** 2002. "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Part B: Methods in Enzymology." *Accademic Press, San Diego, CA*.
- Hadikusumo, R. G.; S. Meltzer; W. M. Choo; M. J. Jean-Francois; A. W. Linnane and S. Marzuki.** 1988. "The Definition of Mitochondrial H⁺ Atpase Assembly Defects in Mit- Mutants of Saccharomyces Cerevisiae with a Monoclonal Antibody to the Enzyme Complex as an Assembly Probe." *Biochim Biophys Acta*, 933(1), pp. 212-22.

- Hagerhall, C.** 1997. "Succinate: Quinone Oxidoreductases. Variations on a Conserved Theme." *Biochim Biophys Acta*, 1320(2), pp. 107-41.
- Hagerhall, C. and L. Hederstedt.** 1996. "A Structural Model for the Membrane-Integral Domain of Succinate: Quinone Oxidoreductases." *FEBS Lett*, 389(1), pp. 25-31.
- Hakonen, A. H.; P. Isohanni; A. Paetau; R. Herva; A. Suomalainen and T. Lonnqvist.** 2007. "Recessive Twinkle Mutations in Early Onset Encephalopathy with Mtdna Depletion." *Brain*, 130(Pt 11), pp. 3032-40.
- Hammen, P. K.; D. G. Gorenstein and H. Weiner.** 1994. "Structure of the Signal Sequences for Two Mitochondrial Matrix Proteins That Are Not Proteolytically Processed Upon Import." *Biochemistry*, 33(28), pp. 8610-7.
- Hao, H. X.; O. Khalimonchuk; M. Schraders; N. Dephoure; J. P. Bayley; H. Kunst; P. Devilee; C. W. Cremers; J. D. Schiffman; B. G. Bentz, et al.** 2009. "Sdh5, a Gene Required for Flavination of Succinate Dehydrogenase, Is Mutated in Paraganglioma." *Science*, 325(5944), pp. 1139-42.
- Harman, D.** 1972. "The Biologic Clock: The Mitochondria?" *J Am Geriatr Soc*, 20(4), pp. 145-7.
- Hartl, F. U. and W. Neupert.** 1989. "Import of Proteins into the Various Submitochondrial Compartments." *J Cell Sci Suppl*, 11, pp. 187-98.
- Hartl, F. U.; N. Pfanner; D. W. Nicholson and W. Neupert.** 1989. "Mitochondrial Protein Import." *Biochim Biophys Acta*, 988(1), pp. 1-45.
- Haselbeck, R. J. and L. McAlister-Henn.** 1993. "Function and Expression of Yeast Mitochondrial Nad- and NADP-Specific Isocitrate Dehydrogenases." *J Biol Chem*, 268(16), pp. 12116-22.
- Hashimoto, T.; Y. Yoshida and K. Tagawa.** 1990. "Regulatory Proteins of F1f0-ATPase: Role of ATPase Inhibitor." *J Bioenerg Biomembr*, 22(1), pp. 27-38.
- Haviernik, P. and G. J. Laquin.** 1996. "Aco1 Expression in *Saccharomyces Cerevisiae* Is Regulated by the Hap Complex." *Folia Microbiol (Praha)*, 41(1), pp. 96-8.
- Hermann, G. J. and J. M. Shaw.** 1998. "Mitochondrial Dynamics in Yeast." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, pp. 265-303.
- Herrmann, J. M. and S. Funes.** 2005. "Biogenesis of Cytochrome Oxidase-Sophisticated Assembly Lines in the Mitochondrial Inner Membrane." *Gene*, 354, pp. 43-52.
- Hess, D. C.; C. L. Myers; C. Huttenhower; M. A. Hibbs; A. P. Hayes; J. Paw; J. J. Clore; R. M. Mendoza; B. S. Luis; C. Nislow, et al.** 2009. "Computationally Driven, Quantitative Experiments Discover Genes Required for Mitochondrial Biogenesis." *Plos Genetics*, 5(3), pp. -.
- Hill, B. C.** 1994. "Modeling the Sequence of Electron Transfer Reactions in the Single Turnover of Reduced, Mammalian Cytochrome C Oxidase with Oxygen." *J Biol Chem*, 269(4), pp. 2419-25.
- Hoffman, C. S. and F. Winston.** 1987. "A Ten-Minute DNA Preparation from Yeast Efficiently Releases Autonomous Plasmids for Transformation of *Escherichia Coli*." *Gene*, 57(2-3), pp. 267-72.
- Holt, I. J.; A. E. Harding; R. K. Petty and J. A. Morgan-Hughes.** 1990. "A New Mitochondrial Disease Associated with Mitochondrial DNA Heteroplasmy." *Am J Hum Genet*, 46(3), pp. 428-33.
- Holt, I. J.; J. M. Cooper; J. A. Morgan-Hughes and A. E. Harding.** 1988. "Deletions of Muscle Mitochondrial DNA." *Lancet*, 1(8600), pp. 1462.
- Holve, S.; D. Hu; M. Shub; R. W. Tyson and R. J. Sokol.** 1999. "Liver Disease in Navajo Neuropathy." *J Pediatr*, 135(4), pp. 482-93.
- Hong, S. and P. L. Pedersen.** 2002. "ATP Synthase of Yeast: Structural Insight into the Different Inhibitory Potencies of Two Regulatory Peptides and Identification of a New Potential Regulator." *Arch Biochem Biophys*, 405(1), pp. 38-43.
- Horan, S.; I. Bourges; J. W. Taanman and B. Meunier.** 2005. "Analysis of Cox2 Mutants Reveals Cytochrome Oxidase Subassemblies in Yeast." *Biochem J*, 390(Pt 3), pp. 703-8.
- Howell, N. and D. A. Mackey.** 1998. "Low-Penetrance Branches in Matrilineal Pedigrees with Leber Hereditary Optic Neuropathy." *Am J Hum Genet*, 63(4), pp. 1220-4.
- Hughes, T. R.; M. J. Marton; A. R. Jones; C. J. Roberts; R. Stoughton; C. D. Armour; H. A. Bennett; E. Coffey; H. Dai; Y. D. He, et al.** 2000. "Functional Discovery Via a Compendium of Expression Profiles." *Cell*, 102(1), pp. 109-26.
- Hunte, C.; J. Koepke; C. Lange; T. Rossmannith and H. Michel.** 2000. "Structure at 2.3 Å Resolution of the Cytochrome bc₁ Complex from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Co-Crystallized with an Antibody Fv Fragment." *Structure*, 8(6), pp. 669-84.
- Hwelte L. M.** 1971. "Window Rock: Navajo Tribal Museum." *Window Rock, AZ*. 10-14.
- Iborra, F. J.; H. Kimura and P. R. Cook.** 2004. "The Functional Organization of Mitochondrial Genomes in Human Cells." *BMC Biol*, 2, pp. 9.

- Ito, T.; K. Tashiro; S. Muta; R. Ozawa; T. Chiba; M. Nishizawa; K. Yamamoto; S. Kuhara and Y. Sakaki.** 2000. "Toward a Protein-Protein Interaction Map of the Budding Yeast: A Comprehensive System to Examine Two-Hybrid Interactions in All Possible Combinations between the Yeast Proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3), pp. 1143-7.
- Iverson, T. M.; C. Luna-Chavez; G. Cecchini and D. C. Rees.** 1999. "Structure of the Escherichia Coli Fumarate Reductase Respiratory Complex." *Science*, 284(5422), pp. 1961-6.
- Jacobs, H. T.; S. K. Lehtinen and J. N. Spelbrink.** 2000. "No Sex Please, We're Mitochondria: A Hypothesis on the Somatic Unit of Inheritance of Mammalian Mtdna." *Bioessays*, 22(6), pp. 564-72.
- Jedd, G. and N. H. Chua.** 2000. "A New Self-Assembled Peroxisomal Vesicle Required for Efficient Resealing of the Plasma Membrane." *Nat Cell Biol*, 2(4), pp. 226-31.
- Jensen, R. E.; A. E. Hobbs; K. L. Cerveny and H. Sesaki.** 2000. "Yeast Mitochondrial Dynamics: Fusion, Division, Segregation, and Shape." *Microsc Res Tech*, 51(6), pp. 573-83.
- Jenuth, J. P.; A. C. Peterson and E. A. Shoubridge.** 1997. "Tissue-Specific Selection for Different Mtdna Genotypes in Heteroplasmic Mice." *Nat Genet*, 16(1), pp. 93-5.
- Jenuth, J. P.; A. C. Peterson; K. Fu and E. A. Shoubridge.** 1996. "Random Genetic Drift in the Female Germline Explains the Rapid Segregation of Mammalian Mitochondrial DNA." *Nat Genet*, 14(2), pp. 146-51.
- Jia, Y.; B. Rothermel; J. Thornton and R. A. Butow.** 1997. "A Basic Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper Transcription Complex in Yeast Functions in a Signaling Pathway from Mitochondria to the Nucleus." *Mol Cell Biol*, 17(3), pp. 1110-7.
- Johnston D. F.** 1966. "An analysis of sources of information on the population of the Navajo." *Washington: Smithsonian Institution, Bureau of Ethnology, Bulletin*. 197, pp. 73-6.
- Johnston, M.** 2000. "The Yeast Genome: On the Road to the Golden Age." *Curr Opin Genet Dev*, 10(6), pp. 617-23.
- Kaiser, C.; S. Michaelis and A. Mitchell.** 1994. "Methods in Yeast Genetics: a Laboratory Course Manual." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Kaji, S.; K. Murayama; I. Nagata; H. Nagasaka; M. Takayanagi; A. Ohtake; H. Iwasa; M. Nishiyama; Y. Okazaki; H. Harashima, et al.** 2009. "Fluctuating Liver Functions in Siblings with Mpv17 Mutations and Possible Improvement Associated with Dietary and Pharmaceutical Treatments Targeting Respiratory Chain Complex Ii." *Mol Genet Metab*, 97(4), pp. 292-6.
- Kaldi, K.; P. Diestelkotter; G. Stenbeck; S. Auerbach; U. Jakle; H. J. Magert; F. T. Wieland and W. W. Just.** 1993. "Membrane Topology of the 22 Kda Integral Peroxisomal Membrane Protein." *FEBS Lett*, 315(3), pp. 217-22.
- Karadimas, C. L.; T. H. Vu; S. A. Holve; P. Chronopoulou; C. Quinzii; S. D. Johnsen; J. Kurth; E. Eggers; L. Palenzuela; K. Tanji, et al.** 2006. "Navajo Neurohepatopathy Is Caused by a Mutation in the Mpv17 Gene." *Am J Hum Genet*, 79(3), pp. 544-8.
- Karasawa, M.; R. M. Zwacka; A. Reuter; T. Fink; C. L. Hsieh; P. Lichter; U. Francke and H. Weiher.** 1993. "The Human Homolog of the Glomerulosclerosis Gene Mpv17: Structure and Genomic Organization." *Hum Mol Genet*, 2(11), pp. 1829-34.
- Kaufman, B. A.; J. E. Kolesar; P. S. Perlman and R. A. Butow.** 2003. "A Function for the Mitochondrial Chaperonin Hsp60 in the Structure and Transmission of Mitochondrial DNA Nucleoids in Saccharomyces Cerevisiae." *J Cell Biol*, 163(3), pp. 457-61.
- Kelso, G. F.; C. M. Porteous; C. V. Coulter; G. Hughes; W. K. Porteous; E. C. Ledgerwood; R. A. Smith and M. P. Murphy.** 2001. "Selective Targeting of a Redox-Active Ubiquinone to Mitochondria within Cells: Antioxidant and Antiapoptotic Properties." *J Biol Chem*, 276(7), pp. 4588-96.
- Keys, D. A. and L. McAlister-Henn.** 1990. "Subunit Structure, Expression, and Function of Nad(H)-Specific Isocitrate Dehydrogenase in Saccharomyces Cerevisiae." *J Bacteriol*, 172(8), pp. 4280-7.
- Khalimonchuk, O. and G. Rodel.** 2005. "Biogenesis of Cytochrome C Oxidase." *Mitochondrion*, 5(6), pp. 363-88.
- Kim, I. C. and D. S. Beattie.** 1973. "Formation of the Yeast Mitochondrial Membrane. 1. Effects of Inhibitors of Protein Synthesis on the Kinetics of Enzyme Appearance During Glucose Derepression." *Eur J Biochem*, 36(2), pp. 509-18.
- Kim, K. S.; M. S. Rosenkrantz and L. Guarente.** 1986. "Saccharomyces Cerevisiae Contains Two Functional Citrate Synthase Genes." *Mol Cell Biol*, 6(6), pp. 1936-42.
- King, M. P. and G. Attardi.** 1988. "Injection of Mitochondria into Human Cells Leads to a Rapid Replacement of the Endogenous Mitochondrial DNA." *Cell*, 52(6), pp. 811-9.
- Koehler, C. M.** 2004. "New Developments in Mitochondrial Assembly." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, pp. 309-35.
- Kornberg, H. L. and H. A. Krebs.** 1957. "Synthesis of Cell Constituents from C2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle." *Nature*, 179(4568), pp. 988-91.

- Kornberg, H. L. and H. Beevers.** 1957. "The Glyoxylate Cycle as a Stage in the Conversion of Fat to Carbohydrate in Castor Beans." *Biochim Biophys Acta*, 26(3), pp. 531-7.
- Krause, F.; N. H. Reifschneider; S. Goto and N. A. Dencher.** 2005. "Active Oligomeric Atp Synthases in Mammalian Mitochondria." *Biochem Biophys Res Commun*, 329(2), pp. 583-90.
- Kucej, M. and R. A. Butow.** 2007. "Evolutionary Tinkering with Mitochondrial Nucleoids." *Trends Cell Biol*, 17(12), pp. 586-92.
- Kucharczyk, R.; M. Zick; M. Bietenhader; M. Rak; E. Couplan; M. Blondel; S. D. Caubet and J. P. di Rago.** 2009. "Mitochondrial Atp Synthase Disorders: Molecular Mechanisms and the Quest for Curative Therapeutic Approaches." *Biochim Biophys Acta*, 1793(1), pp. 186-99.
- Kumar, A. and M. Snyder.** 2001. "Emerging Technologies in Yeast Genomics." *Nat Rev Genet*, 2(4), pp. 302-12.
- Laemmli, U. K.** 1970. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Lancaster, C. R.; A. Kroger; M. Auer and H. Michel.** 1999. "Structure of Fumarate Reductase from *Wolinella Succinogenes* at 2.2 Å Resolution." *Nature*, 402(6760), pp. 377-85.
- Land, J. M.; J. A. Morgan-Hughes; I. Hargreaves and S. J. Heales.** 2004. "Mitochondrial Disease: A Historical, Biochemical, and London Perspective." *Neurochem Res*, 29(3), pp. 483-91.
- Lander, E. S.; L. M. Linton; B. Birren; C. Nusbaum; M. C. Zody; J. Baldwin; K. Devon; K. Dewar; M. Doyle; W. FitzHugh, et al.** 2001. "Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome." *Nature*, 409(6822), pp. 860-921.
- Lang, B. F.; M. W. Gray and G. Burger.** 1999. "Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes." *Annu Rev Genet*, 33, pp. 351-97.
- Lange, C. and C. Hunte.** 2002. "Crystal Structure of the Yeast Cytochrome Bc1 Complex with Its Bound Substrate Cytochrome C." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), pp. 2800-5.
- Larsson, N. G.; J. Wang; H. Wilhelmsson; A. Oldfors; P. Rustin; M. Lewandoski; G. S. Barsh and D. A. Clayton.** 1998. "Mitochondrial Transcription Factor a Is Necessary for Mtdna Maintenance and Embryogenesis in Mice." *Nat Genet*, 18(3), pp. 231-6.
- Lecrenier, N.; P. Van Der Bruggen and F. Foury.** 1997. "Mitochondrial DNA Polymerases from Yeast to Man: A New Family of Polymerases." *Gene*, 185(1), pp. 147-52.
- Lefebvre-Legendre, L.; A. Balguerie; S. Duvezin-Caubet; M. F. Giraud; P. P. Slonimski and J. P. Di Rago.** 2003. "F1-Catalysed Atp Hydrolysis Is Required for Mitochondrial Biogenesis in *Saccharomyces Cerevisiae* Growing under Conditions Where It Cannot Breathe." *Mol Microbiol*, 47(5), pp. 1329-39.
- Lefebvre-Legendre, L.; J. Vaillier; H. Benabdelhak; J. Velours; P. P. Slonimski and J. P. di Rago.** 2001. "Identification of a Nuclear Gene (Fmc1) Required for the Assembly/Stability of Yeast Mitochondrial F(1)-Atpase in Heat Stress Conditions." *J Biol Chem*, 276(9), pp. 6789-96.
- Legros, F.; F. Malka; P. Frachon; A. Lombes and M. Rojo.** 2004. "Organization and Dynamics of Human Mitochondrial DNA." *J Cell Sci*, 117(Pt 13), pp. 2653-62.
- Lemire, B. D. and K. S. Oyedotun.** 2002. "The *Saccharomyces Cerevisiae* Mitochondrial Succinate:Ubiquinone Oxidoreductase." *Biochim Biophys Acta*, 1553(1-2), pp. 102-16.
- Lenaz, G. and M. L. Genova.** 2007. "Kinetics of Integrated Electron Transfer in the Mitochondrial Respiratory Chain: Random Collisions Vs. Solid State Electron Channeling." *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(4), pp. C1221-39.
- Leonard, J. V. and A. H. Schapira.** 2000. "Mitochondrial Respiratory Chain Disorders I: Mitochondrial DNA Defects." *Lancet*, 355(9200), pp. 299-304.
- Lheureux, P. E. and P. Hantson.** 2009. "Carnitine in the Treatment of Valproic Acid-Induced Toxicity." *Clin Toxicol (Phila)*, 47(2), pp. 101-11.
- Li, F. Y.; K. Nikali; J. Gegan; I. Leibiger; B. Leibiger; R. Schweyen; C. Larsson and A. Suomalainen.** 2001. "Characterization of a Novel Human Putative Mitochondrial Transporter Homologous to the Yeast Mitochondrial Rna Splicing Proteins 3 and 4." *FEBS Lett*, 494(1-2), pp. 79-84.
- Liao, X. and R. A. Butow.** 1993. "Rtg1 and Rtg2: Two Yeast Genes Required for a Novel Path of Communication from Mitochondria to the Nucleus." *Cell*, 72(1), pp. 61-71.
- Liao, X. S.; W. C. Small; P. A. Srere and R. A. Butow.** 1991. "Intramitochondrial Functions Regulate Nonmitochondrial Citrate Synthase (Cit2) Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, 11(1), pp. 38-46.
- Lillie, S. H. and J. R. Pringle.** 1980. "Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*: Responses to Nutrient Limitation." *J Bacteriol*, 143(3), pp. 1384-94.

- Liu Z, Butow RA.** 1999. "A Transcriptional Switch in the Expression of Yeast Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Response to a Reduction or Loss of Respiratory Function." *Mol Cell Biol*, 19(10), pp. 6720-8.
- Liu, F.; S. K. Ng; Y. Lu; W. Low; J. Lai and G. Jedd.** 2008. "Making Two Organelles from One: Woronin Body Biogenesis by Peroxisomal Protein Sorting." *J Cell Biol*, 180(2), pp. 325-39.
- Liu, Z. and R. A. Butow.** 2006. "Mitochondrial Retrograde Signaling." *Annu Rev Genet*, 40, pp. 159-85.
- Liu, Z.; T. Sekito; M. Spirek; J. Thornton and R. A. Butow.** 2003. "Retrograde Signaling Is Regulated by the Dynamic Interaction between Rtg2p and Mks1p." *Mol Cell*, 12(2), pp. 401-11.
- Lodi, T.; C. Bove; F. Fontanesi; A. M. Viola and I. Ferrero.** 2006. "Mutation D104g in Ant1 Gene: Complementation Study in *Saccharomyces Cerevisiae* as a Model System." *Biochem Biophys Res Commun*, 341(3), pp. 810-5.
- Lombardo, A. and I. E. Scheffler.** 1989. "Isolation and Characterization of a *Saccharomyces Cerevisiae* Mutant with a Disrupted Gene for the Ip Subunit of Succinate Dehydrogenase." *J Biol Chem*, 264(32), pp. 18874-7.
- Luft, R.; D. Ikkos; G. Palmieri; L. Ernster and B. Afzelius.** 1962. "A Case of Severe Hypermetabolism of Nonthyroid Origin with a Defect in the Maintenance of Mitochondrial Respiratory Control: A Correlated Clinical, Biochemical, and Morphological Study." *J Clin Invest*, 41, pp. 1776-804.
- Maarse, A. C. and L. A. Grivell.** 1987. "Nucleotide Sequence of the Gene Encoding the 11-Kda Subunit of the Ubiquinol-Cytochrome-C Oxidoreductase in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Eur J Biochem*, 165(2), pp. 419-25.
- Magasanik, B. and C. A. Kaiser.** 2002. "Nitrogen Regulation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Gene*, 290(1-2), pp. 1-18.
- Managadze, D.; C. Wurtz; M. Sichtung; G. Niehaus; M. Veenhuis and H. Rottensteiner.** 2007. "The Peroxin Pex14 of *Neurospora Crassa* Is Essential for the Biogenesis of Both Glyoxysomes and Woronin Bodies." *Traffic*, 8(6), pp. 687-701.
- Mancuso, M.; L. Salviati; S. Sacconi; D. Otaegui; P. Camano; A. Marina; S. Bacman; C. T. Moraes; J. R. Carlo; M. Garcia, et al.** 2002. "Mitochondrial DNA Depletion: Mutations in Thymidine Kinase Gene with Myopathy and Sma." *Neurology*, 59(8), pp. 1197-202.
- Mandel, H.; R. Szargel; V. Labay; O. Elpeleg; A. Saada; A. Shalata; Y. Anbinder; D. Berkowitz; C. Hartman; M. Barak, et al.** 2001a. "The Deoxyguanosine Kinase Gene Is Mutated in Individuals with Depleted Hepatocerebral Mitochondrial DNA." *Nat Genet*, 29(3), pp. 337-41.
- Mandel, H.; C. Hartman; D. Berkowitz; O. N. Elpeleg; I. Manov and T. C. Iancu.** 2001b. "The Hepatic Mitochondrial DNA Depletion Syndrome: Ultrastructural Changes in Liver Biopsies." *Hepatology*, 34(4 Pt 1), pp. 776-84.
- Mannella, C. A.; D. R. Pfeiffer; P. C. Bradshaw; Moraru, II; B. Slepchenko; L. M. Loew; C. E. Hsieh; K. Buttle and M. Marko.** 2001. "Topology of the Mitochondrial Inner Membrane: Dynamics and Bioenergetic Implications." *IUBMB Life*, 52(3-5), pp. 93-100.
- Mannella, C. A.; M. Marko and K. Buttle.** 1997. "Reconsidering Mitochondrial Structure: New Views of an Old Organelle." *Trends Biochem Sci*, 22(2), pp. 37-8.
- Mannella, C. A.; M. Marko; P. Penczek; D. Barnard and J. Frank.** 1994. "The Internal Compartmentation of Rat-Liver Mitochondria: Tomographic Study Using the High-Voltage Transmission Electron Microscope." *Microsc Res Tech*, 27(4), pp. 278-83.
- Margeot, A.; M. Garcia; W. Wang; E. Tetaud; J. P. di Rago and C. Jacq.** 2005. "Why Are Many Mrnas Translated to the Vicinity of Mitochondria: A Role in Protein Complex Assembly?" *Gene*, 354, pp. 64-71.
- Margulis, L.** 1970. "Origin of eukaryotic cells." *Yale University Press, New Haven, Conn.*
- Margulis, L.** 1975. "Symbiotic Theory of the Origin of Eukaryotic Organelles; Criteria for Proof." *Symp Soc Exp Biol*, (29), pp. 21-38.
- Mariotti, C.; V. Tiranti; F. Carrara; B. Dallapiccola; S. DiDonato and M. Zeviani.** 1994. "Defective Respiratory Capacity and Mitochondrial Protein Synthesis in Transformant Cybrids Harboring the Trna(Leu(Uur)) Mutation Associated with Maternally Inherited Myopathy and Cardiomyopathy." *J Clin Invest*, 93(3), pp. 1102-7.
- Markham, P. and A. J. Collinge.** 1987. "Woronin bodies of filamentous fungi." *FEMS Microbiol. Lett.* 46, pp. 1-11
- Martzen, M. R.; S. M. McCraith; S. L. Spinelli; F. M. Torres; S. Fields; E. J. Grayhack and E. M. Phizicky.** 1999. "A Biochemical Genomics Approach for Identifying Genes by the Activity of Their Products." *Science*, 286(5442), pp. 1153-5.
- Mashkevich, G.; B. Repetto; D. M. Glerum; C. Jin and A. Tzagoloff.** 1997. "Shy1, the Yeast Homolog of the Mammalian Surf-1 Gene, Encodes a Mitochondrial Protein Required for Respiration." *J Biol Chem*, 272(22), pp. 14356-64.

- Massa, V.; E. Fernandez-Vizarrá; S. Alshahwan; E. Bakhsh; P. Goffrini; I. Ferrero; P. Mereghetti; P. D'Adamo; P. Gasparini and M. Zeviani.** 2008. "Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in Cox6b1, a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase." *Am J Hum Genet*, 82(6), pp. 1281-9.
- Massari, M. E. and C. Murre.** 2000. "Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms." *Mol Cell Biol*, 20(2), pp. 429-40.
- Masuyama, M.; R. Iida; H. Takatsuka; T. Yasuda and T. Matsuki.** 2005. "Quantitative Change in Mitochondrial DNA Content in Various Mouse Tissues During Aging." *Biochim Biophys Acta*, 1723(1-3), pp. 302-8.
- Mathews, S.; R. J. Schweyen and F. Kaudewitz.** 1977. Preferential loss or retention of mitochondrial genes in rho-clones. *Mitochondria 1977: Genetics and biogenesis of mitochondria*. De Gruyter, Berlin.
- McAlister-Henn, L. and L. M. Thompson.** 1987. "Isolation and Expression of the Gene Encoding Yeast Mitochondrial Malate Dehydrogenase." *J Bacteriol*, 169(11), pp. 5157-66.
- McEwen, J. E.; C. Ko; B. Kloeckner-Gruissem and R. O. Poyton.** 1986. "Nuclear Functions Required for Cytochrome C Oxidase Biogenesis in *Saccharomyces Cerevisiae*. Characterization of Mutants in 34 Complementation Groups." *J Biol Chem*, 261(25), pp. 11872-9.
- McKenzie, M.; D. Liolitsa and M. G. Hanna.** 2003. "Mitochondrial Disease: Mutations and Mechanisms." *Neurochem Res*, 29(3), pp. 589-600.
- McKenzie, M.; M. Lazarou; D. R. Thorburn and M. T. Ryan.** 2007. "Analysis of Mitochondrial Subunit Assembly into Respiratory Chain Complexes Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Anal Biochem*, 364(2), pp. 128-37.
- Meusen, S.; Q. Tieu; E. Wong; E. Weiss; D. Schieltz; J. R. Yates and J. Nunnari.** 1999. "Mgm101p Is a Novel Component of the Mitochondrial Nucleoid That Binds DNA and Is Required for the Repair of Oxidatively Damaged Mitochondrial DNA." *J Cell Biol*, 145(2), pp. 291-304.
- Meyer zum Gottesberge, A. M. and H. Felix.** 2005. "Abnormal Basement Membrane in the Inner Ear and the Kidney of the Mpv17^{-/-} Mouse Strain: Ultrastructural and Immunohistochemical Investigations." *Histochem Cell Biol*, 124(6), pp. 507-16.
- Meyer zum Gottesberge, A. M.; A. Reuter and H. Weiher.** 1996. "Inner Ear Defect Similar to Alport's Syndrome in the Glomerulosclerosis Mouse Model Mpv17." *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 253(8), pp. 470-4.
- Miller, S. M. and B. Magasanik.** 1990. "Role of Nad-Linked Glutamate Dehydrogenase in Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*." *J Bacteriol*, 172(9), pp. 4927-35.
- Minnauro-Sanmiguel, F.; S. Wilkens and J. J. Garcia.** 2005. "Structure of Dimeric Mitochondrial Atp Synthase: Novel F0 Bridging Features and the Structural Basis of Mitochondrial Cristae Biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35), pp. 12356-8.
- Mita, S.; B. Schmidt; E. A. Schon; S. DiMauro and E. Bonilla.** 1989. "Detection Of "Deleted" Mitochondrial Genomes in Cytochrome-C Oxidase-Deficient Muscle Fibers of a Patient with Kearns-Sayre Syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23), pp. 9509-13.
- Miyakawa, I.; N. Sando; S. Kawano; S. Nakamura and T. Kuroiwa.** 1987. "Isolation of Morphologically Intact Mitochondrial Nucleoids from the Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae*." *J Cell Sci*, 88 (Pt 4), pp. 431-9.
- Momany, M.; E. A. Richardson; C. Van Sickle and G. Jedd.** 2002. "Mapping Woronin body position in *Aspergillus nidulans*". *Mycologia*. 94, pp. 260 – 6 .
- Mootha, V. K.; P. Lepage; K. Miller; J. Bunkenborg; M. Reich; M. Hjerrild; T. Delmonte; A. Villeneuve; R. Sladek; F. Xu, et al.** 2003. "Identification of a Gene Causing Human Cytochrome C Oxidase Deficiency by Integrative Genomics." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(2), pp. 605-10.
- Moraes, C. T.; S. Shanske; H. J. Tritschler; J. R. Aprille; F. Andreetta; E. Bonilla; E. A. Schon and S. DiMauro.** 1991. "Mtdna Depletion with Variable Tissue Expression: A Novel Genetic Abnormality in Mitochondrial Diseases." *Am J Hum Genet*, 48(3), pp. 492-501.
- Morin et al.** 1992. "AAT2, a gene encoding a mitochondrial aspartate aminotransferase in *S. cerevisiae*." *Biochim. Biophys. Acta*. 1171 (2), pp. 211-4.
- Munn E.A.** 1974. "The Structure of Mitochondria." *Academic Press, London, New York*.
- Nagai, S.; N. Yanagishima and H. Nagai.** 1961. "Advances in the Study of Respiration-Deficient (Rd) Mutation in Yeast and Other Microorganisms." *Bacteriol Rev*, 25, pp. 404-26.
- Nagiec, M. M.; E. E. Nagiec; J. A. Baltisberger; G. B. Wells; R. L. Lester and R. C. Dickson.** 1997. "Sphingolipid Synthesis as a Target for Antifungal Drugs. Complementation of the Inositol Phosphorylceramide Synthase Defect in a Mutant Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* by the Aur1 Gene." *J Biol Chem*, 272(15), pp. 9809-17.

- Naithani, S.; S. A. Saracco; C. A. Butler and T. D. Fox.** 2003. "Interactions among Cox1, Cox2, and Cox3 Mrna-Specific Translational Activator Proteins on the Inner Surface of the Mitochondrial Inner Membrane of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Mol Biol Cell*, 14(1), pp. 324-33.
- Nakamoto, R. K.; C. J. Ketchum and M. K. al-Shawi.** 1999. "Rotational Coupling in the F0f1 Atp Synthase." *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 28, pp. 205-34.
- Nasmyth, K. A. and S. I. Reed.** 1980. "Isolation of Genes by Complementation in Yeast: Molecular Cloning of a Cell-Cycle Gene." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(4), pp. 2119-23.
- Navarro-Sastre, A.; E. Martin-Hernandez; Y. Campos; E. Quintana; E. Medina; R. S. de Las Heras; M. Lluch; A. Munoz; P. del Hoyo; R. Martin, et al.** 2008. "Lethal Hepatopathy and Leukodystrophy Caused by a Novel Mutation in Mpv17 Gene: Description of an Alternative Mpv17 Spliced Form." *Mol Genet Metab*, 94(2), pp. 234-9.
- Neupert, W.** 1997. "Protein Import into Mitochondria." *Annu Rev Biochem*, 66, pp. 863-917.
- Neupert, W. and J. M. Herrmann.** 2007. "Translocation of Proteins into Mitochondria." *Annu Rev Biochem*, 76, pp. 723-49.
- Nijtmans, L. G.; J. W. Taanman; A. O. Muijsers; D. Speijer and C. Van den Bogert.** 1998. "Assembly of Cytochrome-C Oxidase in Cultured Human Cells." *Eur J Biochem*, 254(2), pp. 389-94.
- Nijtmans, L. G.; N. S. Henderson and I. J. Holt.** 2002. "Blue Native Electrophoresis to Study Mitochondrial and Other Protein Complexes." *Methods*, 26(4), pp. 327-34.
- Nobrega, F. G. and A. Tzagoloff.** 1980. "Assembly of the Mitochondrial Membrane System. DNA Sequence and Organization of the Cytochrome B Gene in *Saccharomyces Cerevisiae* D273-10b." *J Biol Chem*, 255(20), pp. 9828-37.
- Nobrega, F. G.; M. P. Nobrega and A. Tzagoloff.** 1992. "Bcs1, a Novel Gene Required for the Expression of Functional Rieske Iron-Sulfur Protein in *Saccharomyces Cerevisiae*." *EMBO J*, 11(11), pp. 3821-9.
- Nordlund, P. and P. Reichard.** 2006. "Ribonucleotide Reductases." *Annu Rev Biochem*, 75, pp. 681-706.
- Nosek, J. and L. Tomaska.** 2003. "Mitochondrial Genome Diversity: Evolution of the Molecular Architecture and Replication Strategy." *Curr Genet*, 44(2), pp. 73-84.
- Nunnari, J.; W. F. Marshall; A. Straight; A. Murray; J. W. Sedat and P. Walter.** 1997. "Mitochondrial Transmission During Mating in *Saccharomyces Cerevisiae* Is Determined by Mitochondrial Fusion and Fission and the Intramitochondrial Segregation of Mitochondrial DNA." *Mol Biol Cell*, 8(7), pp. 1233-42.
- O'Bryan, T.; H. Weiher; H. G. Rennke; S. Kren and T. H. Hostetter.** 2000. "Course of Renal Injury in the Mpv17-Deficient Transgenic Mouse." *J Am Soc Nephrol*, 11(6), pp. 1067-74.
- Ochoa, S.** 1954. "Enzymic Mechanisms in the Citric Acid Cycle." *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, 15, pp. 183-270.
- Olesen, J. T. and L. Guarente.** 1990. "The Hap2 Subunit of Yeast Ccaat Transcriptional Activator Contains Adjacent Domains for Subunit Association and DNA Recognition: Model for the Hap2/3/4 Complex." *Genes Dev*, 4(10), pp. 1714-29.
- Oskoui, M.; G. Davidzon; J. Pascual; R. Erazo; J. Gurgel-Giannetti; S. Krishna; E. Bonilla; D. C. De Vivo; S. Shanske and S. DiMauro.** 2006. "Clinical Spectrum of Mitochondrial DNA Depletion Due to Mutations in the Thymidine Kinase 2 Gene." *Arch Neurol*, 63(8), pp. 1122-6.
- Osman, C.; C. Wilmes; T. Tatsuta and T. Langer.** 2007. "Prohibitins Interact Genetically with Atp23, a Novel Processing Peptidase and Chaperone for the F1fo-Atp Synthase." *Mol Biol Cell*, 18(2), pp. 627-35.
- Ostergaard, E.; F. J. Hansen; N. Sorensen; M. Duno; J. Vissing; P. L. Larsen; O. Faeroe; S. Thorgrimsson; F. Wibrand; E. Christensen, et al.** 2007a. "Mitochondrial Encephalomyopathy with Elevated Methylmalonic Acid Is Caused by Sucla2 Mutations." *Brain*, 130(Pt 3), pp. 853-61.
- Ostergaard, E.; E. Christensen; E. Kristensen; B. Mogensen; M. Duno; E. A. Shoubridge and F. Wibrand.** 2007b. "Deficiency of the Alpha Subunit of Succinate-Coenzyme a Ligase Causes Fatal Infantile Lactic Acidosis with Mitochondrial DNA Depletion." *Am J Hum Genet*, 81(2), pp. 383-7.
- Otsuka, M.; Y. Mizuno; M. Yoshida; Y. Kagawa and S. Ohta.** 1988. "Nucleotide Sequence of Cdna Encoding Human Cytochrome C Oxidase Subunit Vic." *Nucleic Acids Res*, 16(22), pp. 10916.
- Oudshoorn, P.; H. Van Steeg; B. W. Swinkels; P. Schoppink and L. A. Grivell.** 1987. "Subunit Ii of Yeast Qh2: Cytochrome-C Oxidoreductase. Nucleotide Sequence of the Gene and Features of the Protein." *Eur J Biochem*, 163(1), pp. 97-103.
- Oyedotun, K. S. and B. D. Lemire.** 1997. "The Carboxyl Terminus of the *Saccharomyces Cerevisiae* Succinate Dehydrogenase Membrane Subunit, Sdh4p, Is Necessary for Ubiquinone Reduction and Enzyme Stability." *J Biol Chem*, 272(50), pp. 31382-8.

- Oyedotun KS, Lemire BD.** 1999a. "The Saccharomyces Cerevisiae Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase. Identification of Sdh3p Amino Acid Residues Involved in Ubiquinone Binding." *J Biol Chem*, 274(34), pp. 23956-62.
- Oyedotun, K. S. and B. D. Lemire.** 1999b. "The Saccharomyces Cerevisiae Succinate-Ubiquinone Reductase Contains a Stoichiometric Amount of Cytochrome B562." *FEBS Lett*, 442(2-3), pp. 203-7.
- Palade GE.** 1952. "The Fine Structure of Mitochondria." *Anat Rec*, 114(3), pp. 427-51.
- Palade, G. E.** 1953. "An Electron Microscope Study of the Mitochondrial Structure." *J Histochem Cytochem*, 1(4), pp. 188-211.
- Palmieri, L.; G. Agrimi; M. J. Runswick; I. M. Fearnley; F. Palmieri and J. E. Walker.** 2001. "Identification in Saccharomyces Cerevisiae of Two Isoforms of a Novel Mitochondrial Transporter for 2-Oxoadipate and 2-Oxoglutarate." *J Biol Chem*, 276(3), pp. 1916-22.
- Palmieri, L.; S. Alberio; I. Pisano; T. Lodi; M. Meznaric-Petrusa; J. Zidar; A. Santoro; P. Scarcia; F. Fontanesi; E. Lamantea, et al.** 2005. "Complete Loss-of-Function of the Heart/Muscle-Specific Adenine Nucleotide Translocator Is Associated with Mitochondrial Myopathy and Cardiomyopathy." *Hum Mol Genet*, 14(20), pp. 3079-88.
- Parikh, V. S.; M. M. Morgan; R. Scott; L. S. Clements and R. A. Butow.** 1987. "The Mitochondrial Genotype Can Influence Nuclear Gene Expression in Yeast." *Science*, 235(4788), pp. 576-80.
- Parini, R.; F. Furlan; L. Notarangelo; A. Spinazzola; G. Uziel; P. Strisciuglio; D. Concolino; C. Corbetta; G. Nebbia; F. Menni, et al.** 2009. "Glucose Metabolism and Diet-Based Prevention of Liver Dysfunction in Mpv17 Mutant Patients." *J Hepatol*, 50(1), pp. 215-21.
- Parrou, J. L.; B. Enjalbert; L. Plourde; A. Bauche; B. Gonzalez and J. Francois.** 1999. "Dynamic Responses of Reserve Carbohydrate Metabolism under Carbon and Nitrogen Limitations in Saccharomyces Cerevisiae." *Yeast*, 15(3), pp. 191-203.
- Parrou, J. L.; M. A. Teste and J. Francois.** 1997. "Effects of Various Types of Stress on the Metabolism of Reserve Carbohydrates in Saccharomyces Cerevisiae: Genetic Evidence for a Stress-Induced Recycling of Glycogen and Trehalose." *Microbiology*, 143 (Pt 6), pp. 1891-900.
- Paul, M. F.; S. Ackerman; J. Yue; G. Arselin; J. Velours; A. Tzagolof and S. Ackermann.** 1994. "Cloning of the Yeast Atp3 Gene Coding for the Gamma-Subunit of F1 and Characterization of Atp3 Mutants." *J Biol Chem*, 269(42), pp. 26158-64.
- Paumard, P.; J. Vaillier; B. Coulary; J. Schaeffer; V. Soubannier; D. M. Mueller; D. Brethes; J. P. di Rago and J. Velours.** 2002. "The Atp Synthase Is Involved in Generating Mitochondrial Cristae Morphology." *EMBO J*, 21(3), pp. 221-30.
- Pebay-Peyroula, E.; C. Dahout-Gonzalez; R. Kahn; V. Trezeguet; G. J. Lauquin and G. Brandolin.** 2003. "Structure of Mitochondrial Adp/Atp Carrier in Complex with Carboxyatractyloside." *Nature*, 426(6962), pp. 39-44.
- Perkins, G.; C. Renken; M. E. Martone; S. J. Young; M. Ellisman and T. Frey.** 1997. "Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts." *J Struct Biol*, 119(3), pp. 260-72.
- Petruzzella, V.; V. Tiranti; P. Fernandez; P. Ianna; R. Carrozzo and M. Zeviani.** 1998. "Identification and Characterization of Human Cdnas Specific to Bcs1, Pet112, Sco1, Cox15, and Cox11, Five Genes Involved in the Formation and Function of the Mitochondrial Respiratory Chain." *Genomics*, 54(3), pp. 494-504.
- Pfaff, E. and M. Klingenberg.** 1968. "Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria. 1. Specificity and Control." *Eur J Biochem*, 6(1), pp. 66-79.
- Pfeifer, G. P.** 2006. "Mutagenesis at Methylated Cpg Sequences." *Curr Top Microbiol Immunol*, 301, pp. 259-81.
- Pfeiffer, K.; V. Gohil; R. A. Stuart; C. Hunte; U. Brandt; M. L. Greenberg and H. Schagger.** 2003. "Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes." *J Biol Chem*, 278(52), pp. 52873-80.
- Phillips, J. D.; L. A. Graham and B. L. Trumpower.** 1993. "Subunit 9 of the Saccharomyces Cerevisiae Cytochrome Bc1 Complex Is Required for Insertion of Epr-Detectable Iron-Sulfur Cluster into the Rieske Iron-Sulfur Protein." *J Biol Chem*, 268(16), pp. 11727-36.
- Piko, L. and K. D. Taylor.** 1987. "Amounts of Mitochondrial DNA and Abundance of Some Mitochondrial Gene Transcripts in Early Mouse Embryos." *Dev Biol*, 123(2), pp. 364-74.
- Pon, L. A.; D. Vestweber; M. Yang and G. Schatz.** 1989. "Interaction between Mitochondria and the Nucleus." *J Cell Sci Suppl*, 11, pp. 1-11.
- Poulton, J.; M. Hirano; A. Spinazzola; M. Arenas Hernandez; C. Jardel; A. Lombes; B. Czermin; R. Horvath; J. W. Taanman; A. Rotig, et al.** 2009. "Collated Mutations in Mitochondrial DNA (Mtdna) Depletion

- Syndrome (Excluding the Mitochondrial Gamma Polymerase, Polg1)." *Biochim Biophys Acta*, 1792(12), pp. 1109-12.
- Poulton, J.; V. Macaulay and D. R. Marchington.** 1998. "Mitochondrial Genetics '98 Is the Bottleneck Cracked?" *Am J Hum Genet*, 62(4), pp. 752-7.
- Preiss, T.; S. A. Lowerson; K. Weber and R. N. Lightowers.** 1995. "Human Mitochondria: Distinct Organelles or Dynamic Network?" *Trends Genet*, 11(6), pp. 211-2.
- Rabl, R.; V. Soubannier; R. Scholz; F. Vogel; N. Mendl; A. Vasiljev-Neumeyer; C. Korner; R. Jagasia; T. Keil; W. Baumeister, et al.** 2009. "Formation of Cristae and Crista Junctions in Mitochondria Depends on Antagonism between Fcjl and Su E/G." *J Cell Biol*, 185(6), pp. 1047-63.
- Ragan, C. I.; M. T. Wilson; V. M. Darley-Usmar and P. N. Lowe.** 1987. "Subfractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation." Darley-Usmar VM, Rickwood D and Wilson MT (eds). "Mitochondria: A Practical Approach." *IRL Press, Oxford*, pp. 79-112.
- Rahman, S.; R. B. Blok; H. H. Dahl; D. M. Danks; D. M. Kirby; C. W. Chow; J. Christodoulou and D. R. Thorburn.** 1996. "Leigh Syndrome: Clinical Features and Biochemical and DNA Abnormalities." *Ann Neurol*, 39(3), pp. 343-51.
- Rak, M.; X. Zeng; J. J. Briere and A. Tzagoloff.** 2009. "Assembly of F0 in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta*, 1793(1), pp. 108-16.
- Rehling, P.; N. Pfanner and C. Meisinger.** 2003. "Insertion of Hydrophobic Membrane Proteins into the Inner Mitochondrial Membrane--a Guided Tour." *J Mol Biol*, 326(3), pp. 639-57.
- Resnick, M. A. and B. S. Cox.** 2000. "Yeast as an Honorary Mammal." *Mutat Res*, 451(1-2), pp. 1-11.
- Revel, J. P.; D. W. Fawcett and C. W. Philpott.** 1963. "Observations on Mitochondrial Structure Angular Configurations of the Cristae." *J Cell Biol*, 16, pp. 187-95.
- Richter, C.; J. W. Park and B. N. Ames.** 1988. "Normal Oxidative Damage to Mitochondrial and Nuclear DNA Is Extensive." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(17), pp. 6465-7.
- Robinson, K. M.; A. von Kieckebusch-Guck and B. D. Lemire.** 1991. "Isolation and Characterization of a *Saccharomyces Cerevisiae* Mutant Disrupted for the Succinate Dehydrogenase Flavoprotein Subunit." *J Biol Chem*, 266(32), pp. 21347-50.
- Robinson, K. M.; R. A. Rothery; J. H. Weiner and B. D. Lemire.** 1994. "The Covalent Attachment of Fad to the Flavoprotein of *Saccharomyces Cerevisiae* Succinate Dehydrogenase Is Not Necessary for Import and Assembly into Mitochondria." *Eur J Biochem*, 222(3), pp. 983-90.
- Ropp, P. A. and W. C. Copeland.** 1996. "Cloning and Characterization of the Human Mitochondrial DNA Polymerase, DNA Polymerase Gamma." *Genomics*, 36(3), pp. 449-58.
- Rosenkrantz, M.; C. S. Kell; E. A. Pennell; M. Webster and L. J. Devenish.** 1994a. "Distinct Upstream Activation Regions for Glucose-Repressed and Derepressed Expression of the Yeast Citrate Synthase Gene Cit1." *Curr Genet*, 25(3), pp. 185-95.
- Rosenkrantz, M.; C. S. Kell; E. A. Pennell and L. J. Devenish.** 1994b. "The Hap2,3,4 Transcriptional Activator Is Required for Derepression of the Yeast Citrate Synthase Gene, Cit1." *Mol Microbiol*, 13(1), pp. 119-31.
- Rossignol, R.; B. Faustin; C. Rocher; M. Malgat; J. P. Mazat and T. Letellier.** 2003. "Mitochondrial Threshold Effects." *Biochem J*, 370(Pt 3), pp. 751-62.
- Rothermel, B. A.; J. L. Thornton and R. A. Butow.** 1997. "Rtg3p, a Basic Helix-Loop-Helix/Leucine Zipper Protein That Functions in Mitochondrial-Induced Changes in Gene Expression, Contains Independent Activation Domains." *J Biol Chem*, 272(32), pp. 19801-7.
- Russell, S.** 2007. "Carnitine as an antidote for acute valproate toxicity in children" *Curr Opin Pediatr*. 19, pp. 206-10.
- Saada, A.; A. Shaag; H. Mandel; Y. Nevo; S. Eriksson and O. Elpeleg.** 2001. "Mutant Mitochondrial Thymidine Kinase in Mitochondrial DNA Depletion Myopathy." *Nat Genet*, 29(3), pp. 342-4.
- Sadler, I.; K. Suda; G. Schatz; F. Kaudewitz and A. Haid.** 1984. "Sequencing of the Nuclear Gene for the Yeast Cytochrome C1 Precursor Reveals an Unusually Complex Amino-Terminal Presequence." *EMBO J*, 3(9), pp. 2137-43.
- Sarzi, E.; S. Goffart; V. Serre; D. Chretien; A. Slama; A. Munnich; J. N. Spelbrink and A. Rotig.** 2007a. "Twinkle Helicase (Pco1) Gene Mutation Causes Mitochondrial DNA Depletion." *Ann Neurol*, 62(6), pp. 579-87.
- Sarzi, E.; A. Bourdon; D. Chretien; M. Zarhrate; J. Corcos; A. Slama; V. Cormier-Daire; P. de Lonlay; A. Munnich and A. Rotig.** 2007b. "Mitochondrial DNA Depletion Is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood." *J Pediatr*, 150(5), pp. 531-4, 34 e1-6.

- Sato, H.; A. Tachifuji; M. Tamura and I. Miyakawa.** 2002. "Identification of the Ymn-1 Antigen Protein and Biochemical Analyses of Protein Components in the Mitochondrial Nucleoid Fraction of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Protoplasma*, 219(1-2), pp. 51-8.
- Schagger H.** 2002. "Respiratory Chain Supercomplexes of Mitochondria and Bacteria." *Biochim Biophys Acta*, 1555(1-3), pp. 154-9.
- Schagger, H.** 2001. "Respiratory Chain Supercomplexes." *IUBMB Life*, 52(3-5), pp. 119-28.
- Schagger, H. and G. von Jagow.** 1987. "Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 Kda." *Anal Biochem*, 166(2), pp. 368-79.
- Schagger, H. and G. von Jagow.** 1991. "Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form." *Anal Biochem*, 199(2), pp. 223-31.
- Schagger, H. and K. Pfeiffer.** 2000. "Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria." *EMBO J*, 19(8), pp. 1777-83.
- Scheffler I. E.** 1999. "Mitochondria." *Wiley-Liss*.
- Scheffler I. E.** 2000. "A century of mitochondrial research: achievements and perspectives." *Mitochondrion*. 1, pp. 3-31.
- Schenkel, J.; R. M. Zwacka; C. Rutenberg; A. Reuter; R. Waldherr and H. Weiher.** 1995. "Functional Rescue of the Glomerulosclerosis Phenotype in Mpv17 Mice by Transgenesis with the Human Mpv17 Homologue." *Kidney Int*, 48(1), pp. 80-4.
- Schlame, M.; D. Rua and M. L. Greenberg.** 2000. "The Biosynthesis and Functional Role of Cardiolipin." *Prog Lipid Res*, 39(3), pp. 257-88.
- Schmidt, D. M.; M. Saghbini and I. E. Scheffler.** 1992. "The C-Terminus of the Succinate Dehydrogenase Ip Peptide of *Saccharomyces Cerevisiae* Is Significant for Assembly of Complex Ii." *Biochemistry*, 31(36), pp. 8442-8.
- Schon, E. A.; E. Bonilla and S. DiMauro.** 1997. "Mitochondrial DNA Mutations and Pathogenesis." *J Bioenerg Biomembr*, 29(2), pp. 131-49.
- Schon, E. A.; R. Rizzuto; C. T. Moraes; H. Nakase; M. Zeviani and S. DiMauro.** 1989. "A Direct Repeat Is a Hotspot for Large-Scale Deletion of Human Mitochondrial DNA." *Science*, 244(4902), pp. 346-9.
- Schuller, C.; Y. M. Mamnun; M. Mollapour; G. Krapf; M. Schuster; B. E. Bauer; P. W. Piper and K. Kuchler.** 2004. "Global Phenotypic Analysis and Transcriptional Profiling Defines the Weak Acid Stress Response Regulon in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Mol Biol Cell*, 15(2), pp. 706-20.
- Schwimmer, C.; L. Lefebvre-Legendre; M. Rak; A. Devin; P. P. Slonimski; J. P. di Rago and M. Rigoulet.** 2005. "Increasing Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation Can Rescue Respiratory Growth of an Atp Synthase-Deficient Yeast." *J Biol Chem*, 280(35), pp. 30751-9.
- Sekito, T.; J. Thornton and R. A. Butow.** 2000. "Mitochondria-to-Nuclear Signaling Is Regulated by the Subcellular Localization of the Transcription Factors Rtg1p and Rtg3p." *Mol Biol Cell*, 11(6), pp. 2103-15.
- Sekito, T.; Z. Liu; J. Thornton and R. A. Butow.** 2002. "Rtg-Dependent Mitochondria-to-Nucleus Signaling Is Regulated by Mks1 and Is Linked to Formation of Yeast Prion [Ure3]." *Mol Biol Cell*, 13(3), pp. 795-804.
- Senior, A. E.; S. Nadanaciva and J. Weber.** 2002. "The Molecular Mechanism of Atp Synthesis by F1f0-Atp Synthase." *Biochim Biophys Acta*, 1553(3), pp. 188-211.
- Servidei, S.** 2002. "Mitochondrial Encephalomyopathies: Gene Mutation." *Neuromuscul Disord*, 12(1), pp. 101-10.
- Shadel, G. S.** 1999. "Yeast as a Model for Human Mtdna Replication." *Am J Hum Genet*, 65(5), pp. 1230-7.
- Sherman, F.** 1956. "The heat inactivation and production of cytochrome deficiency in yeast." *Exp. Cell Res.* 11, pp. 659-70.
- Sherman, F.** 1959. "The effects of elevated temperatures on yeast: II. Induction of respiratory-deficient mutants." *J. Cell. Comp. Physiol.* 54, pp. 37-52.
- Sherman, F.; G. R. Fink and J. B. Hicks.** 1986. "Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Shoubridge, E. A.** 2001. "Nuclear Genetic Defects of Oxidative Phosphorylation." *Hum Mol Genet*, 10(20), pp. 2277-84.
- Sickmann, A.; J. Reinders; Y. Wagner; C. Joppich; R. Zahedi; H. E. Meyer; B. Schonfisch; I. Perschil; A. Chacinska; B. Guiard, et al.** 2003. "The Proteome of *Saccharomyces Cerevisiae* Mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), pp. 13207-12.
- Singer, T. P.; V. Massey and E. B. Kearney.** 1957. "Studies on Succinic Dehydrogenase. V. Isolation and Properties of the Dehydrogenase from Baker's Yeast." *Arch Biochem Biophys*, 69, pp. 405-21.
- Singleton, R.; S. D. Helgerson; R. D. Snyder; P. J. O'Conner; S. Nelson; S. D. Johnsen and J. E. Allanson.** 1990. "Neuropathy in Navajo Children: Clinical and Epidemiologic Features." *Neurology*, 40(2), pp. 363-7.

- Skulachev, V. P.** 2007. "A Biochemical Approach to the Problem of Aging: "Megaproject" On Membrane-Penetrating Ions. The First Results and Prospects." *Biochemistry (Mosc)*, 72(12), pp. 1385-96.
- Slattery, M. G.; D. Liko and W. Heideman.** 2006. "The Function and Properties of the Azf1 Transcriptional Regulator Change with Growth Conditions in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Eukaryot Cell*, 5(2), pp. 313-20.
- Slonimski, P. P.; G. Perrodin and J. H. Croft.** 1968. "Ethidium Bromide Induced Mutation of Yeast Mitochondria: Complete Transformation of Cells into Respiratory Deficient Non-Chromosomal "Petites"." *Biochem Biophys Res Commun*, 30(3), pp. 232-9.
- Smeitink, J. A.; M. Zeviani; D. M. Turnbull and H. T. Jacobs.** 2006. "Mitochondrial Medicine: A Metabolic Perspective on the Pathology of Oxidative Phosphorylation Disorders." *Cell Metab*, 3(1), pp. 9-13.
- Smith, E. H.; R. Janknecht and L. J. Maher, 3rd.** 2007. "Succinate Inhibition of Alpha-Ketoglutarate-Dependent Enzymes in a Yeast Model of Paraganlioma." *Hum Mol Genet*, 16(24), pp. 3136-48.
- Smith, J. L.; H. Zhang; J. Yan; G. Kurisu and W. A. Cramer.** 2004. "Cytochrome Bc Complexes: A Common Core of Structure and Function Surrounded by Diversity in the Outlying Provinces." *Curr Opin Struct Biol*, 14(4), pp. 432-9.
- Sokal, E. M.; R. Sokol; V. Cormier; F. Lacaille; P. McKiernan; F. J. Van Spronsen; O. Bernard and J. M. Saudubray.** 1999. "Liver Transplantation in Mitochondrial Respiratory Chain Disorders." *Eur J Pediatr*, 158 Suppl 2, pp. S81-4.
- Soubannier, V.; J. Vaillier; P. Paumard; B. Coulary; J. Schaeffer and J. Velours.** 2002. "In the Absence of the First Membrane-Spanning Segment of Subunit 4(B), the Yeast Atp Synthase Is Functional but Does Not Dimerize or Oligomerize." *J Biol Chem*, 277(12), pp. 10739-45.
- Spannagel, C.; J. Vaillier; G. Arselin; P. V. Graves and J. Velours.** 1997. "The Subunit F of Mitochondrial Yeast Atp Synthase--Characterization of the Protein and Disruption of the Structural Gene Atp17." *Eur J Biochem*, 247(3), pp. 1111-7.
- Spinazzola, A.; C. Viscomi; E. Fernandez-Vizarra; F. Carrara; P. D'Adamo; S. Calvo; R. M. Marsano; C. Donnini; H. Weiher; P. Strisciuglio, et al.** 2006. "Mpv17 Encodes an Inner Mitochondrial Membrane Protein and Is Mutated in Infantile Hepatic Mitochondrial DNA Depletion." *Nat Genet*, 38(5), pp. 570-5.
- Spinazzola, A.; F. Invernizzi; F. Carrara; E. Lamantea; A. Donati; M. Dirocco; I. Giordano; M. Meznaric-Petrusa; E. Baruffini; I. Ferrero, et al.** 2008a. "Clinical and Molecular Features of Mitochondrial DNA Depletion Syndromes." *J Inherit Metab Dis*, 32(2), pp. 143-58.
- Spinazzola, A.; R. Santer; O. H. Akman; K. Tsiakas; H. Schaefer; X. Ding; C. L. Karadimas; S. Shanske; J. Ganesh; S. Di Mauro, et al.** 2008b. "Hepatocerebral Form of Mitochondrial DNA Depletion Syndrome: Novel Mpv17 Mutations." *Arch Neurol*, 65(8), pp. 1108-13.
- Spinazzola, A.; V. Massa; M. Hirano and M. Zeviani.** 2008c. "Lack of Founder Effect for an Identical Mtdna Depletion Syndrome (Mds)-Associated Mpv17 Mutation Shared by Navajos and Italians." *Neuromuscul Disord*, 18(4), pp. 315-8.
- Srere, P. A.** 1969. "Citrate synthase." *Methods Enzymol*, 13, pp. 3-15.
- Steinmetz, L. M.; C. Scharfe; A. M. Deutschbauer; D. Mokranjac; Z. S. Herman; T. Jones; A. M. Chu; G. Giaever; H. Prokisch; P. J. Oefner, et al.** 2002. "Systematic Screen for Human Disease Genes in Yeast." *Nat Genet*, 31(4), pp. 400-4.
- Stock, D.; A. G. Leslie and J. E. Walker.** 1999. "Molecular Architecture of the Rotary Motor in Atp Synthase." *Science*, 286(5445), pp. 1700-5.
- Stock, D.; C. Gibbons; I. Arechaga; A. G. Leslie and J. E. Walker.** 2000. "The Rotary Mechanism of Atp Synthase." *Curr Opin Struct Biol*, 10(6), pp. 672-9.
- Strauss, M.; G. Hofhaus; R. R. Schroder and W. Kuhlbrandt.** 2008. "Dimer Ribbons of Atp Synthase Shape the Inner Mitochondrial Membrane." *EMBO J*, 27(7), pp. 1154-60.
- Stricker, S.; H. Pruss; R. Horvath; E. Baruffini; T. Lodi; E. Siebert; M. Endres; R. Zschenderlein and A. Meisel.** 2009. "A Variable Neurodegenerative Phenotype with Polymerase Gamma Mutation." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80(10), pp. 1181-2.
- Stuart, J. A. and M. F. Brown.** 2006. "Mitochondrial DNA Maintenance and Bioenergetics." *Biochim Biophys Acta*, 1757(2), pp. 79-89.
- Stuart, R. A.** 2008. "Supercomplex Organization of the Oxidative Phosphorylation Enzymes in Yeast Mitochondria." *J Bioenerg Biomembr*, 40(5), pp. 411-7.
- Sutovsky, P.; R. D. Moreno; J. Ramalho-Santos; T. Dominko; C. Simerly and G. Schatten.** 1999. "Ubiquitin Tag for Sperm Mitochondria." *Nature*, 402(6760), pp. 371-2.
- Suzuki, Y. J.; M. Tsuchiya and L. Packer.** 1991. "Thioctic Acid and Dihydrolipoic Acid Are Novel Antioxidants Which Interact with Reactive Oxygen Species." *Free Radic Res Commun*, 15(5), pp. 255-63.

- Swiegers, J. H.; N. Dippenaar; I. S. Pretorius and F. F. Bauer.** 2001. "Carnitine-Dependent Metabolic Activities in *Saccharomyces Cerevisiae*: Three Carnitine Acetyltransferases Are Essential in a Carnitine-Dependent Strain." *Yeast*, 18(7), pp. 585-95.
- Sylvestre, J.; S. Vialette; M. Corral Debrinski and C. Jacq.** 2003. "Long Mrnas Coding for Yeast Mitochondrial Proteins of Prokaryotic Origin Preferentially Localize to the Vicinity of Mitochondria." *Genome Biol*, 4(7), pp. R44.
- Sztajnkrzyca, M. D.** 2002. "Valproic Acid Toxicity: Overview and Management." *J Toxicol Clin Toxicol*, 40(6), pp. 789-801.
- Tan, K.; H. Feizi; C. Luo; S. H. Fan; T. Ravasi and T. G. Ideker.** 2008. "A Systems Approach to Delineate Functions of Paralogous Transcription Factors: Role of the Yap Family in the DNA Damage Response." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(8), pp. 2934-9.
- Tanaka, H.; H. Arakawa; T. Yamaguchi; K. Shiraishi; S. Fukuda; K. Matsui; Y. Takei and Y. Nakamura.** 2000. "A Ribonucleotide Reductase Gene Involved in a P53-Dependent Cell-Cycle Checkpoint for DNA Damage." *Nature*, 404(6773), pp. 42-9.
- Tey, W. K.; A. J. North; J. L. Reyes; Y. F. Lu and G. Jedd.** 2005. "Polarized Gene Expression Determines Woronin Body Formation at the Leading Edge of the Fungal Colony." *Mol Biol Cell*, 16(6), pp. 2651-9.
- Thomas, B. J. and R. Rothstein.** 1989. "Elevated Recombination Rates in Transcriptionally Active DNA." *Cell*, 56(4), pp. 619-30.
- Thomas, D.; P. Bron; T. Weimann; A. Dautant; M. F. Giraud; P. Paumard; B. Salin; A. Cavalier; J. Velours and D. Brethes.** 2008. "Supramolecular Organization of the Yeast F1fo-Atp Synthase." *Biol Cell*, 100(10), pp. 591-601.
- Thomson, M.; P. McKiernan; J. Buckels; D. Mayer and D. Kelly.** 1998. "Generalised Mitochondrial Cytopathy Is an Absolute Contraindication to Orthotopic Liver Transplant in Childhood." *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 26(4), pp. 478-81.
- Touati, G.; O. Rigal; A. Lombes; P. Frachon; M. Giraud and H. Ogier de Baulny.** 1997. "In Vivo Functional Investigations of Lactic Acid in Patients with Respiratory Chain Disorders." *Arch Dis Child*, 76(1), pp. 16-21.
- Traven, A.; J. M. Wong; D. Xu; M. Sopta and C. J. Ingles.** 2001. "Interorganellar Communication. Altered Nuclear Gene Expression Profiles in a Yeast Mitochondrial Dna Mutant." *J Biol Chem*, 276(6), pp. 4020-7.
- Trifunovic, A.; A. Wredenberg; M. Falkenberg; J. N. Spelbrink; A. T. Rovio; C. E. Bruder; Y. M. Bohlooly; S. Gidlöf; A. Oldfors; R. Wibom; J. Törnell; H. T. Jacobs; N. G. Larsson.** 2004. "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." *Nature*, 429(6990), pp. 417-23.
- Trinci, A. P. and A. J. Collinge.** 1974. "Occlusion of the Septal Pores of Damaged Hyphae of *Neurospora Crassa* by Hexagonal Crystals." *Protoplasma*, 80(1), pp. 57-67.
- Tritschler, H. J.; F. Andreatta; C. T. Moraes; E. Bonilla; E. Arnaudo; M. J. Danon; S. Glass; B. M. Zelaya; E. Vamos; N. Telerman-Toppet, et al.** 1992. "Mitochondrial Myopathy of Childhood Associated with Depletion of Mitochondrial DNA." *Neurology*, 42(1), pp. 209-17.
- Trott, A. and K. A. Morano.** 2004. "Sym1 Is the Stress-Induced *Saccharomyces Cerevisiae* Ortholog of the Mammalian Kidney Disease Gene Mpv17 and Is Required for Ethanol Metabolism and Tolerance During Heat Shock." *Eukaryot Cell*, 3(3), pp. 620-31.
- Trotter, E. W.; C. M. Kao; L. Berenfeld; D. Botstein; G. A. Petsko and J. V. Gray.** 2002. "Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* 277, pp. 44817-25.
- Trotter, P. J.; A. L. Adamson; A. C. Ghrist; L. Rowe; L. R. Scott; M. P. Sherman; N. C. Stites; Y. Sun; M. A. Tawiah-Boateng; A. S. Tibbetts, et al.** 2005. "Mitochondrial Transporters Involved in Oleic Acid Utilization and Glutamate Metabolism in Yeast." *Arch Biochem Biophys*, 442(1), pp. 21-32.
- Trumbly, R. J.** 1992. "Glucose Repression in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Mol Microbiol*, 6(1), pp. 15-21.
- Trumpower, B. L.** 2004. "The cytochrome bc1 Complex." in: V. Lennarz, M.D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, pp. 528-34.
- Tzagoloff, A.** 1995. "Ubiquinol-Cytochrome-C Oxidoreductase from *Saccharomyces Cerevisiae*." *Methods Enzymol*, 260, pp. 51-63.
- Tzagoloff, A. and C. L. Dieckmann.** 1990. "Pet Genes of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbiol Rev*, 54(3), pp. 211-25.
- Tzagoloff, A.; A. Barrientos; W. Neupert and J. M. Herrmann.** 2004. "Atp10p Assists Assembly of Atp6p into the F0 Unit of the Yeast Mitochondrial Atpase." *J Biol Chem*, 279(19), pp. 19775-80.

- Tzagoloff, A.; M. A. Wu and M. Crivellone.** 1986. "Assembly of the Mitochondrial Membrane System. Characterization of Cor1, the Structural Gene for the 44-Kilodalton Core Protein of Yeast Coenzyme Qh2-Cytochrome C Reductase." *J Biol Chem*, 261(36), pp. 17163-9.
- Uetz, P. and R. E. Hughes.** 2000. "Systematic and Large-Scale Two-Hybrid Screens." *Curr Opin Microbiol*, 3(3), pp. 303-8.
- Valente, L.; V. Tiranti; R. M. Marsano; E. Malfatti; E. Fernandez-Vizarra; C. Donnini; P. Mereghetti; L. De Gioia; A. Burlina; C. Castellan, et al.** 2007. "Infantile Encephalopathy and Defective Mitochondrial DNA Translation in Patients with Mutations of Mitochondrial Elongation Factors Efg1 and Eftu." *Am J Hum Genet*, 80(1), pp. 44-58.
- Valnot, I.; J. C. von Kleist-Retzow; A. Barrientos; M. Gorbatyuk; J. W. Taanman; B. Mehaye; P. Rustin; A. Tzagoloff; A. Munnich and A. Rotig.** 2000. "A Mutation in the Human Heme A:Farnesyltransferase Gene (Cox10) Causes Cytochrome C Oxidase Deficiency." *Hum Mol Genet*, 9(8), pp. 1245-9.
- Van Goethem, G.; B. Dermaut; A. Lofgren; J. J. Martin and C. Van Broeckhoven.** 2001. "Mutation of Polg Is Associated with Progressive External Ophthalmoplegia Characterized by Mtdna Deletions." *Nat Genet*, 28(3), pp. 211-2.
- Van Loon, A. P.; R. J. De Groot; M. De Haan; A. Dekker and L. A. Grivell.** 1984. "The DNA Sequence of the Nuclear Gene Coding for the 17-Kd Subunit Vi of the Yeast Ubiquinol-Cytochrome C Reductase: A Protein with an Extremely High Content of Acidic Amino Acids." *EMBO J*, 3(5), pp. 1039-43.
- van Roermund, C. W.; E. H. Hetteema; M. van den Berg; H. F. Tabak and R. J. Wanders.** 1999. "Molecular Characterization of Carnitine-Dependent Transport of Acetyl-Coa from Peroxisomes to Mitochondria in Saccharomyces Cerevisiae and Identification of a Plasma Membrane Carnitine Transporter, Agp2p." *EMBO J*, 18(21), pp. 5843-52.
- van Roermund, C. W.; Y. Elgersma; N. Singh; R. J. Wanders and H. F. Tabak.** 1995. "The Membrane of Peroxisomes in Saccharomyces Cerevisiae Is Impermeable to Nad(H) and Acetyl-Coa under in Vivo Conditions." *EMBO J*, 14(14), pp. 3480-6.
- Velot, C.; P. Haviernik and G. J. Lauquin.** 1996. "The Saccharomyces Cerevisiae Rtg2 Gene Is a Regulator of Aconitase Expression under Catabolite Repression Conditions." *Genetics*, 144(3), pp. 893-903.
- Velours, J. and G. Arselin.** 2000. "The Saccharomyces Cerevisiae Atp Synthase." *J Bioenerg Biomembr*, 32(4), pp. 383-90.
- Venter, J. C.; M. D. Adams; E. W. Myers; P. W. Li; R. J. Mural; G. G. Sutton; H. O. Smith; M. Yandell; C. A. Evans; R. A. Holt, et al.** 2001. "The Sequence of the Human Genome." *Science*, 291(5507), pp. 1304-51.
- Viscomi, C.; A. Spinazzola; M. Maggioni; E. Fernandez-Vizarra; V. Massa; C. Pagano; R. Vettor; M. Mora and M. Zeviani.** 2009. "Early-Onset Liver Mtdna Depletion and Late-Onset Proteinuric Nephropathy in Mpv17 Knockout Mice." *Hum Mol Genet*, 18(1), pp. 12-26.
- Vogel, F.; C. Bornhove; W. Neupert and A. S. Reichert.** 2006. "Dynamic Subcompartmentalization of the Mitochondrial Inner Membrane." *J Cell Biol*, 175(2), pp. 237-47.
- Vogel, R. O.; R. J. Janssen; C. Ugalde; M. Grovenstein; R. J. Huijbens; H. J. Visch; L. P. van den Heuvel; P. H. Willems; M. Zeviani; J. A. Smeitink, et al.** 2005. "Human Mitochondrial Complex I Assembly Is Mediated by Ndufaf1." *FEBS J*, 272(20), pp. 5317-26.
- von Kleist-Retzow, J. C.; U. Schauseil-Zipf; D. V. Michalk and W. S. Kunz.** 2003. "Mitochondrial Diseases--an Expanding Spectrum of Disorders and Affected Genes." *Exp Physiol*, 88(1), pp. 155-66.
- Vu, T. H.; K. Tanji; S. A. Holve; E. Bonilla; R. J. Sokol; R. D. Snyder; S. Fiore; G. H. Deutsch; S. Dimauro and D. De Vivo.** 2001. "Navajo Neurohepatopathy: A Mitochondrial DNA Depletion Syndrome?" *Hepatology*, 34(1), pp. 116-20.
- Walker, J. E.** 1994. "The Regulation of Catalysis in Atp Synthase." *Curr Opin Struct Biol*, 4(6), pp. 912-8.
- Walker, J. E. and V. K. Dickson.** 2006. "The Peripheral Stalk of the Mitochondrial Atp Synthase." *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6), pp. 286-96.
- Walker, J. E.; I. M. Fearnley; N. J. Gay; B. W. Gibson; F. D. Northrop; S. J. Powell; M. J. Runswick; M. Saraste and V. L. Tybulewicz.** 1985. "Primary Structure and Subunit Stoichiometry of F1-Atpase from Bovine Mitochondria." *J Mol Biol*, 184(4), pp. 677-701.
- Wallace, D. C.** 1999. "Mitochondrial Diseases in Man and Mouse." *Science*, 283(5407), pp. 1482-8.
- Wallace, D. C.** 2005. "A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine." *Annu Rev Genet*, 39, pp. 359-407.
- Wallace, D. C.; G. Singh; M. T. Lott; J. A. Hodge; T. G. Schurr; A. M. Lezza; L. J. Elsas, 2nd and E. K. Nikoskelainen.** 1988. "Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy." *Science*, 242(4884), pp. 1427-30.

- Wang, Z. G. and S. H. Ackerman.** 1998. "Mutational Studies with Atp12p, a Protein Required for Assembly of the Mitochondrial F1-Atpase in Yeast. Identification of Domains Important for Atp12p Function and Oligomerization." *J Biol Chem*, 273(5), pp. 2993-3002.
- Wang, Z. G. and S. H. Ackerman.** 1996. "Identification of Functional Domains in Atp11p. Protein Required for Assembly of the Mitochondrial F1-Atpase in Yeast." *J Biol Chem*, 271(9), pp. 4887-94.
- Wang, Z. G.; D. Sheluho; D. L. Gatti and S. H. Ackerman.** 2000. "The Alpha-Subunit of the Mitochondrial F(1) Atpase Interacts Directly with the Assembly Factor Atp12p." *EMBO J*, 19(7), pp. 1486-93.
- Warren, G. and W. Wickner.** 1996. "Organelle Inheritance." *Cell*, 84(3), pp. 395-400.
- Warthon, D. C. and A. Tzagoloff A** 1967. "Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria." *Methods Enzymol*, 10, pp. 245-50.
- Weihler, H.** 1993. "Glomerular Sclerosis in Transgenic Mice: The Mpv-17 Gene and Its Human Homologue." *Adv Nephrol Necker Hosp*, 22, pp. 37-42.
- Weihler, H.; T. Noda; D. A. Gray; A. H. Sharpe and R. Jaenisch.** 1990. "Transgenic Mouse Model of Kidney Disease: Insertional Inactivation of Ubiquitously Expressed Gene Leads to Nephrotic Syndrome." *Cell*, 62(3), pp. 425-34.
- Weimann, T.; J. Vaillier; B. Salin and J. Velours.** 2008. "The Intermembrane Space Loop of Subunit B (4) Is a Major Determinant of the Stability of Yeast Oligomeric Atp Synthases." *Biochemistry*, 47(11), pp. 3556-63.
- Weinberg, J. M.; M. A. Venkatachalam; N. F. Roeser and I. Nissim.** 2000. "Mitochondrial Dysfunction During Hypoxia/Reoxygenation and Its Correction by Anaerobic Metabolism of Citric Acid Cycle Intermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), pp. 2826-31.
- Wergin, W. P.** 1973. "Development of Woronin Bodies from Microbodies in *Fusarium Oxysporum* F.Sp. *Lycopersici*." *Protoplasma*, 76(2), pp. 249-60.
- White, S. L.; V. R. Collins; R. Wolfe; M. A. Cleary; S. Shanske; S. DiMauro; H. H. Dahl and D. R. Thorburn.** 1999. "Genetic Counseling and Prenatal Diagnosis for the Mitochondrial DNA Mutations at Nucleotide 8993." *Am J Hum Genet*, 65(2), pp. 474-82.
- Wiedemann, N.; A. E. Frazier and N. Pfanner.** 2004. "The Protein Import Machinery of Mitochondria." *J Biol Chem*, 279(15), pp. 14473-6.
- Winzler, E. A.; D. D. Shoemaker; A. Astromoff; H. Liang; K. Anderson; B. Andre; R. Bangham; R. Benito; J. D. Boeke; H. Bussey, et al.** 1999. "Functional Characterization of the *S. Cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis." *Science*, 285(5429), pp. 901-6.
- Wittig, I. and H. Schagger.** 2008. "Structural Organization of Mitochondrial Atp Synthase." *Biochim Biophys Acta*, 1777(7-8), pp. 592-8.
- Wittig, I.; R. Carrozzio; F. M. Santorelli and H. Schagger.** 2006. "Supercomplexes and Subcomplexes of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation." *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10), pp. 1066-72.
- Wong, L. J.; N. Brunetti-Pierri; Q. Zhang; N. Yazigi; K. E. Bove; B. B. Dahms; M. A. Puchowicz; I. Gonzalez-Gomez; E. S. Schmitt; C. K. Truong, et al.** 2007. "Mutations in the Mpv17 Gene Are Responsible for Rapidly Progressive Liver Failure in Infancy." *Hepatology*, 46(4), pp. 1218-27.
- Workman, C. T.; H. C. Mak; S. McCuine; J. B. Tagne; M. Agarwal; O. Ozier; T. J. Begley; L. D. Samson and T. Ideker.** 2006. "A Systems Approach to Mapping DNA Damage Response Pathways." *Science*, 312(5776), pp. 1054-9.
- Yaffe, M. P.** 1999a. "Dynamic Mitochondria." *Nat Cell Biol*, 1(6), pp. E149-50.
- Yaffe, M. P.** 1999b. "The Machinery of Mitochondrial Inheritance and Behavior." *Science*, 283(5407), pp. 1493-7.
- Yoshikawa, S.; K. Muramoto; K. Shinzawa-Ittoh; H. Aoyama; T. Tsukihara; K. Shimokata; Y. Katayama and H. Shimada.** 2006. "Proton Pumping Mechanism of Bovine Heart Cytochrome C Oxidase." *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10), pp. 1110-6.
- Yuan, P.; G. Jedd; D. Kumaran; S. Swaminathan; H. Shio; D. Hewitt; N. H. Chua and K. Swaminathan.** 2003. "A Hex-1 Crystal Lattice Required for Woronin Body Function in *Neurospora Crassa*." *Nat Struct Biol*, 10(4), pp. 264-70.
- Yurina, N. P. and M. S. Odintsova.** 2008. "Mitochondrial Signaling: Retrograde Regulation in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Russian Journal of Genetics*, 2008, Vol. 44, No. 11, pp. 1251-7
- Zara V, Conte L, Trumpower BL.** 2007. "Identification and Characterization of Cytochrome Bc(1) Subcomplexes in Mitochondria from Yeast with Single and Double Deletions of Genes Encoding Cytochrome Bc(1) Subunits." *FEBS J*, 274(17), pp. 4526-39.
- Zara, V.; L. Conte and B. L. Trumpower.** 2009. "Biogenesis of the Yeast Cytochrome Bc1 Complex." *Biochim Biophys Acta*, 1793(1), pp. 89-96.

- Zeng, X.; W. Neupert and A. Tzagoloff.** 2007a. "The Metalloprotease Encoded by Atp23 Has a Dual Function in Processing and Assembly of Subunit 6 of Mitochondrial Atpase." *Mol Biol Cell*, 18(2), pp. 617-26.
- Zeng, X.; A. Hourset and A. Tzagoloff.** 2007b. "The *Saccharomyces Cerevisiae* Atp22 Gene Codes for the Mitochondrial Atpase Subunit 6-Specific Translation Factor." *Genetics*, 175(1), pp. 55-63.
- Zeng, X.; M. H. Barros; T. Shulman and A. Tzagoloff.** 2008. "Atp25, a New Nuclear Gene of *Saccharomyces Cerevisiae* Required for Expression and Assembly of the Atp9p Subunit of Mitochondrial Atpase." *Mol Biol Cell*, 19(4), pp. 1366-77.
- Zeviani, M. and S. Di Donato.** 2004. "Mitochondrial Disorders." *Brain*, 127(Pt 10), pp. 2153-72.
- Zeviani, M. and V. Carelli.** 2003. "Mitochondrial Disorders." *Curr Opin Neurol*, 16(5), pp. 585-94.
- Zeviani, M. and V. Carelli.** 2005. "Dominance in Mitochondrial Disorders." *J Inherit Metab Dis*, 28(3), pp. 287-99.
- Zeviani, M. and V. Carelli.** 2007. "Mitochondrial Disorders." *Curr Opin Neurol*, 20(5), pp. 564-71.
- Zeviani, M.; A. Spinazzola and V. Carelli.** 2003. "Nuclear Genes in Mitochondrial Disorders." *Curr Opin Genet Dev*, 13(3), pp. 262-70.
- Zeviani, M.; E. Bonilla; D. C. DeVivo; S. DiMauro.** 1989. "Mitochondrial diseases." *Neurol Clin*, 7(1), pp.123-56.
- Zeviani, M.; P. Amati; G. Comi; G. Fratta; C. Mariotti and V. Tiranti.** 1995. "Searching for Genes Affecting the Structural Integrity of the Mitochondrial Genome." *Biochim Biophys Acta*, 1271(1), pp. 153-8.
- Zeviani, M.; S. Servidei; C. Gellera; E. Bertini; S. DiMauro and S. DiDonato.** 1989. "An Autosomal Dominant Disorder with Multiple Deletions of Mitochondrial DNA Starting at the D-Loop Region." *Nature*, 339(6222), pp. 309-11.
- Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W.** 2002. "Gluing the Respiratory Chain Together. Cardiolipin Is Required for Supercomplex Formation in the Inner Mitochondrial Membrane." *J Biol Chem*, 277(46), pp. 43553-6.
- Zhang, L. and A. Hach.** 1999. "Molecular Mechanism of Heme Signaling in Yeast: The Transcriptional Activator Hap1 Serves as the Key Mediator." *Cell Mol Life Sci*, 56(5-6), pp. 415-26.
- Zhang, M.; E. Mileykovskaya and W. Dowhan.** 2005. "Cardiolipin Is Essential for Organization of Complexes Iii and Iv into a Supercomplex in Intact Yeast Mitochondria." *J Biol Chem*, 280(33), pp. 29403-8.
- Zhao, X.; B. Georgieva; A. Chabes; V. Domkin; J. H. Ippel; J. Schleucher; S. Wijmenga; L. Thelander and R. Rothstein.** 2000. "Mutational and Structural Analyses of the Ribonucleotide Reductase Inhibitor Sml1 Define Its Rnr1 Interaction Domain Whose Inactivation Allows Suppression of Mec1 and Rad53 Lethality." *Mol Cell Biol*, 20(23), pp. 9076-83.
- Zhao, X.; E. G. Muller and R. Rothstein.** 1998. "A Suppressor of Two Essential Checkpoint Genes Identifies a Novel Protein That Negatively Affects Dntp Pools." *Mol Cell*, 2(3), pp. 329-40.
- Zheng, X. X.; J. M. Shoffner; A. S. Voljavec and D. C. Wallace.** 1990. "Evaluation of Procedures for Assaying Oxidative Phosphorylation Enzyme Activities in Mitochondrial Myopathy Muscle Biopsies." *Biochim Biophys Acta*, 1019(1), pp. 1-10.
- Zhu, H.; M. Bilgin; R. Bangham; D. Hall; A. Casamayor; P. Bertone; N. Lan; R. Jansen; S. Bidlingmaier; T. Houfek, et al.** 2001. "Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips." *Science*, 293(5537), pp. 2101-5.
- Zick, M.; R. Rabl and A. S. Reichert.** 2009. "Cristae Formation-Linking Ultrastructure and Function of Mitochondria." *Biochim Biophys Acta*, 1793(1), pp. 5-19.
- Zsurka, G.; J. Gregan and R. J. Schweyen.** 2001. "The Human Mitochondrial Mrs2 Protein Functionally Substitutes for Its Yeast Homologue, a Candidate Magnesium Transporter." *Genomics*, 72(2), pp. 158-68.
- Zwacka, R. M.; A. Reuter; E. Pfaff; J. Moll; K. Gorgas; M. Karasawa and H. Weiher.** 1994. "The Glomerulosclerosis Gene Mpv17 Encodes a Peroxisomal Protein Producing Reactive Oxygen Species." *EMBO J*, 13(21), pp. 5129-34.

8. APPENDICE

Sono di seguito descritti i *pathway* metabolici, regolativi e strutturali di *Saccharomyces cerevisiae* che sono stati oggetto di analisi nella sezione dei risultati.

A.1 REPRESSIONE DA GLUCOSIO

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è in grado di produrre energia sia per fermentazione che per respirazione. E' quindi in grado di crescere in presenza di numerose fonti di carbonio, di cui il glucosio è la preferita.

Il metabolismo e il profilo di espressione genica del lievito è altamente regolato in risposta al tipo di fonte di carbonio disponibile, determinando significativi cambiamenti fisiologia della cellula. In presenza di glucosio nel terreno, il lievito effettua quasi esclusivamente la fermentazione dello zucchero e la respirazione è quasi assente. In particolare viene indotta la sintesi di geni codificanti per enzimi glicolitici, trasportatori del glucosio, e proteine ribosomali. Allo stesso tempo c'è un meccanismo di "risparmio energetico" e tutti gli enzimi necessari all'utilizzo di altre fonti di carbonio vengono sintetizzati solo in piccole quantità o la loro sintesi è addirittura bloccata: sono enzimi della gluconeogenesi, del ciclo degli acidi tricarbossilici, della respirazione e di altre funzioni (Figura A.1). Questo fenomeno è noto come repressione da glucosio (Trumbly *et al.*, 1992).

Fonti di carbonio non fermentabili (definite anche respirabili o ossidabili), come ad esempio l'etanolo, sono metabolizzate nel ciclo di Krebs, con l'ATP ottenuta dalla respirazione, e gli esosi fosfati (necessari alle cellule per la biosintesi) prodotti dalla gluconeogenesi.

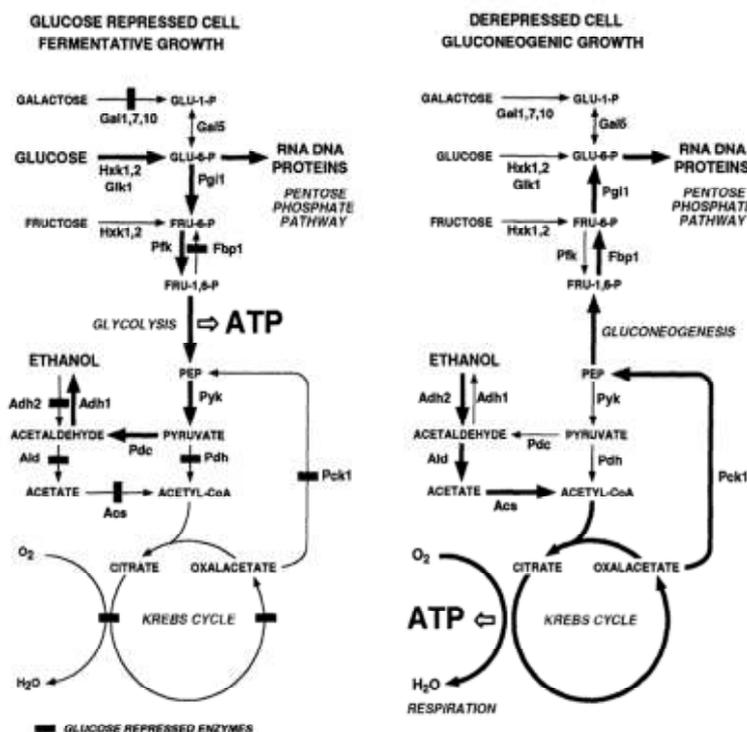


Figura A.1 Schema semplificato del metabolismo dei carboidrati nel caso della crescita fermentativa e respiratoria (il ciclo del glicolizzato non è rappresentato).

A.2 GLUCONEOGENESI E ACCUMULO DI GLICOGENO

La gluconeogenesi è il processo di sintesi di carboidrati, in particolare il glucosio, a partire da precursori a tre e a quattro atomi di carbonio, cioè da composti del carbonio di natura generalmente non saccaridica. Tali precursori sono ad esempio il lattato e il piruvato, gli intermedi del ciclo dell'acido citrico, e gli scheletri carboniosi della maggior parte degli amminoacidi.

La gluconeogenesi somiglia a una glicolisi che procede in senso inverso, ma nei siti cruciali vengono utilizzate reazioni enzimatiche diverse. Infatti la gluconeogenesi sfrutta sette enzimi glicolitici e quattro specifici della via gluconeogenetica. La regolazione ha luogo a livello di questi ultimi.

A differenza della glicolisi, che avviene solo nel citoplasma, la gluconeogenesi, pur avendo luogo principalmente nel citosol, necessita di precursori prodotti nei mitocondri e poi trasportati nel citosol. Le prime reazioni della via metabolica avvengono quindi nei mitocondri. Questa deviazione è necessaria per superare il blocco rappresentato dalla piruvato chinasi il cui equilibrio è quantitativamente spostato verso il piruvato. Quindi il piruvato viene carbossilato ad ossalacetato dalla piruvato carbossilasi che può essere ridotto nei mitocondri a malato oppure transaminato ad aspartato. Entrambi i metaboliti possono abbandonare i mitocondri attraverso sistemi di trasporto della membrana mitocondriale interna. Nel citoplasma si riforma l'ossalacetato che è trasformato in fosfoenolpiruvato (PEP) dalla fosfoenolpiruvato carbossichinasi. Le altre reazioni della via sono identiche a quelle della glicolisi (figura A.1).

Ne deriva che il ciclo di Krebs fornisce importanti precursori per la gluconeogenesi.

Il destino principale del glucosio è quello di essere utilizzato per la sintesi di glicogeno. Le cellule, infatti, necessitano di accumulare glicogeno, che in condizioni di richiesta energetica può essere demolito liberando unità di glucosio che entrano nella via glicolitica dalla quale si produce ATP. *S.cerevisiae* possiede due forme di accumulo dei substrati energetici: il trealosio, un disaccaride, utilizzato in particolare durante la sporificazione e il glicogeno, un omopolimero ramificato del glucosio. I residui di glucosio sono legati tra loro con legami ($\alpha 1 \rightarrow 4$) glicosidici. Ogni 12 residui vi è una ramificazione che porta mediamente un legame glicosidico ($\alpha 1 \rightarrow 6$). Queste ramificazioni poi proseguono con unità glucosidiche unite da legami ($\alpha 1 \rightarrow 4$). Si formano così strutture complesse contenenti fino a 50.000 residui di glucosio ($M > 10^7$ Da). Il glicogeno è una riserva energetica della cellula importante nell'adattamento alla crescita respiratoria, nella carenza di nutrimento e nello stress (Lillie and Pringle, 1980; François and Parrou, 2001). Come visto, in *S. cerevisiae*, la gluconeogenesi è repressa da glucosio. Ma quando il lievito viene cresciuto in un terreno con una concentrazione limitante di glucosio, induce rapidamente l'accumulo di glicogeno alla fine della fase esponenziale respiro-fermentativa, quando il glucosio e gli altri nutrienti sono

ancora presenti nel mezzo (Parrou *et al.*, 1999). L'accumulo del glicogeno è inoltre promossa da stress fisico-chimici (Parrou *et al.*, 1997).

E' possibile valutare semiquantitativamente il contenuto di glicogeno nelle cellule di lievito attraverso la semplice tecnica di colorazione allo iodio (Chester, 1968).

Nell'uomo, scorte di glucosio, sotto forma di glicogeno, prontamente utilizzabile dai tessuti per ricavarne energia si trovano principalmente nel fegato e nei muscoli scheletrici. Ma, mentre le riserve di glucosio contenute nei muscoli sono utilizzate solo localmente, quelle contenute nel fegato vengono utilizzate per rifornire i vari tessuti. Infatti, nell'uomo il 10% in peso del fegato è costituito da glicogeno. Il fegato provvede a depositare glucosio (glicogenosintesi) o a mobilitare glucosio (glicogenolisi) a seconda delle richieste metaboliche. In questo modo è possibile mantenere la glicemia a valori costanti. Quindi, una delle funzioni principali del fegato, è proprio il mantenimento di livelli costanti di glucosio nel sangue, cosa che viene meno nei pazienti affetti da MDDS epatocerebrale. Il fegato utilizza come fonte energetica principale gli acidi grassi e si impegna ad utilizzare gli zuccheri solo dopo aver rifornito tutti gli altri tessuti (organo generoso per eccellenza). I maggiori consumatori di glucosio sono il cervello, che lavora quasi esclusivamente con questo zucchero, e il muscolo scheletrico tramite la via aerobica. Il rimanente glucosio è consumato dagli eritrociti (globuli rossi) e dal muscolo cardiaco.

Il corpo ottiene glucosio, grazie alla dieta, grazie agli amminoacidi nella via gluconeogenetica e grazie alla riconversione in glucosio del lattato (ciclo di Cori).

Va ricordato che nell'uomo, a differenza del lievito, gli acidi grassi non possono essere convertiti in glucosio, infatti manca il ciclo del gliossilato.

A.3 CONVERSIONE DI AMINOACIDI IN INTERMEDI DEL CICLO DI KREBS

Nel lievito sono presenti molti enzimi che convertono gli aminoacidi glutammato, glutammina, aspartato e asparagina in intermedi del ciclo del citrato. Il glutammato può essere convertito direttamente in α -chetoglutarato ad opera dell'enzima glutammato deidrogenasi NAD⁺ dipendente (figura A.2a), che, nel lievito *S. cerevisiae* è codificato dal gene *GDH2* (Miller *et al.*, 1990). Inoltre, il glutammato può essere anche degradato in γ -amminobutirrato (GABA) dalla glutammato decarbossilasi Gad1 e successivamente convertito in succinato dagli enzimi γ -amminobutirrato transaminasi e succinato semialdeide deidrogenasi codificati rispettivamente dai geni *UGA1* e *UGA2* (figura A.2b) (Coleman *et al.*, 2001). Il succinato prodotto può entrare nel ciclo di Krebs. E' interessante notare che questo *pathway* di degradazione è importante per la tolleranza allo stress ossidativo (Coleman *et al.*, 2001).

La glutammina, attraverso una reazione di transaminazione ad opera dell'enzima glutammato sintasi (codificata dal gene *GLT1*) che trasferisce il gruppo amidico della glutammina all' α -chetoglutarato, viene convertita in glutammato (figura A.2c), che, come appena visto, può successivamente essere convertito o in α -chetoglutarato (*pathway* principale) o in succinato.

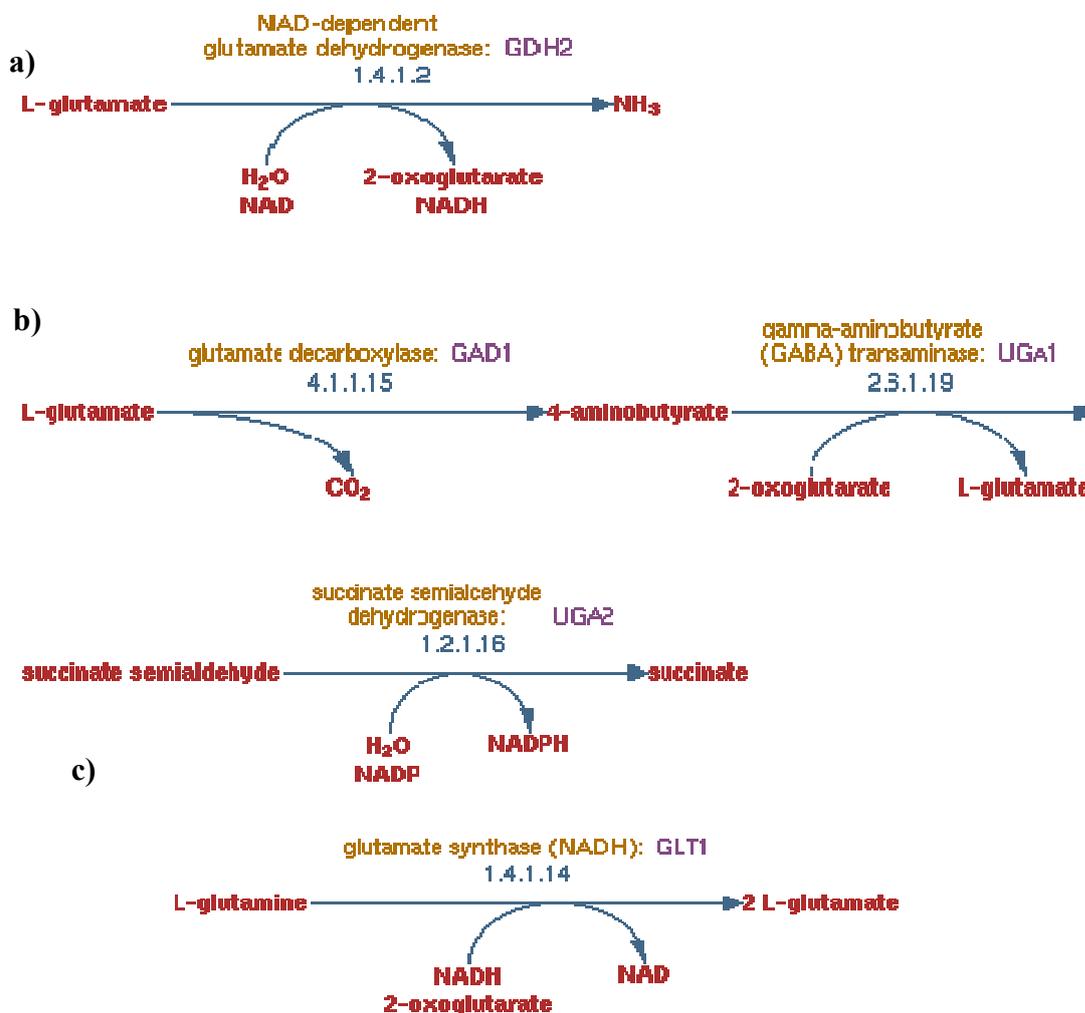


Figura A.2 a) Il glutammato viene sintetizzato a partire da ione ammonio NH₄⁺ e α -chetoglutarato, un intermedio del ciclo dell'acido citrico, ad opera della NAD⁺ glutammato deidrogenasi. b) Degradazione del glutammato a succinato per opera degli enzimi glutammato decarbossilasi, γ -amminobutirrato transaminasi e succinato semialdeide deidrogenasi. c) Biosintesi del glutammato a partire dalla glutammina; reazione catalizzata dalla glutammato sintasi.

L'aspartato, come conseguenza della reazione di transaminazione ad opera della aspartato transaminasi, è convertito direttamente in ossalacetato; mentre l'asparagina è convertita in ossalacetato dall'azione combinata dell'asparaginasi e della aspartato transaminasi (figura A.3). L'ossalacetato prodotto può entrare nel ciclo dell'acido citrico.

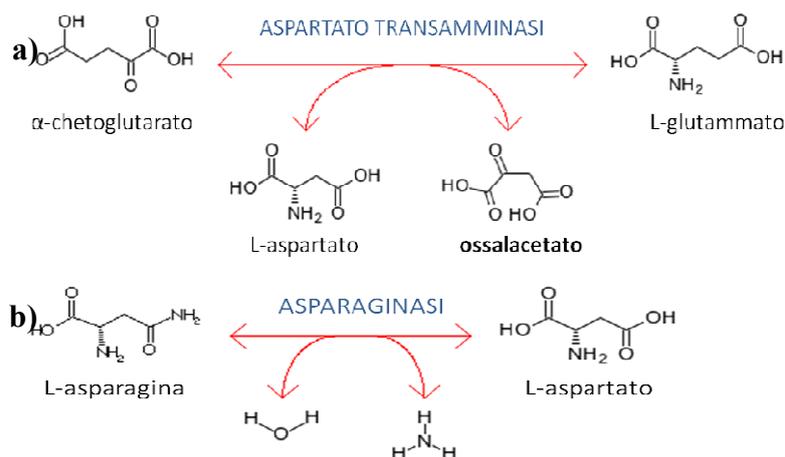


Figura A.3 L'aspartato e l'asparagina sono trasformati in ossalacetato, un intermedio del ciclo dell'acido citrico. L'aspartato è transaminato direttamente a ossalacetato (a) mentre l'asparagina è idrolizzata dalla asparaginasi a NH_4^+ ed aspartato (b), che viene a sua volta transaminato.

Nel lievito *S. cerevisiae* sono inoltre note due isoforme dell'enzima aspartato aminotransferasi o transaminasi: l'isoforma mitocondriale, codificata dal gene *AAT1* (Morin *et al.*, 1992) e l'isoforma citosolica, codificata dal gene *AAT2* (Cronin *et al.*, 1991). Questo enzima converte l'aspartato in glutammato, e viceversa (figura A.3a).

Il glutammato ed l' α -chetoglutarato fanno parte di un intricato *network* omeostatico e una modificazione delle loro concentrazioni cellulari scatena all'interno della cellula risposte fisiologiche complesse, che influenzano inevitabilmente più vie metaboliche. Per esempio, il glutammato è coinvolto direttamente o indirettamente in numerosi *pathway* metabolici (tra cui il metabolismo dell'azoto, degli amminoacidi e dei nucleotidi), è in grado di inibire l'espressione dei geni che codificano gli enzimi necessari nei primi step del ciclo dell'acido citrico come pure il gene *CIT2*, codificante per la citrato sintasi perossisomale, attraverso la regolazione negativa della *retrograde regulation* (RTG) (Haselbeck *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1986; Rosenkrantz *et al.*, 1994a; Velot *et al.*, 1996), e di regolare l'attività della NADP glutammato deidrogenasi (De Luna *et al.*, 2001).

A.4 GLUTAMMATO DEIDROGENASI

La glutammato deidrogenasi (GDH) catalizza la reazione reversibile α -chetoglutarato \leftrightarrow glutammato. In particolare la reazione anabolica (α -chetoglutarato \rightarrow glutammato) è catalizzata dalla GDH-NADP⁺ dipendente (NADP-GDH) della quale nel lievito *S. cerevisiae* ne esistono due isoforme codificate dai geni *GDH1* e *GDH3*. Quando il lievito viene cresciuto in terreno contenete glucosio, il principale *pathway* di biosintesi del glutammato dipende da Ghd1; mentre Gdh3 gioca un ruolo importante durante il metabolismo respiratorio. In accordo con ciò *GDH3* è represso da glucosio ed è indotto da etanolo; mentre *GDH1* è espresso sia in condizioni di fermentazione che di respirazione. La reazione

Sono stati identificati geni nucleari la cui trascrizione risponde a difetti del mtDNA (Parikh *et al.*, 1987). Il *target* prototipico del *pathway* della *retrograde regulation* è il gene *CIT2*, che codifica per l'isoforma perossisomale della citrato sintasi. In cellule con una compromessa funzionalità mitocondriale, per esempio nelle cellule prive di mtDNA (cellule ρ^0), l'espressione di *CIT2* è aumentata di 30 volte (Liao *et al.*, 1991).

I regolatori positivi che sono stati identificati studiando il promotore di *CIT2* sono: Rtg1 e Rtg3 (Liao and Butow, 1993; Jia *et al.*, 1997). *RTG1* e *RTG3* codificano per fattori di trascrizione del tipo cerniera di leucina basica elica-loop-elica (bHLH/Zip). Le due proteine formano un eterodimero che si lega alla regione promotrice del gene *target* (figura A.5).

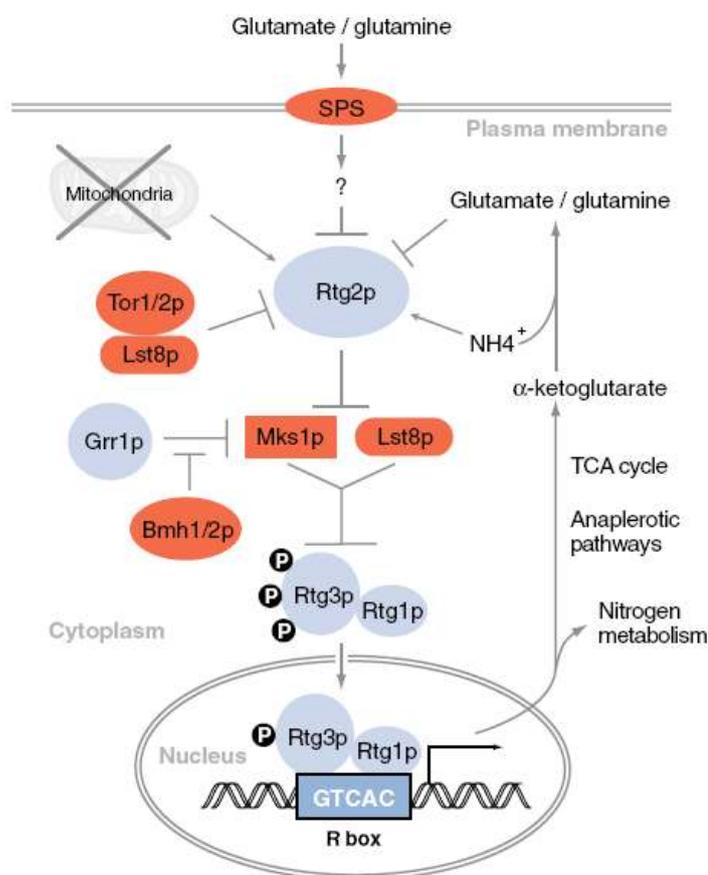


Figura A.5 Modello per la regolazione del *pathway* RTG. I regolatori positivi e negativi sono mostrati in blu e rosso rispettivamente. (Da Liu and Butow, 2006)

Il dominio di attivazione trascrizionale del complesso Rtg1/Rtg3 è all'interno di Rtg3 (Rothermel *et al.*, 1997; Sekito *et al.*, 2000). A differenza della maggior parte degli attivatori trascrizionali di tipo bHLH, che si legano alla sequenza consenso CANNTG, chiamata E box (Massari and Murre, 2000), Rtg1/Rtg3 si lega ad un sito insolito, GTCAC, chiamato R box (Liao and Butow, 1993; Jia *et al.*, 1997). Solo l'eterodimero, e non le proteine Rtg1 e Rtg3 singolarmente, è in grado di legarsi alla R box. Rtg3, al contrario di Rtg1, è una fosfoproteina (Sekito *et al.*, 2000). La proteina deputata alla defosforilazione di Rtg3 è Rtg2 che inoltre

serve per la traslocazione del complesso Rtg1/Rtg3 nel nucleo (Liu *et al.*, 2003). Al contrario, un regolatore negativo del *pathway* RTG è Mks1, noto anche come Lys80, che promuove la fosforilazione di Rtg3 e inibisce la traslocazione del complesso Rtg1/Rtg3 nel nucleo (Dilova *et al.*, 2004; Sekito *et al.*, 2002). In figura A.5 sono mostrati i principali fattori di regolazione sia positivi (Rtg1, Rtg2, Rtg3 e Grr1) che negativi (Mks1, Lst8, Bmh1 e Bmh2) che sono stati identificati fino ad oggi.

Ci sono due gruppi di geni *target* della *retrograde regulation* (Chelstowska *et al.*, 1999; Liao and Butow, 1993; Liao *et al.*, 1991; Liu and Butow, 1999). Il primo gruppo include *CIT2* (che codifica per la citrato sintasi perossisomale) e *DLD3* (che codifica per l'isoforma citoplasmatica della D-lattico deidrogenasi), che mostrano una risposta robusta alla *retrograde regulation*; e il secondo gruppo, che include diversi geni del ciclo di Krebs, che non mostrano un'ovvia risposta retrograda. Questo secondo gruppo include i geni che codificano per i primi tre enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), cioè Cit1 (citrato sintasi mitocondriale), Aco1 (aconitasi), e Idh1/2 (isocitrato deidrogenasi NAD⁺ dipendente). L'espressione di questi quattro geni passa dal controllo Hap2-5 sotto il controllo Rtg1/Rtg3 in cellule con funzionalità mitocondriale compromessa. Questo cambiamento riflette due importanti funzioni del ciclo di Krebs: fornire ATP attraverso il metabolismo catabolico ossidativo e rifornire la cellula di metaboliti per la biosintesi anabolica. Nelle cellule cresciute in presenza di fonti di carbonio respirabili, l'espressione dei geni del TCA e di molti geni coinvolti nel metabolismo ossidativo, è sotto il controllo globale del fattore di trascrizione eme-dipendente Hap1 e del complesso eme-indipendente Hap2-5 (Forsburg and Guarente, 1989b; Olesen and Guarente, 1990; Rosenkrantz *et al.*, 1994b; Zhang and Hach, 1999). Quando la respirazione è compromessa, per esempio in cellule senza mtDNA, il ciclo di Krebs è bloccato a livello della succinato deidrogenasi (SDH), ma parte del ciclo del citrato a monte dell' SDH deve comunque funzionare in quanto serve per fornire gli intermedi per la biosintesi (figura A.6). La doppia regolazione dei primi enzimi del TCA da parte di Hap2-5 e Rtg1/Rtg3 permette quindi alle cellule di adattarsi ai cambiamenti della fonte di carbonio e allo stato funzionale del mitocondrio e assicura la continuità di importanti processi anabolici come la biosintesi di glutammato e lisina (Rosenkrantz *et al.*, 1994b; Olesen and Guarente, 1990; Zhang and Hach 1999).

Tra i quattro enzimi della prima fase del ciclo di Krebs, la regolazione di *CIT1* è la meglio studiata. Analisi del promotore di *CIT1* hanno identificato due elementi in *cis* che controllano l'espressione in condizioni di repressione da glucosio e derepressione da glucosio rispettivamente (Rosenkrantz *et al.*, 1994a; Rosenkrantz *et al.*, 1994b). Il legame di Hap2-5 regola l'espressione di *CIT1* in condizioni non repressivi, mentre Rtg1/Rtg3 agiscono in condizioni di repressione da glucosio (Liu and Butow, 1999). Quindi, quando la funzione respiratoria decresce, l'espressione di *CIT1* diventa sempre più dipendente da Rtg1/Rtg3 e sempre meno da Hap2-5. Questo duplice controllo HAP-RTG si può estendere anche ai geni *ACO1*, *IDH1* e *IDH2* (Gangloff *et al.*, 1990; Haviernik and Laquin, 1996; Velot *et al.*, 1996;

stato dimostrato che il glutammato inibisce l'espressione di questi quattro geni, nonché l'espressione di *CIT2* (Haselbeck and McAlister-Henn, 1993; Kim *et al.*, 1986; Rosenkrantz *et al.*, 1994a, Velot *et al.*, 1996); e ciò può essere considerato come un controllo *feedback* della biosintesi del glutammato. In cellule respiratorio deficienti è necessario assicurare la produzione di glutammato perché il glutammato, insieme al suo derivato glutammina, forniscono l'azoto necessario per le reazioni di biosintesi (Magasanik and Kaiser, 2002). In accordo con ciò, una limitata produzione di glutammato/glutammina determinata da una mutazione nel gene *GDH1*, che codifica la principale isoforma della glutammato deidrogenasi anabolica, determina un decremento del 39% degli aminoacidi cellulari totali (Chen and Kaiser, 2002). Inoltre si ha attivazione della *retrograde regulation* non solo nelle cellule respiratorio deficienti, ma anche in cellule respiratorio competenti sottoposte a *starvation* da glutammato (Liu and Butow, 1999). Quindi, una delle funzioni principali del pathway RTG è quello di assicurare un sufficiente livello di α -chetoglutarato per la biosintesi del glutammato che serve come fonte di azoto per le reazioni biosintetiche.

L'analisi trascrizionale *genome-wide* di cellule respiratorio-competenti verso cellule respiratorio-deficienti prive di mtDNA ha fornito importanti informazioni sullo scopo della risposta retrograda (Epstein *et al.*, 2001; Traven *et al.*, 2001). Dato che nelle cellule ρ^0 il ciclo di Krebs è bloccato a livello della succinato deidrogenasi, l'ossalacetato non può più essere rigenerato. I risultati di questi esperimenti di trascrizione suggeriscono che il metabolismo delle cellule prive di mtDNA venga riconfigurato per aumentare il rifornimento di ossalacetato e di acetil-CoA.

Infatti queste analisi hanno evidenziato che una caratteristica rilevante delle cellule con disfunzioni mitocondriali è l'elevata espressione di geni coinvolti in *pathway* (analplerotici) che servono per rifornire il mitocondrio di acetil-CoA, ossalacetato e citrato (Epstein *et al.*, 2001) (Figura A.6). L'elevata espressione di *PYCI*, codificante la piruvato carbossilasi citosolica, porta ad un aumento della produzione di ossalacetato dal piruvato. Inoltre c'è una rilevante proliferazione di perossisomi con una concomitante elevata espressione di geni coinvolti nella β -ossidazione degli acidi grassi (attività che nel lievito avviene nei perossisomi) e ciò di conseguenza porta ad un aumento della produzione di acetil-CoA. Cruciale per il rifornimento di acetil-CoA, ossalacetato, e metaboliti derivati dall'ossalacetato, è il loro trasporto verso il mitocondrio e ciò richiede *carriers* di acidi carbossilici e trasportatori di acil-carnitina. E' quindi ovvio che nelle cellule ρ^0 ci sia una up-regolazione dell'espressione di tali trasportatori quali Dic1 (trasportatore di acidi carbossilici) e Crcl (trasportatore di acil-carnitina localizzato nella membrana mitocondriale). Anche l'aumento dell'espressione di *CIT2* può fornire citrato addizionale direttamente dal ciclo del gliossilato tramite condensazione di acetilCoA e ossalacetato (Epstein *et al.*, 2001). Ci si aspetta che anche il trasportatore di citrato, codificato da *CTPI*, la cui espressione è up-repolata in un ceppo $\Delta msk1$ (Dilova *et al.*, 2002), sia up-regolato in cellule ρ^0 in modo da trasportare il

citrato dai perossisomi ai mitocondri. Inoltre, come anticipato, ci sono evidenze che supportano un aumento del trasporto verso il mitocondrio anche dell'acetil-CoA. Esistono due *pathway* per trasportare acetil-CoA nel mitocondrio (Elgersma *et al.*, 1995; Swiegers *et al.*, 2001; van Roermund *et al.*, 1995; van Roermund *et al.*, 1999). Il primo richiede Cit2, che funziona insieme ad altri enzimi nel ciclo del gliossilato per convertire l'acetil-CoA in intermedi del ciclo come succinato e citrato; questi intermedi poi possono essere trasportati nei mitocondri da proteine *carrier*. Il secondo converte acetil-CoA e carnitina in acetil-carnitina attraverso tre carnitina acetil-CoA transferasi: Cat2, Yat1 e Yat2; l'acetil-carnitina viene quindi trasportata nei mitocondri in cambio di carnitina dal *carrier* carnitina-acilcarnitina Crc1. Una volta nei mitocondri Cat2, che è localizzato negli organelli stessi, catalizza la reazione inversa per rilasciare gruppi acetile e carnitina.

Infine, dato che i mutanti *petite* mancano di una catena respiratoria funzionante, necessitano di un meccanismo alternativo per riossidare il NADH. Il principale *pathway* in cellule ρ^0 è costituito dalle attività della α -glicerolo-3-fosfato deidrogenasi e della alcool deidrogenasi. I geni che codificano tali proteine, *GPD2* e *ADH*, sono entrambi up-regolati nei mutanti.

Tramite l'analisi trascrizionale *genome-wide* si è inoltre scoperto che c'è una risposta genica differente a diverse perturbazioni della funzionalità mitocondriale (Epstein *et al.*, 2001). È stata esaminata la risposta in seguito a trattamento di cellule ρ^+ con tre diversi inibitori della funzione mitocondriale come antimicina (inibitore del trasporto degli elettroni mediante blocco della riossidazione del citocromo b ridotto), CCCP (carbonil cianide m-clorofenilidrazone, disaccoppiante della sintesi di ATP mediante dissipazione del gradiente protonico), e oligomicina (uno specifico inibitore della componente F_0 del complesso F_1-F_0 ATP sintasi) e comparata alla risposta delle cellule ρ^0 e si è visto che è alquanto diversa (figura A.7). Solo il trattamento con antimicina induce un buon numero di geni comuni a quelli indotti dall'assenza di mtDNA, molti dei quali sono coinvolti in attività perossisomali (Epstein *et al.*, 2001). Questo risultato suggerisce che ci siano diverse regolazioni retrograde e che vengano attivate in risposta a specifici difetti mitocondriali.

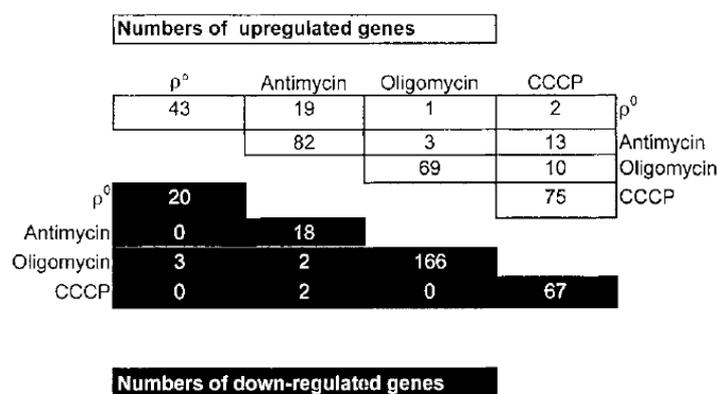


Figura A.7 Numero di geni indotti o repressi dalle diverse perturbazioni della funzionalità mitocondriale. (Da Epstein *et al.*, 2001)

Infine l'analisi trascrizionale *genome wide* dove si confronta l'espressione genica di cellule ρ^0 wild type e $\rho^0 \Delta rtg1, \Delta rtg2$ o $\Delta rtg3$ ha dimostrato che la risposta trascrizionale a disfunzioni mitocondriali può dipendere anche da un ulteriore *pathway* di segnalazione retrograda non ancora identificato, in aggiunta alla segnalazione dipendente dai geni *RTG* (Epstein *et al.*, 2001; Traven *et al.*, 2001).

A.6 I COMPLESSI OXPHOS

A.6.1 COMPLESSO I

A differenza di molti organismi eucarioti, *S. cerevisiae* non possiede un multicomplexo I tradizionale rotenone-sensibile (reviewed in Grandier-Vazeille *et al.*, 2001). Invece, esso contiene una NADH-ubichinone ossidoreduttasi rotenone-insensibile composta da una subunità codificata dal nucleo, Ndi1, localizzata nella membrana mitocondriale interna nel lato della matrice. Inoltre, il NADH citosolico può essere ossidato attraverso una NADH-ubichinone ossidoreduttasi che si affaccia allo spazio intermembrana, che è composta da due subunità codificate dai geni nucleari *NDE1* e *NDE2*.

A.6.2 COMPLESSO II

L'SDH è l'unico enzima del ciclo di Krebs ad essere legato alla membrana mitocondriale interna, ossida il succinato a fumarato e trasferisce gli elettroni alla catena respiratoria attraverso l'ubichinone. Inoltre è l'unico dei 5 complessi della fosforilazione ossidativa in cui tutte le subunità sono codificate dal nucleo.

In gel elettroforesi *blue native* l'SDH migra con un complesso principale di circa 150 kDa (Schägger and von Jagow, 1991). Separando il complesso in seconda dimensione tramite elettroforesi denaturante si osserva che il complesso di 150 kDa contiene quattro subunità (Schägger and von Jagow, 1991).

L'SDH di lievito è un eterotetramero (figura A.8). I geni *SDHI-4* codificano per le quattro subunità. Ogni subunità è sintetizzata come precursore con una sequenza *target* all'N-terminale che viene rimossa proteoliticamente dopo il trasporto nell'organello.

Le subunità Sdh1 e Sdh2 formano il dimero catalitico che contiene il sito attivo, tre cluster ferro-zolfo e lega il FAD. Il dimero catalitico è ancorato alla superficie della membrane attraverso un eterodimero composto da due subunità idrofobiche: Sdh3 e Sdh4 di ~16,6 kDa ciascuna (Schägger and von Jagow, 1991; Bullis and Lemire, 1994) che sono proteine integrali di membrana che contengono eme e il sito per la riduzione dell'ubichinone (Oyedotun and Lemire, 1999a; Oyedotun and Lemire, 1997; Oyedotun and Lemire, 1999b).

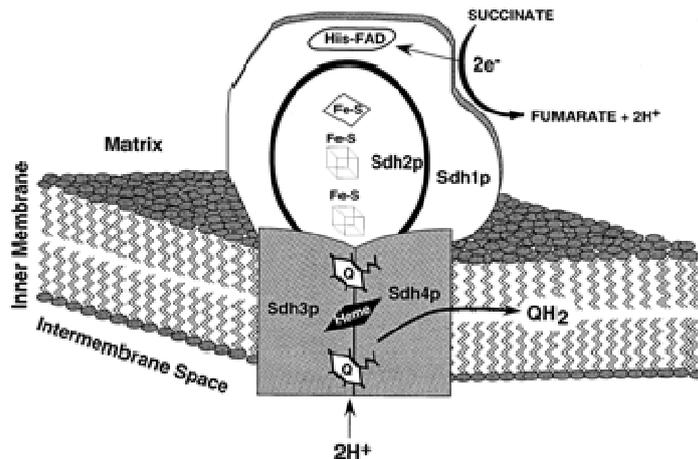


Figura A.8 Modello dell'SDH di lievito. (Da Lemire and Oyedotun, 2002)

Il dimero catalitico può ossidare il succinato e ridurre un accettore artificiale di elettroni senza le subunità di membrana. Queste ultime, però, sono necessarie per la riduzione dell'ubichinone.

Mutazioni in ognuno dei geni *SDH1-4* porta alla perdita della funzione succinato deidrogenasica e all'incapacità del lievito di crescere tramite respirazione.

SDH1 codifica per la subunità catalitica che lega la flavina (Singer *et al.*, 1957). Il meccanismo di attacco della flavina, che si pensa avvenga dopo che la sequenza target sia stata rimossa, è particolarmente complesso perché è necessaria la coordinazione del trasporto del precursore attraverso entrambe le membrane mitocondriali e il suo processamento. Attualmente si pensa che questa reazione sia autocatalitica. La mutagenesi dell'istidina in posizione 90 (His-90), che è il residuo al quale il FAD è legato, non compromette l'assemblaggio del complesso II, tuttavia la presenza del FAD è richiesta per l'attività succinato ossidasica (Robinson *et al.*, 1994). La proteina precursore Sdh1 (640aa, ~70kDa) contiene una sequenza target per la maturazione che richiede il taglio da parte di due enzimi proteolitici: *mitochondrial processing peptidase* e *mitochondrial intermediate peptidase*.

E' presente un gene strettamente correlato che si chiama *SDH1b* (Colby *et al.*, 1998) che è in grado di complementare completamente un mutante Δ *sdh1* se over-espresso. Il suo livello di espressione in condizioni fisiologiche è 100-500 volte minore rispetto a *SDH1* e quindi probabilmente non ha un ruolo importante nella respirazione (Colby *et al.*, 1998).

SDH2 codifica per un polipeptide (266aa, ~30kDa) con una sequenza *target* di circa 20 aminoacidi. Nella sequenza di Sdh2 ci sono cluster conservati di residui di cisteina che coordinano i cluster ferro-zolfo. Le caratteristiche specifiche dei cluster ferro-zolfo di lievito non sono state indagate in modo approfondito. I 7 aminoacidi all'estremità C-terminale della subunità Sdh2, che contengono una sequenza Lys-Lys, sono essenziali per l'attività e l'assemblaggio (Schmidt *et al.*, 1992).

L'assenza di una delle due subunità del dimero catalitico (Sdh1 e Sdh2) porta inevitabilmente all'assenza dell'altra, suggerendo che la formazione del dimero sia necessaria per la stabilità delle subunità (Robinson *et al.*, 1991; Lombardo and Scheffler, 1989; Schmidt *et al.*, 1992). Non è invece chiaro se il dominio catalitico possa formarsi stabilmente in assenza di una o entrambe le subunità di ancoraggio.

Il *pathway* di trasferimento degli elettroni nel dimero catalitico sembra ormai abbastanza chiaro: gli elettroni fluiscono dal succinato al FAD, e sequenzialmente attraverso i centri ferro-zolfo [2Fe:2S], [4Fe:4S], [3Fe:2S]; da qui gli elettroni entrano nel dimero di membrana. Analisi di idrofobicità indicano che entrambe le subunità di membrana contengono tre regioni idrofobiche in grado di formare eliche transmembrana (figura A.9). Le estremità N-terminali sembrano essere localizzate nella matrice, in quanto questo compartimento contiene le peptidasi che tagliano le sequenze target (Hartl *et al.*, 1989).

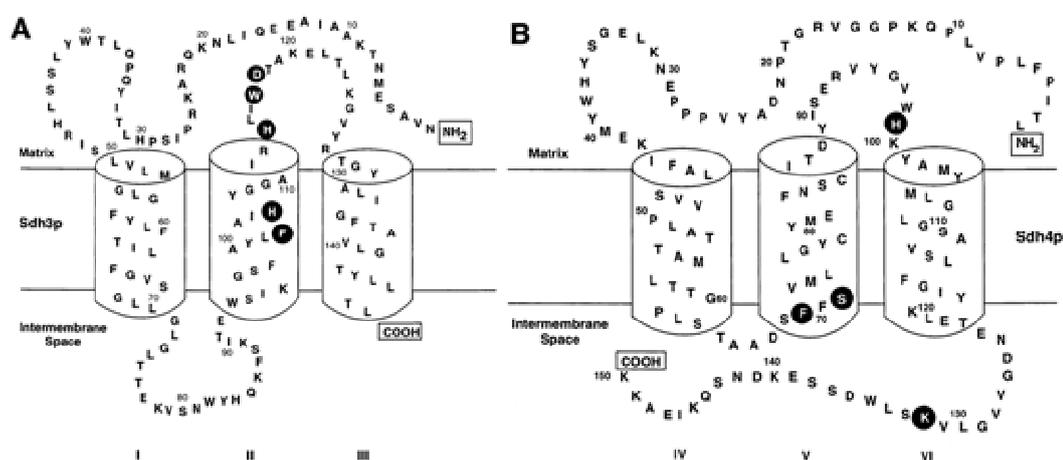


Figura A.9 Modello topologico delle subunità di membrane. A) Sdh3; B) Sdh4. (Da Lemire and Oyedotun, 2002)

Sfortunatamente, al contrario del dimero catalitico che esibisce una notevole conservazione delle sequenze aminoacidiche e della composizione di cofattori durante l'evoluzione, le subunità di membrana variano considerevolmente nella composizione delle subunità, struttura primaria e contenuto di eme (Hägerhäll, 1997; Hägerhäll and Hederstedt, 1996).

Il modello attualmente accettato per il dimero di membrana è un cuore di 4 eliche antiparallele (figura A.10) (Hägerhäll and Hederstedt, 1996; Iverson *et al.*, 1999; Lancaster *et al.*, 1999). Le eliche della subunità Sdh3 sono numerate I-III, quelle dell'Sdh4 IV-VI. Le eliche transmembrana I, II, IV e V formano un fascio di eliche antiparallele, con le eliche III e VI che si dispongono di lato. Sembra che queste due eliche non siano necessarie per la catalisi ma piuttosto giochino un ruolo nel mantenimento dell'integrità strutturale del dimero di membrana, conferendo rigidità o stabilità al fascio centrale di eliche.

L'assemblaggio dei complessi mitocondriali in genere è un processo multi-step. Molte proteine sono sintetizzate come precursori contenenti una sequenza *target* ammino-terminale che viene rimossa durante o dopo l'*import* (Hartl *et al.*, 1989). I polipeptidi sono trasportati attraverso le due membrane mitocondriali in uno stato non ripiegato e spesso richiede l'assistenza di *chaperon* per raggiungere la corretta conformazione strutturale. Per quanto riguarda l'assemblaggio del complesso II, si sa piuttosto poco. Recentemente, in base all'omologia con il gene umano SDHAF1 (*SDH assembly factor 1*) identificato in quanto mutato determina leucoencefalopatia infantile, è stato caratterizzato il primo probabile fattore di assemblaggio in lievito: *YDR379C-a* (Ghezzi *et al.*, 2009). Successivamente è stata identificata un'altra proteina importante per la funzionalità dell'SDH: Sdh5 (Hao *et al.*, 2009). E' stato dimostrato che interagisce fisicamente con Sdh1 e è necessario e sufficiente per la sua flavinazione (incorporazione della flavina adenina dinucleotide - FAD). Nonostante ciò Sdh5 non è un componente stabile del complesso II.

A.6.3 COMPLESSO III

Il complesso bc₁ (complesso III) è un omo-dimero che catalizza il trasferimento di equivalenti riducenti dal ubiquinolo al citocromo c e questo processo porta con sé la traslocazione di protoni dalla matrice mitocondriale alla spazio intermembrana.

Ogni monomero è composto da 10 diverse subunità proteiche inserite o legate alla membrana mitocondriale interna (Tzagoloff, 1995; Berry *et al.*, 2000; Trumpower, 2004; Smith *et al.*, 2004). Tre subunità (citocromo b, citocromo c₁ e la proteina ferro-zolfo di Rieske – ISP) contengono centri redox e partecipano al trasferimento di elettroni e per questo sono denominate subunità catalitiche. Le sette subunità restanti (core 1, core 2, Qcr6, Qcr7, Qcr8, Qcr9 e Qcr10) non hanno cofattori, la loro funzione non è del tutto chiara e sono definite subunità sovranumerarie perché sono assenti negli equivalenti dei complessi respiratori dei batteri.

Il citocromo b (385 aminoacidi) (Nobrega and Tzagoloff, 1980), l'unica subunità codificata dal mtDNA, è il cuore centrale del complesso bc₁ ed è inserito nella membrana mitocondriale interna (Hunte *et al.*, 2000). Esso contiene due centri catalitici redox: eme b_L e eme b_H. Il citocromo c₁ (Sadler *et al.*, 1984) è sintetizzato nel citosol come precursore con una pre-sequenza di 61 aminoacidi all'N-terminale che è tagliata durante l'*import* della proteina nel mitocondrio. Il gruppo prostetico eme c₁ è legato covalentemente alla proteina matura (248 aminoacidi). La proteina ferro-zolfo di Rieske, ISP, è sintetizzata nel citosol come precursore (215 aminoacidi) e, dopo il taglio della sequenza segnale, si ottiene la forma matura (185 aminoacidi). La proteina core 1 è la subunità più grande (431 aminoacidi) (Tzagoloff *et al.*, 1986). Essa, pur essendo legata alla membrana mitocondriale interna, è largamente localizzata nella matrice mitocondriale dove interagisce con la proteina core 2 (352 aminoacidi) (Oudshoorn *et al.*, 1987). Le due proteine core sono sintetizzate come pre-proteine (457 e 368

aminoacidi, per core 1 e 2 rispettivamente). Qcr7, una piccola proteina di 126 aminoacidi (De Haan *et al.*, 1984), è localizzata nell'interfaccia tra la membrana mitocondriale interna e la matrice mitocondriale. Qcr6, una proteina di 122 aminoacidi, localizzata nello spazio intermembrana, è sintetizzata nel citoplasma come precursore con una pre-sequenza di 25 aminoacidi (Van Loon *et al.*, 1984). Qcr8 (93 aminoacidi) (Maarse and Grivell, 1987) attraversa la membrana mitocondriale interna con un' α -elica idrofobica. Anche la proteina Qcr9, la subunità più piccola del complesso (66 aminoacidi) (Brandt *et al.*, 1994), attraversa la membrana mitocondriale interna con un' α -elica. La subunità 10, Qcr10, (76 aminoacidi) (Brandt *et al.*, 1994) è l'unica subunità per la quale la localizzazione è ancora sconosciuta.

Recentemente il complesso di lievito è stato cristallizzato da solo (Hunte *et al.*, 2000) e in associazione con il suo substrato, il citocromo c (Lange and Hunte 2002). Il complesso omo-dimerico è inserito nella membrana mitocondriale interna (Hunte *et al.*, 2000; Lange and Hunte 2002). Il cuore centrale è composto dal citocromo b che attraversa il doppio strato lipidico con 8 α -eliche idrofobiche. Oltre a queste, ci sono altre 4 α -eliche transmembrana nel complesso e derivano dal citocromo c_1 , ISP, Qcr8 e Qcr9. Questo "blocco" che attraversa la membrana è connesso, sul lato della matrice, con Qcr7 e le proteine core 1 e 2. La proteina core 1 protrude in gran parte nella matrice dove interagisce con la proteina core 2. Qcr6 è localizzata perifericamente sul lato citoplasmatico insieme ai domini estrinseci di entrambe le subunità redox citocromo c_1 e ISP (Figura A.11). Qcr6 interagisce con il citocromo c_1 nel complesso totalmente assemblato.

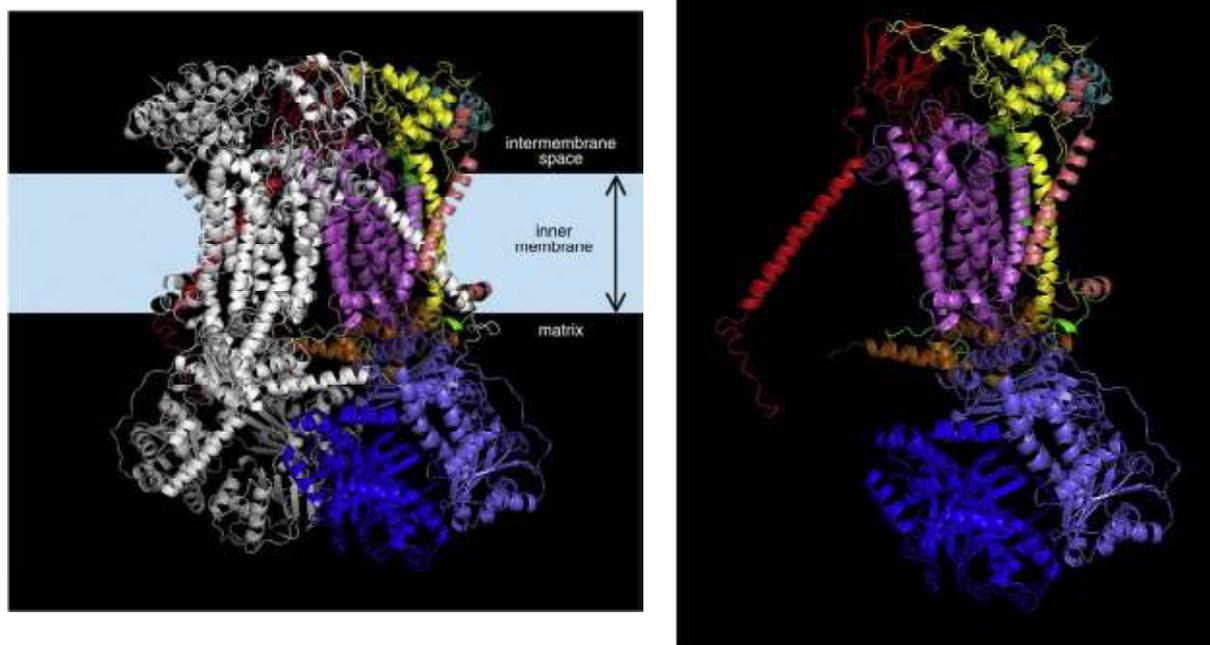


Figura A.11 Il complesso bc_1 di lievito. A) Forma omo-dimerica del complesso. Le subunità di un monomero sono rappresentate in grigio, mentre quelle del secondo monomero seguono il seguente codice colore: citocromo b in viola, citocromo c_1 in giallo, proteina IRS in rosso, proteina core 1 in azzurro, proteina core 2 in blu, Qcr6 in ciano, Qcr7 in arancione, Qcr8 in verde e Qcr9 in salmone. Qcr10 non è presente nella struttura cristallografica di lievito. B) Monomero del complesso III. (Da Zara *et al.*, 2009)

L'assemblaggio dell'omo-dimero è piuttosto complesso e largamente incompreso. Molto probabilmente, come nel caso dell'assemblaggio di altri complessi respiratori (Fontanesi *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2007), è necessaria la partecipazione di proteine accessorie che non appartengono al complesso funzionale bc₁. Solo alcune proteine accessorie sono state identificate (Wu and Tzagoloff, 1989; Nobrega *et al.*, 1992; Crivellone, 1994), e il chiarimento dei loro ruoli durante la biogenesi del complesso è solo all'inizio.

La biogenesi del complesso III è stata investigata estesamente nel lievito. Uno strumento molto utile per l'analisi strutturale di proteine oligomeriche è l'elettroforesi bidimensionale (Schägger and Pfeiffer, 2000; Dudkina *et al.*, 2005; Horan *et al.*, 2005; McKenzie *et al.*, 2007): la prima dimensione consiste in una elettroforesi *blue native* (BN-PAGE) (Schägger and von Jagow, 1991), mentre la seconda in un SDS-PAGE (Laemmli, 1970); seguita da *western blot* e immunorilevazione. Recentemente questo approccio è stato utilizzato nei 10 mutanti di lievito privi dei geni che codificano per le varie subunità del complesso (Zara *et al.*, 2007). Grazie a questi recenti studi è stato proposto un nuovo modello di assemblaggio del complesso bc₁ (figura A.12). Come inizialmente proposto, il processo di assemblaggio inizia con la formazione di un cuore centrale del complesso che è costituito dal citocromo b associato alle proteine non redox Qcr7 e Qcr8. Inoltre, in aggiunta alla già nota interazione tra le proteine core 1 e 2, è stata rilevata l'interazione del citocromo c₁ con entrambe queste subunità. Sembra che il citocromo c₁ si leghi preferenzialmente alla proteina core 2 e, solo in assenza di questa, emerge la possibilità di interazione con la proteina core 1. A questo punto, il cuore centrale e queste tre proteine (core 1 e 2 e citocromo c₁) si associano tra loro per dare luogo ad un sub-complesso di 500 kDa. In base al peso molecolare delle varie proteine, si pensa che facciano parte di questo sub-complesso anche altri fattori di assemblaggio non ancora identificati. In questa fase avviene anche il legame di Qcr6. Questo sub-complesso quindi è in grado di legare Qcr9, ISP e Qcr10. E' possibile che Qcr10 e ISP si associno tra loro prima di essere aggiunte al sub-complesso (Phillips *et al.*, 1993). Questo modello, come il precedente, non tiene in considerazione la partecipazione di proteine accessorie perché la loro presenza e il loro ruolo durante l'assemblaggio del complesso sono ancora largamente sconosciute. Si sa comunque che Bcs1 (Nobrega *et al.*, 1992) è legata al sub-complesso di 500 kDa (Zara *et al.*, 2007) e che partecipa nel legame di ISP (Cruciat *et al.*, 1999). Inoltre si pensa che le due piccole proteine accessorie Cbp3 e Cbp4 partecipino alla formazione del cuore centrale del complesso III (Wu and Tzagoloff, 1989; Crivellone, 1994).

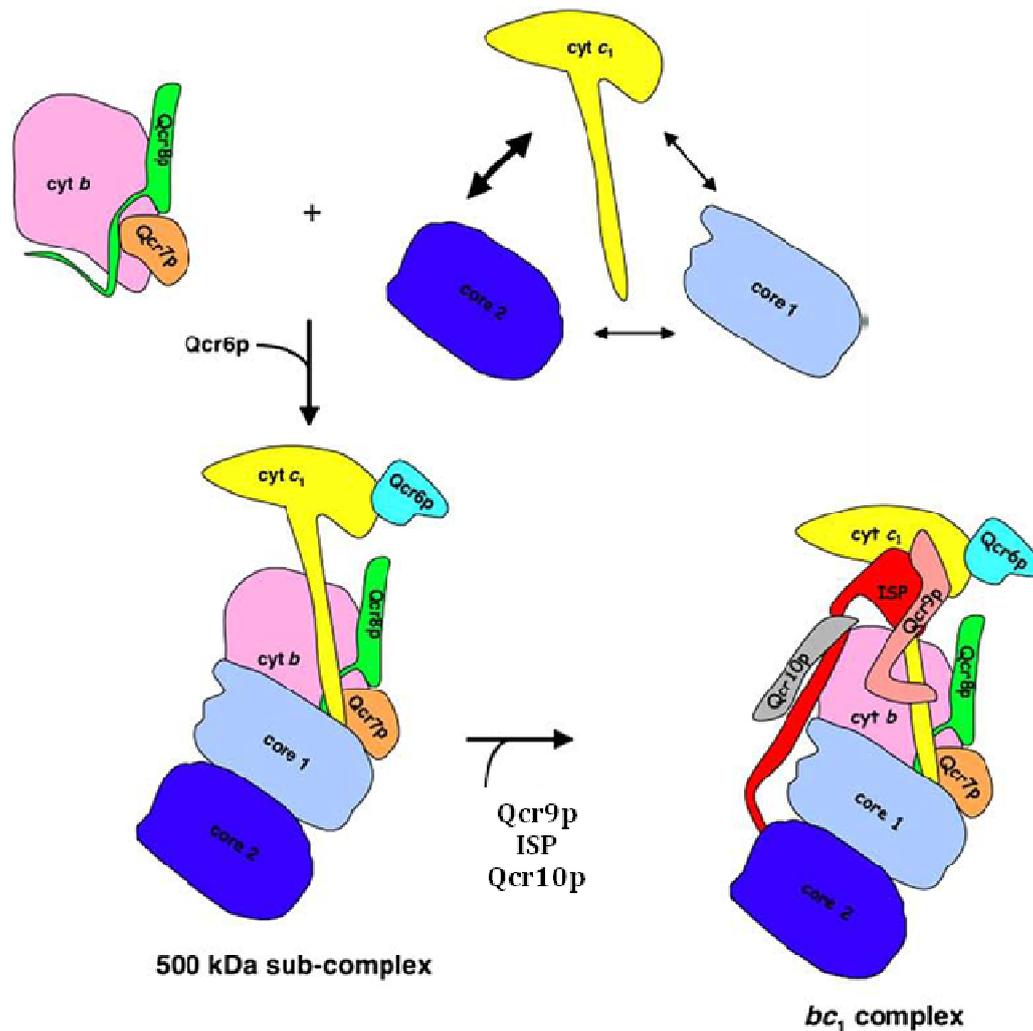


Figura A.12 Modello schematico che rappresenta i presunti *steps* di assemblaggio del complesso bc_1 . (Da Zara *et al.*, 2009)

Questo è il modello di assemblaggio di un monomero, poi però due monomeri devono in qualche modo formare l'omo-dimero, e questo rende l'assemblaggio del complesso III ancora più complicato. La situazione, inoltre, è ancora più intricata se si considera che il complesso omo-dimerico III, una volta assemblato nella membrana mitocondriale interna, è strutturalmente e funzionalmente connesso ad altri complessi della catena respiratoria. E' infatti stato dimostrato che il complesso bc_1 è associato a una o due complessi IV (Cruciat *et al.*, 2000; Schägger and Pfeiffer, 2000) formando un super-complesso. E' possibile che anche i lipidi giochino un ruolo del tenere insieme i vari complessi respiratori. E' stato proposto che la cardiolipina sia essenziale per la formazione dei super-complessi (Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005) o almeno giochi un ruolo nella loro stabilità (Pfeiffer *et al.*, 2003), ma anche altri posfolipidi potrebbero essere coinvolti nella stabilizzazione di super-complessi.

A.6.4 COMPLESSO IV

La citocromo c ossidasi (COX o complesso IV), l'ultimo enzima della catena respiratoria, gioca un ruolo fondamentale nella produzione di energia aerobica.

Il complesso IV è un metallo-enzima rame-eme_A che funziona come pompa protonica guidata dagli elettroni. Catalizza il trasferimento di elettroni dal ferro-citocromo c all'ossigeno molecolare attraverso i suoi quattro co-fattori redox (figura A.13). Gli elettroni entrano nel complesso IV attraverso un centro rame, il sito Cu_A, localizzato nella subunità 2. Gli elettroni sono poi trasferiti dal Cu_A a un eme a *low-spin* localizzato nella subunità 1 e successivamente vengono trasferiti intra-molecolarmente al sito attivo dove un eme a₃ *high-spin* e Cu_B formano un centro binucleare per il legame dell'ossigeno. Il meccanismo di trasferimento di elettroni è stato estensivamente studiato (Hill, 1994; Brunori *et al.*, 1998; Brunori *et al.*, 2005).

La reazione di trasferimento di elettroni è accoppiata con il trasferimento di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana contribuendo così alla generazione del gradiente protonico che viene successivamente utilizzato dalla F₁F₀ ATP sintasi mitocondriale per guidare la sintesi di ATP. Il meccanismo di pompaggio di elettroni è stato argomento di intensivi studi (Belevich *et al.*, 2006, Yoshikawa *et al.*, 2006).

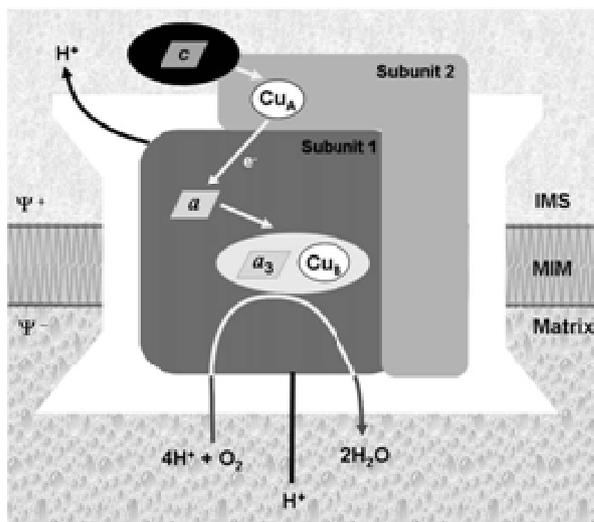


Figura A.13 Rappresentazione delle due subunità catalitiche del complesso IV. (Da Barrientos *et al.*, 2009)

Il complesso IV è un enzima multimerico formato da subunità con una doppia origine genetica il cui assemblaggio è intricato ed estremamente regolato. La citocromo c ossidasi del lievito *S. cerevisiae* è formata da 11 subunità (tabella A.1). Le subunità 1, 2 e 3, proteine idrofobiche transmembrana di grandi dimensioni, sono codificate dall'mtDNA e formano il cuore catalitico dell'enzima, infatti contengono i gruppi prostetici metallici. Questo cuore è circondato da un set di piccole subunità codificate dal DNA nucleare che sono importanti sia per l'assemblaggio che per la funzione dell'enzima, nonché per la sua dimerizzazione (Barrientos *et al.*, 2002; Fontanesi *et al.*, 2006). Queste subunità sono anche coinvolte nella

modulazione dell'attività catalitica e protezione del cuore dell'enzima dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In aggiunta alle subunità strutturali, è necessario un gran numero di fattori di assemblaggio per “costruire” l'oloenzima. La funzione di questi fattori non-strutturali è richiesta in ogni passaggio del processo di assemblaggio. I ruoli comprendono la trascrizione e maturazione dell'mRNA, la traduzione dei geni mitocondriali, l'*import* nel mitocondrio di subunità codificate nel nucleo e l'inserimento delle subunità transmembrana nella membrana mitocondriale interna. Essenziali ruoli addizionali coinvolgono la biosintesi dell'eme, l'omeostasi del rame e il loro inserimento nell'apoenzima e la formazione di intermedi di assemblaggio (Fontanesi *et al.*, 2008).

La biogenesi del complesso IV probabilmente avviene con l'aggiunta ordinata delle differenti subunità e cofattori. L'assemblaggio inizia attorno alla subunità 1 e procede con la formazione di diversi intermedi discreti di assemblaggio che probabilmente rappresentano step limitanti nel processo (Nijtmans *et al.*, 1998).

Lo *screening* dei mutanti respiratorio deficienti ha portato all'identificazione di molti geni nucleari che codificano per fattori accessori (McEwen *et al.*, 1986; Tzagoloff and Dieckmann, 1990). La loro funzione, necessaria per tutti i vari step del processo è riassunta in tabella A.1 (Barrientos *et al.*, 2009; reviewed in Barrientos *et al.*, 2002; Khalimonchuk and Rodel 2005; Herrmann and Funes 2005).

Tabella A.1 Subunità del complesso IV. (Da Barrientos *et al.*, 2009)

Yeast		Function	Yeast		Function
Gene	Protein		Gene	Protein	
<i>Catalytic core (mtDNA-encoded structural subunits)</i>			<i>Copper metabolism and insertion</i>		
COX1	Cox1p	Catalytic subunits	COX17	Cox17p	Delivery of copper to Sco1p and Cox11p
COX2	Cox2p		SCO1	Sco1p	Transfer of copper to COX and/or reduction of cysteine residues in subunit 2
COX3	Cox3p	Catalytic core stability?	COX11	Cox11p	Stable formation of the Cu(B) and magnesium centers
<i>Core protective shield (nDNA encoded structural subunits)</i>			COX19	Cox19p	CX ₉ C proteins. They could play roles in redox control and copper trafficking in the intermembrane space
COX4	Cox4p	Subunits required for COX assembly and function	COX23	Cox23p	
COX5a	Cox5ap		PET191	Pet191p	
COX5b	Cox5bp		CMC1	Cmc1p	
COX6	Cox6p		<i>Heme A biosynthesis</i>		
COX7	Cox7p		COX10	Cox10p	Farnesylation of protoheme
COX9	Cox7ap		COX15	Cox15p	Hydroxylation of heme O
COX8	Cox8p		<i>Assembly/unknown</i>		
COX12	Cox9p	Non-essential subunits	COX16	Cox16p	Unknown function
COX13	Cox10p		PET117	Pet117p	Unknown function
<i>Membrane insertion and processing of catalytic core subunits</i>			PET100	Pet100p	Formation of assembly intermediates containing Cox7p, Cox8p, and Cox9p
OXA1	Oxa1p	Membrane insertion of COX subunits, cytochrome <i>b</i> and ATPase proteolipid	SHY1	Surf1p	Catalyzes an assembly step in which Cox1p is one of the partners
COX20	Cox20p	Cox2p chaperone. Presentation of Cox2p-precursor to the IMP complex	MSS51	Mss51p	Required for translation of COX1 mRNA. Additionally, binds Cox1p and is required for its stability/ maturation/assembly
COX18	Cox18p	Export of the Cox2p C-terminus tail	COX14	Cox14p	Binds Cox1p and is required for its stability/ maturation/assembly
MSS2	Mss2p	Export of the Cox2p C-terminus tail	COA1	Coa1p	Binds Cox1p and is required for its stability/ maturation/assembly
PNT1	Pnt1p	Export of the Cox2p C-terminus tail			
IMP1	Imp1p	Responsible for the maturation of Cox2p			
IMP2	Imp2p	Necessary for the stability and activity of Imp1			
SOM1	Som1p	Third component of the yeast IMP complex. It could play a role in substrate recognition			

Recentemente sono stati scoperti nuovi livelli di regolazione dell'assemblaggio del complesso IV (Fontanesi *et al.*, 2008). L'organizzazione della catena respiratoria e della fosforilazione ossidativa nella membrana mitocondriale interna gioca un ruolo cruciale nell'assemblaggio e nella stabilità della COX. Infatti, la presenza fisica del citocromo c è essenziale per l'assemblaggio del complesso. Inoltre, per il massimo livello di biogenesi della citocromo c ossidasi, è richiesta la presenza dell'ATP sintasi completamente assemblata e funzionale.

A.6.5 COMPLESSO V

La fosforilazione ossidativa è catalizzata dalla catena respiratoria e dal traslocatore di protoni ATP sintasi che utilizza il gradiente protonico prodotto durante il trasporto di elettroni per la sintesi di ATP (Boyer, 1993).

L'ATP sintasi mitocondriale è un complesso formato da almeno 17 subunità, con una massa molecolare di circa 600 kDa (Velours and Arseline, 2000).

Storicamente è stata descritta in termini di un dominio idrofobico (F_0), che contiene il canale protonico, e una ATPasi idrofilica (F_1) che reca i siti del processamento dell'ADP (Boyer, 1997; Senior *et al.*, 2002; Nakamoto *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 2000).

F_1 e F_0 sono fisicamente connesse attraverso uno *stalk* centrale, o semplicemente *stalk*, e uno *stalk* periferico, detto anche *stator* (Boyer, 1997; Walker and Dickson, 2006) (figura A.14).

Mutanti dell'ATP sintasi possono mostrare due distinti fenotipi biochimici. La caratteristica dei mutanti con difetti nell'assemblaggio dell' F_1 è l'assenza di attività ATPasica nei mitocondri. Mentre i mutanti difettivi dell'assemblaggio dell' F_0 perdono l'inibizione dell'ATPasi da parte dell'oligomicina (Tzagoloff and Dieckmann, 1990). Questo antibiotico blocca il canale protonico dell' F_0 e inibisce l' F_1 - F_0 , in quanto la reazione idrolitica è necessariamente accoppiata alla traslocazione di protoni attraverso l' F_0 , ma non l' F_1 . Mutanti difettivi nell' F_0 contengono un oligomero F_1 completamente assemblato, fisicamente ed enzimaticamente indistinguibile dall'enzima *wild type*.

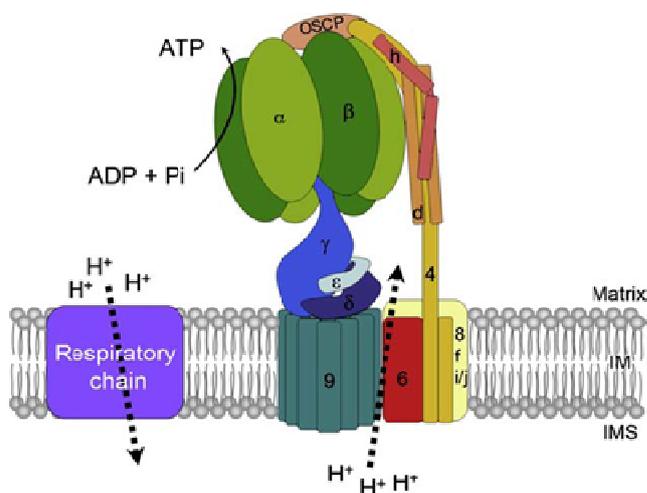


Figura A.14 Rappresentazione dell'ATP sintasi. (Da Rack *et al.*, 2009)

L' F_1 è composta da cinque diverse subunità con una stechiometria $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. La maggior parte di questo dominio globulare è formata da subunità α e β , che contengono i siti catalitici dell'enzima, alternati tra loro. Il cuore dell'esamero $\alpha_3\beta_3$ sferico è occupato da un dominio α -elica *coiled-coiled* della subunità γ . L'altra parte della subunità γ protrude dal lato basale del F_1 dove interagisce con le piccole proteine δ e ϵ per formare lo *stalk* centrale. Lo *stalk* ha un'ampia base che contatta le subunità 9 dell' F_0 (Walker *et al.*, 1985; Stock *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2000).

L' F_0 non ha attività ATPasica intrinseca. La sua funzione principale è di usare l'energia elettrochimica del gradiente protonico generato durante il trasporto di elettroni e convertirla in un movimento rotazionale della subunità polimerica 9. Durante questo processo i protoni passano dallo spazio intermembrana alla matrice. La traslocazione di protoni avviene all'interfaccia tra la subunità 9 e la subunità 6 (Boyer, 1997; Stock *et al.*, 2000). La subunità 9 è un proteolipide a basso peso molecolare con una struttura a forcina consistente in due α -eliche transmembrana, separate da un piccolo *loop* di residui polari, che si estendono nella matrice (Dmitriev *et al.*, 1999; Fillingame and Dmitriev, 2002). L'ATP sintasi di lievito ha 10 copie della subunità 9 arrangiate a formare un anello (Stock *et al.*, 1999). L'anello di subunità 9 è coinvolto in due interazioni funzionalmente importanti. La prima, tra la regione del *loop* polare della subunità 9 e le subunità $\gamma\delta\epsilon$ dello *stalk*, agisce per garantire una relazione fisica tra F_1 e F_0 . La seconda interazione è tra l'anello di subunità 9 e la subunità 6, una proteina transmembrana presente in una sola copia. La rotazione dell'anello durante ogni ciclo catalitico causa il distacco della subunità 6 dalla sua interazione pre-esistente e se ne forma una nuova con la successiva subunità 9 dell'anello (Fillingame *et al.*, 2002; Fillingame *et al.*, 2003).

Lo *stator* è composto da OSCP e le subunità 4, d ed h (Walker and Dickson, 2006; Collinson *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2006). Le subunità d, h e OSCP sono proteine idrofiliche. Al contrario, la subunità 4 possiede sia un dominio di ancoraggio alla membrana, che contatta la subunità 6 dell' F_0 (Spannagel *et al.*, 1997), che un dominio idrofilico che si estende dalla superficie della membrana interna alla regione apicale dell' F_1 (Velours and Arselin, 2000). Probabilmente le quattro subunità che compongono lo *stator* contattano altre componenti dell'ATP sintasi che sono localizzate nella membrana come le subunità 8, f ed i (Velours and Arselin, 2000). In realtà l'esatta demarcazione tra F_0 e *stator* è difficile da tracciare, è più una questione semantica, almeno finché non sarà possibile avere informazioni strutturali ad alta risoluzione. La proteina OSCP è legata alla regione apicale dell'esamero $\alpha_3\beta_3$ ed è connessa allo *stator* attraverso le subunità 4 ed h. La parte esterna dello *stator*, che si estende lungo la periferia dell'esamero $\alpha_3\beta_3$ verso la superficie della membrana, include le subunità 4, d ed h (Walker and Dickson, 2006; Dickson *et al.*, 2006). Il ruolo dello *stator* è di unire l' F_1 alla subunità 6.

L'insieme dello *stator*, la subunità 6 e l'esamero $\alpha_3\beta_3$ costituiscono la parte stazionaria/fissa dell'enzima, mentre lo *stalk* $\gamma\delta\epsilon$ e l'anello di subunità 9 funzionano come un motore alimentato dalla traslocazione di protoni tra le subunità 6 e 9. Come risultato del flusso di

protoni si ha la rotazione dell'anello composto dalle subunità 9 insieme allo *stalk* centrale (Boyer, 1997; Senior *et al.*, 2002; Nakamoto *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 2000). Il movimento rotatorio dello *stalk* determina l'interazione della subunità γ in successione con i tre siti catalitici dell' F_1 localizzati nel cuore dell'esamero $\alpha_3\beta_3$ e l'induzione di un loro cambiamento conformazionale. Il cambiamento conformazionale altera l'affinità del substrato e del prodotto ed è una caratteristica intrinseca del meccanismo attraverso il quale l'ADP e il fosfato inorganico vengono esterificati o idrolizzati (Boyer, 1993; Abrahams *et al.*, 1994). In particolare, i siti catalitici transitano sequenzialmente attraverso tre stati che favoriscono il legame dell'ADP e Pi, la sintesi di ATP e il suo rilascio dall'enzima, rispettivamente.

La direzionalità del flusso protonico e la rotazione dell'anello dipende se il complesso V è coinvolto nella sintesi o nell'idrolisi di ATP.

Oltre a catalizzare la sintesi di ATP e mantenere il potenziale di membrana attraverso la traslocazione ATP dipendente di protoni dalla matrice, è stato dimostrato che l'ATP sintasi esiste come dimero (Arnold *et al.*, 1998), una caratteristica che si pensa sia importante per determinare la curvatura della membrana interna (Allen *et al.*, 1989). La dimerizzazione dipende dalle subunità Su e e Su g (Arnold *et al.*, 1998; Paumard *et al.*, 2002). Inoltre un'altra piccola proteina, Su k, è stata trovata solo nella forma dimerica dell'ATP sintasi, ma non è necessaria affinché questo processo abbia luogo (Arnold *et al.*, 1998). Infine, altre tre proteine (If1, Stf1 e Stf2) sono implicate nella regolazione dell'ATP sintasi modulando la sua attività idrolitica (Hashimoto *et al.*, 1990; Walker 1994; Hong *et al.*, Pedersen 2002).

La biogenesi di un'ATP sintasi funzionante è un processo sofisticato che dipende dall'espressione coordinata del genoma mitocondriale e nucleare, da eventi di riconoscimento/interazione delle varie subunità e da *chaperon* che assistono e promuovono certi step dell'assemblaggio.

L'ATP sintasi consiste di parti strutturalmente e funzionalmente distinte: F_0 , F_1 , *stalk* e *stator*. Ci sono evidenze che suggeriscono che l'ATP sintasi si assembli a partire da questi moduli (figura A.15).

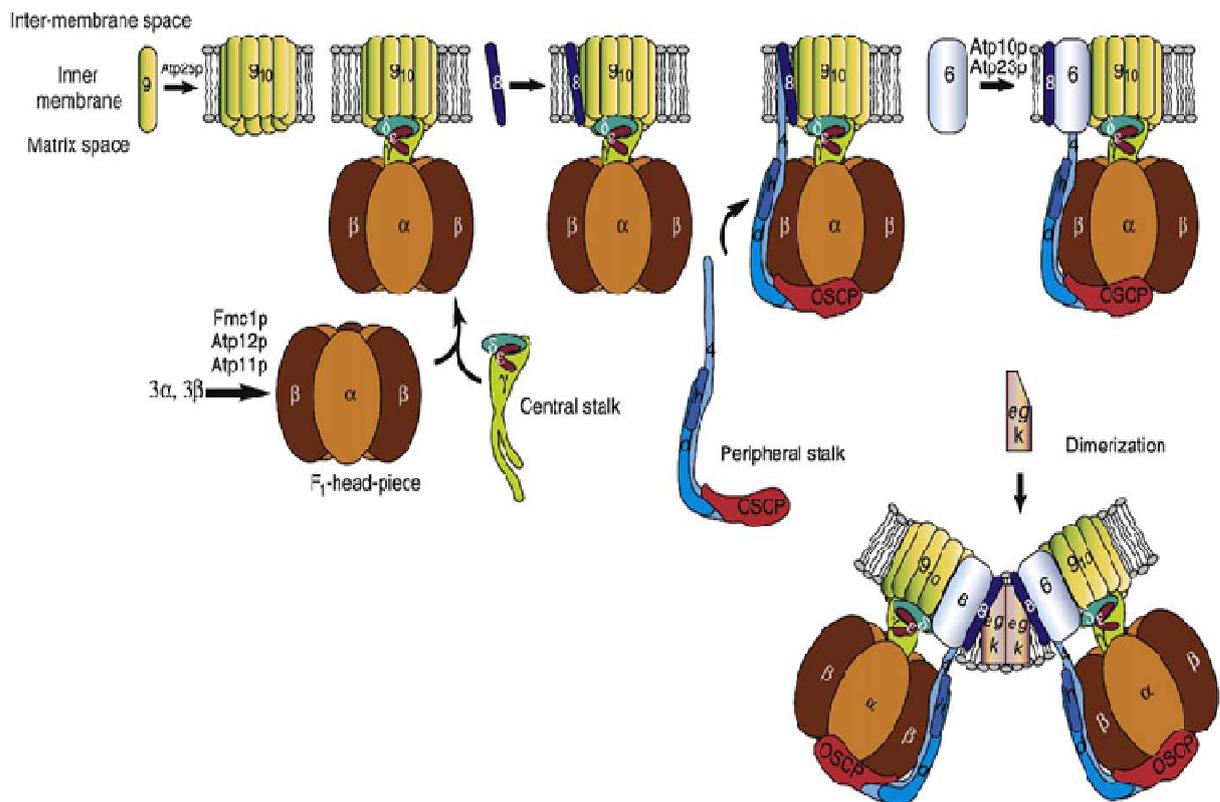


Figura A.15 Schema dell'assemblaggio del complesso V di lievito. (Da Kucharczyk *et al.*, 2009)

Attualmente si pensa che, dopo la sintesi sui ribosomi mitocondriali, la proteina Atp9 oligomerizzi per formare un anello a 10 subunità al quale il settore F₁ è successivamente attaccato. Si pensa che questo pre-complesso sia successivamente completato dall'aggiunta di Atp8, seguita da Atp4, un componente del braccio dello *stator*, e alla fine Atp6. L'aggiunta di Atp6 in una fase tardiva dell'assemblaggio potrebbe impedire la formazione di un enzima parzialmente assemblato che potrebbe dissipare il potenziale di membrana attraverso la dispersione di protoni mediata da F₀ (Hadikusumo *et al.*, 1988). Tuttavia, non si può escludere che ci sia un altro *pathway*, nel quale l'assemblaggio della parte F₀ procede fino al punto in cui la subunità 6 e lo *stator* si uniscono all'anello, seguito dall'interazione del sub-complesso F₁.

L'assemblaggio dell'F₀ richiede almeno tre proteine: Atp10 (Tzagoloff *et al.*, 2004), Atp23 (Tzagoloff *et al.*, 2004; Osman *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2007a) e Atp25 (Zeng *et al.*, 2008). L'ultima è richiesta per l'espressione di Atp9, ed è stato proposto che sia coinvolta nella formazione dell'anello di subunità 9 (Zeng *et al.*, 2008). Gli altri due fattori sono necessari per l'incorporazione di Atp6 nel complesso V.

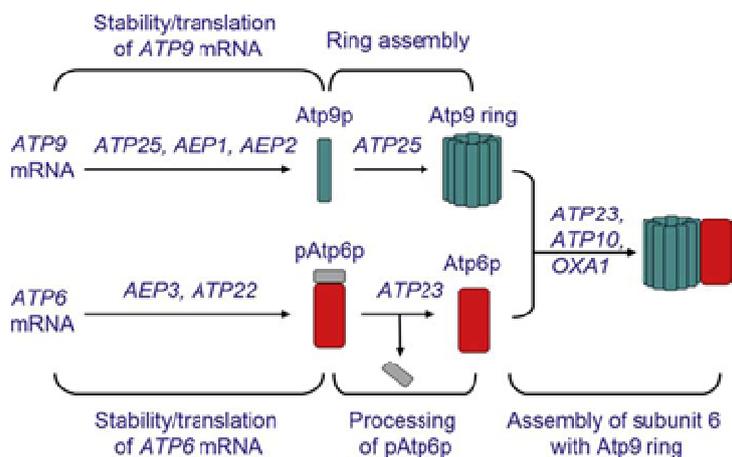


Figura A.16 Schema dei fattori necessari per l'assemblaggio delle subunità 6 e 9. (Da Rak *et al.*, 2009)

La biogenesi dell'esamero $\alpha_3\beta_3$ dell' F_1 richiede il *chaperon* mitocondriale Hsp60 e almeno altri tre fattori: Atp11, Atp12 (Ackerman and Tzagoloff, 1990) e Fmc1 (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2001). Atp11 e Atp12 funzionando come *chaperon* mitocondriali che interagiscono con le subunità β e α , rispettivamente, schermando le loro superfici idrofobiche (Ackerman, 2002; Wang *et al.*, 2000) promuovono il loro assemblaggio nell'oligomero F_1 dell'ATPasi (Ackerman and Tzagoloff, 1990; Wang and Ackerman, 1996; Wang and Ackerman, 1998). In assenza di una delle due proteine, le subunità α e β si aggregano in ampi corpi di inclusione insolubili nella matrice mitocondriale (Ackerman and Tzagoloff, 1990; Lefebvre-Legendre *et al.*, 2005). Tali aggregati sono anche presenti nei mutanti delle subunità α e β stesse, ma non nei mutanti delle subunità γ , δ o ϵ (Paul *et al.*, 1994; Giraud and Velours, 1994; Guelin *et al.*, 1993). Anche mutazioni in *FMCI* provocano aggregazione delle subunità α e β , ma solo se le cellule sono cresciute a 37°C (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2001). Infatti, a 30°C nei mutanti *fmc1* l'assemblaggio dell' F_1 avviene correttamente e la crescita su fonti di carbonio non fermentabili è normale. Una caratteristica interessante è che il fenotipo del mutante *fmc1* è soppresso dall'overespressione di *ATP12*, per questo è stato proposto che la proteina Fmc1 fosse necessaria per il corretto *folding* di Atp12.

Sono anche noti diversi fattori accessori specifici per l' F_0 -ATP sintasi. Ad oggi sono noti nove fattori che riguardano la stabilità e/o la traduzione degli mRNA di *ATP6* e *ATP9* (figura A.16).

L'assemblaggio dello *stator* probabilmente comincia con il trasporto e l'inserimento della subunità 4 nella membrana interna. La regione idrofilica della subunità 4, esterna alla membrana, potrebbe essere tutto il necessario per l'interazione con gli altri componenti dello *stator*. Mutazioni nello *stator* non interferiscono nell'assemblaggio dell' F_1 , ma inficiano la sua abilità di interagire con l'anello di subunità 9. L'oligomero F_1 di mutanti dello *stator* è recuperato nella frazione delle proteine solubili.

Un fatto curioso è che nei mitocondri di *S. cerevisiae* ci sono attivatori traduzionali gene-specifici legati alla membrana interna che mediano interazioni produttive tra mRNA mitocondriale e ribosomi sulla superficie della membrana, suggerendo un inserimento co-traduzionale delle proteine codificate dall' mtDNA (Fox, 1996; Naithani *et al.*, 2003). Questi fattori possono regolare il tasso di sintesi proteica nei mitocondri e/o localizzare la traduzione nei siti dove i prodotti genici mitocondriali possono essere efficientemente assemblati. Ad esempio, Atp22 attiva specificamente la traduzione di Atp6 (Zeng *et al.*, 2007b).

Mentre è largamente accettato che le proteine mitocondriali codificate dal nucleo siano sintetizzate sui ribosomi liberi nel citoplasma prima di essere importate nei mitocondri (Neupert and Herrmann, 2007), ci sono recenti evidenze che una sotto-classe di queste proteine siano invece tradotte su ribosomi associati ai mitocondri (Sylvestre *et al.*, 2003). Ad esempio per l'ATP sintasi, l'mRNA di varie subunità (α , β e γ) (Margeot *et al.*, 2005) è stato trovato preferenzialmente, se non esclusivamente, localizzato sulla superficie mitocondriale.

A.7 ORGANIZZAZIONE IN SUPERCOMPLESSI DEGLI ENZIMI DELLA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

Sempre più evidenza indicano che gli enzimi coinvolti nella fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXPHOS) sono co-assemblati in supercomplessi nella membrana mitocondriale interna, chiamati supercomplessi respiratori o “respirosomi” (Schagger and Pfeiffer, 2000; Schagger, 2001; Wittig *et al.*, 2006), quindi c'è un ulteriore grado di organizzazione.

Non tutti sono d'accordo per quanto riguarda l'organizzazione del doppio stato lipidico. I modelli proposti variano dallo “stato fluido” (reviewed in Lenaz and Genova, 2007) allo “stato solido”.

Secondo il modello dell'organizzazione “fluida”, i complessi I-IV esistono come complessi indipendenti che diffondono in maniera *random* nella membrana lipidica. Dall'altra parte, il modello “solido” favorisce l'ipotesi dell'esistenza di un ulteriore livello di organizzazione dei complessi OXPHOS nella membrana interna che promuove il passaggio diretto di elettroni tra complessi fisicamente associati (Schagger, 2001; Schagger, 2002; Boekema and Braun, 2007).

Il fatto di riuscire a isolare i singoli complessi nella loro forma funzionalmente attiva, dimostra che la loro co-associazione nella membrana non è necessaria per la funzione enzimatica. Tuttavia, l'utilizzo di detergenti blandi, come ad esempio la digitonina, ha reso possibile la purificazione anche dei complessi associati (supercomplessi) e questo favorisce il modello “solido”.

In *S. cerevisiae* sono stati descritti tre supercomplessi: i) il supercomplesso deidrogenasico mitocondriale; ii) il supercomplesso bc₁-COX (III-IV) e, iii) oligomeri di ATP sintasi.

- i) Recenti analisi hanno indicato che le proteine Ndi1, Nde1 e Nde2 sono organizzate insieme in un supercomplesso che è stato proposto essere associato con altre NADH deidrogenasi, la glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (Gut2), la D-lattato deidrogenasi (Dld1) e la L-lattato deidrogenasi (Cyb2). La co-organizzazione di queste NADH deidrogenasi sembra giocare un ruolo chiave nel *channeling* del NADH nel sistema OXPHOS di lievito (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001).
- ii) In condizioni di estrazione con detergenti blandi è possibile purificare il complesso III di lievito con la COX (complesso IV) (Cruciat *et al.*, 2000; Schägger and Pfeiffer; 2000, Zara *et al.*, 2007). Sono state descritte due forme predominanti del supercomplesso III-IV: III₂-IV₂ e III₂-IV che differiscono per la stechiometria del complesso IV rispetto al III (Schägger and Pfeiffer, 2000). E' stato proposto che l'associazione bc₁-COX favorisca il flusso di elettroni tra i complessi, uno step catalizzato dal citocromo c (Schägger and Pfeiffer, 2000). La cardiolipina, lipide unico della membrana mitocondriale interna, gioca un ruolo nella stabilizzazione di questo supercomplesso. Infatti, in assenza di cardiolipina, pur essendo presenti i supercomplessi III₂-IV₁₋₂, questi sono più suscettibili ai detergenti (Pfeiffer *et al.*, 2003). L'organizzazione dei supercomplessi bc₁-COX non è limitata alle due forme citate. Infatti è noto che il supercomplesso può esistere associato fisicamente con varie ulteriori proteine tra cui Aac2, Tim23 e/o Shy1, dando origine a forme multiple di supercomplessi (figura A.17).

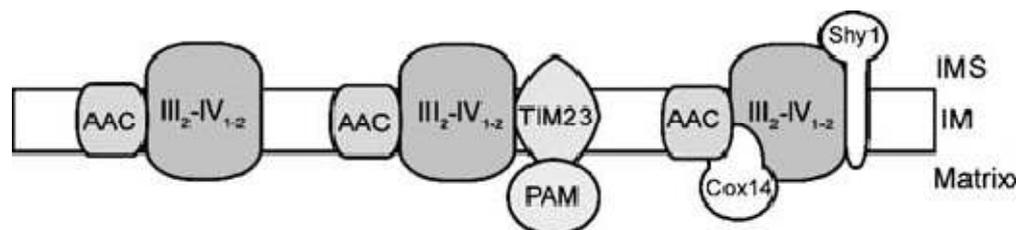


Figura A.17 Diverse forme del supercomplesso III-IV. (Da Stuart, 2008)

- iii) L'esistenza della forma dimerica dell'ATP sintasi è stata dimostrata in diversi organismi, compreso lievito e mammiferi (Arnold *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2005). Ulteriori studi hanno mostrato che i dimeri dell'ATP sintasi possono organizzarsi ulteriormente in tetrametri e oligomeri (Thomas *et al.*, 2008). Le proteine Su e e Su g sono richieste per l'assemblaggio dell'enzima dimerico/oligomerico (Arnold *et al.*, 1998; Paumard *et al.*, 2002; Fronzes *et al.*, 2006). Queste due proteine, insieme alla subunità 4 e ad altre proteine dello *stator* sono coinvolte nelle interazioni tra i monomeri (Gavin *et al.*, 2005; Fronzes *et al.*, 2006; Witting and Schägger, 2008).

A.8 FORMAZIONE DELLE *CRISTAE*

Come abbiamo precedentemente visto, i mitocondri sono circondati da 2 membrane: la membrana mitocondriale esterna (OMM) e la membrana mitocondriale interna (IMM). All'interno di quest'ultima si possono distinguere due regioni distinte, la *inner boundary membrane* (IBM), che è parallela e molto vicina alla membrana mitocondriale esterna, e la *cristae membrane* (CM), che si estende dalla IBM formando invaginazioni della membrana interna dove due foglietti della membrana interna sono giustapposti uno all'altro (figura A.18).

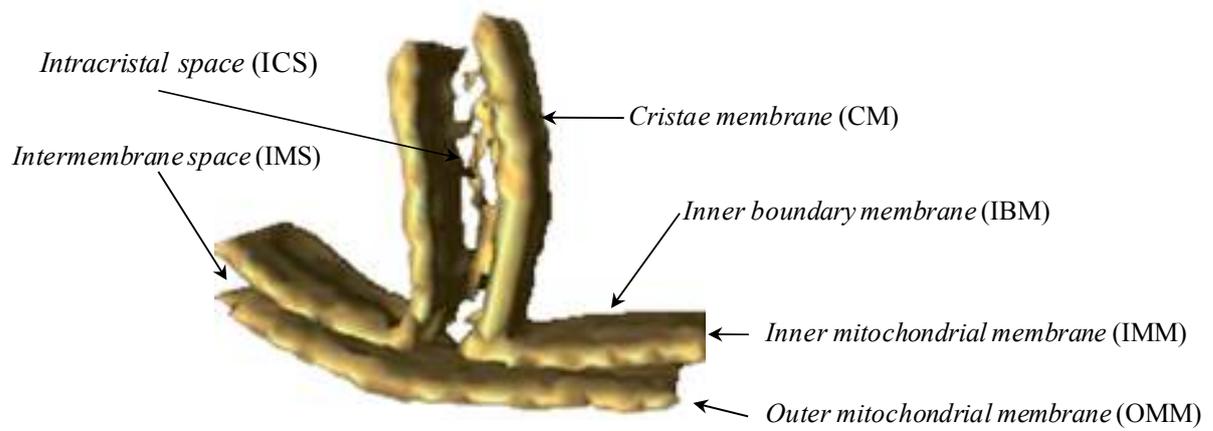


Figura A.18 Rappresentazione dei diversi subcompartimenti della membrana mitocondriale. (Adattato da Zick *et al.*, 2009)

Sono state osservate diverse forme ultrastrutturali dei mitocondri con *cristae* tubulari, lamellari e addirittura triangolari (Fawcett, 1981; Munn, 1974; Revel *et al.*, 1963).

Dall'introduzione della microscopia elettronica la ricerca riguardo alla struttura interna dei mitocondri è avanzata considerevolmente, ma molte rimangono le questioni aperte e dibattute. Il modello fino ad ora più accreditato, che è entrato in tutti i libri di testo, è il “baffle model” avanzato da Palade (Palade, 1952; Palade, 1953) nel quale le *cristae* sono considerate come invaginazioni della membrana mitocondriale interna con aperture piuttosto ampie (figura A.19A). Ma recentemente svariati studi hanno rivelato che le *cristae* sono attaccate alla IBM attraverso strette aperture tubulari che sono state denominate *cristae junction* (CJ) (figura A.19B) (Mannella *et al.*, 1994; Mannella *et al.*, 1997; Frey and Mannella, 2000; Mannella *et al.*, 2001; Frey *et al.*, 2002).

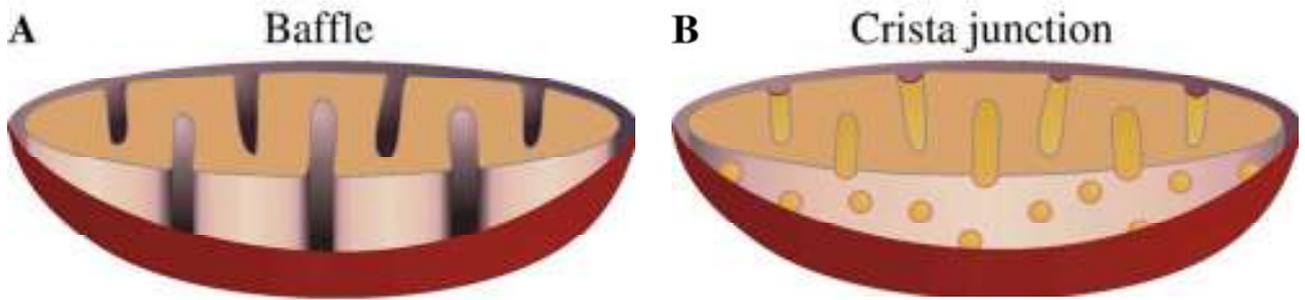


Figura A.19 Modelli della topologia della membrana mitocondriale interna. A) “Baffle model”; B) “Crista junction model”. (Da Zick *et al.*, 2009)

Le *cristae junction* sono presenti nei mitocondri di diversi tessuti e organismi, compreso *S. cerevisiae*. Nonostante siano state descritte diverse tipologie di *cristae*, le CJ sembrano avere sempre la stessa dimensione e forma.

Qual è il significato funzionale di queste strutture? Un’ipotesi è che le *cristae junction* giochino un ruolo cruciale nello stabilire subcompartimenti (Mannella *et al.*, 1997). Potrebbero infatti rappresentare barriere di diffusione tra lo spazio intermembrana (IMS) e lo spazio *intra-cristae* (ICS), ma anche tra la IBM e la CM. Come conseguenza si avrebbe una limitata diffusione di metaboliti come ad esempio i protoni e l’ADP (Frey *et al.*, 2002; Perkins *et al.*, 1997) e ciò potrebbe favorire la regolazione della fosforilazione ossidativa. Inoltre, potrebbe regolare anche la diffusione nella IMM di grossi complessi proteici (Vogel *et al.*, 2006).

Infatti, la *cristae membrane* è arricchita di proteine coinvolte nella fosforilazione ossidativa, nella biogenesi dei cluster Fe-S e nella sintesi e trasporto di proteine codificate dal genoma mitocondriale; mentre la *inner boundary membrane* è arricchita di proteine coinvolte nella fusione mitocondriale e nel trasporto di proteine codificate dal DNA nucleare. Inoltre è stato dimostrato che, quando lo stato fisiologico cambia, vi è una redistribuzione dinamica di queste proteine tra i due compartimenti della membrana interna (figura A.20) (Vogel *et al.*, 2006). Quindi le CJ non funzionano rigidamente come barriere di diffusione, ma il processo è dinamico.

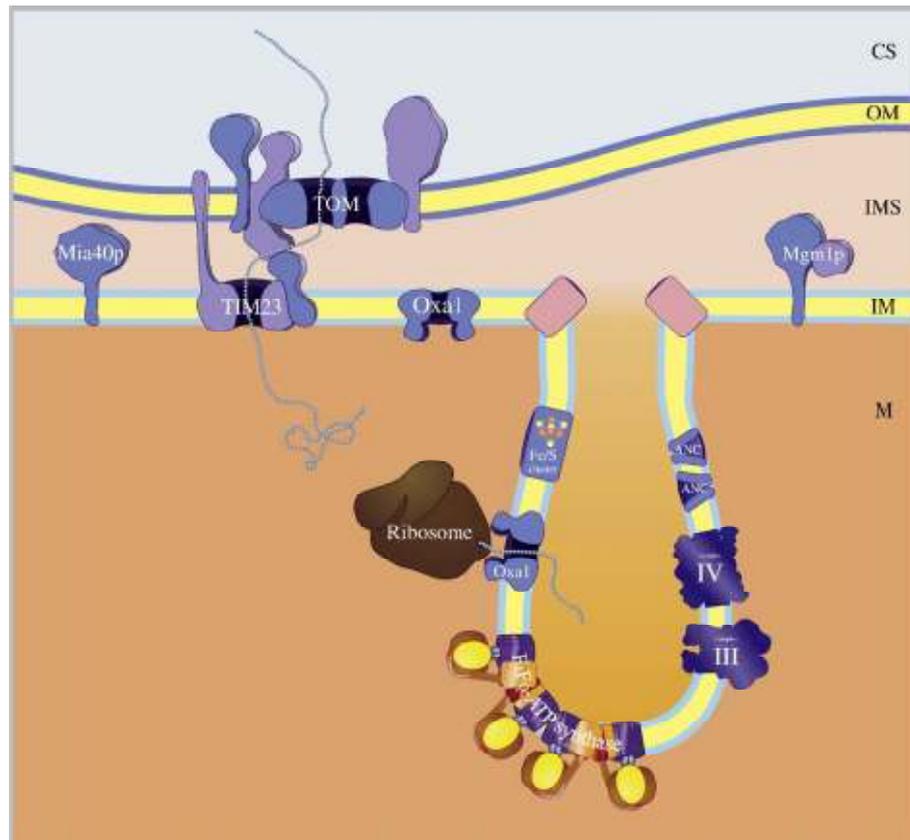


Figura A.20 Subcompartmentalizzazione della membrana mitocondriale interna. Le proteine della IMM coinvolte nella fusione mitocondriale (Mgm1) e nella traslocazione (Mia40, complesso TIM23) sono preferenzialmente localizzate nella *inner boundary membrane* (IBM). Al contrario, proteine coinvolte nella fosforilazione ossidativa (ANC - *carrier* di nucleotidi adeninici, Complesso III, Complesso IV, F₁F₀-ATP sintasi) e proteine coinvolte nella biogenesi dei cluster Fe-S (Fe/S cluster) sono arricchite nella *cristae membrane*. CS, Citosol; OM, membrana esterna; IMS, spazio intermembrana; IM, membrana interna; M, matrice. (Da Zick *et al.*, 2009)

Da alcuni anni ci sono evidenze del fatto che la F₁F₀-ATP sintasi mitocondriale, oltre alla sua attività enzimatica, abbia un ruolo nella determinazione della struttura delle *cristae*. È stato proposto che l'associazione dei dimeri di ATP sintasi in oligomeri sia responsabile della tubulazione della membrana mitocondriale interna (Allen, 1995).

Le subunità e (Atp21/Tim11) e g (Atp20) sono componenti dell'ATP sintasi che non sono richieste né per la sintesi né per l'idrolisi di ATP, bensì sono cruciali per la formazione di dimeri e oligomeri (Arnold *et al.*, 1998). I mutanti privi di queste subunità ($\Delta su e$ e $\Delta su g$) mostrano un'alterata morfologia mitocondriale, in particolare la *cristae membrane* forma una struttura a cipolla (*onion-like*) (Paumard *et al.*, 2002; Arselin *et al.*, 2004; Weimann *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2008). I cambiamenti dell'architettura delle *cristae* nei mitocondri è correlata con un collasso della morfologia mitocondriale visibile a livello di microscopia a fluorescenza. I mitocondri *wild type* formano un *network* reticolare e tubulare attraverso la cellula, mentre in assenza di Su e e Su g le cellule mostrano una forma aberrante senza la formazione del reticolo (Everard-Gigot *et al.*, 2005).

Inoltre, i mutanti $\Delta su e$ e $\Delta su g$ mostrano un'elevata perdita dell'mtDNA, un fenotipo spesso associato con difetti della morfologia mitocondriale.

L'alterazione della struttura mitocondriale, inoltre, è spesso accompagnata anche dalla presenza nella matrice di aggregati (Zick *et al.*, 2009).

Anche mutazioni nella subunità 4 destabilizzano i dimeri/oligomeri dell'ATP sintasi e comportano la comparsa di *cristae* a cipolla (Soubannier *et al.*, 2002; Weimann *et al.*, 2008).

E' stato proposto un modello per la formazione dei dimeri dell'ATP sintasi dove ci sono due differenti interazioni attraverso la porzione F_0 responsabili dell'associazione dei monomeri: la prima riguarda le subunità e e g, mentre la seconda riguarda la subunità 4 (figura A.21) (Paumard *et al.*, 2002). Non è escluso che anche altre subunità contribuiscano alla stabilizzazione dei dimeri/oligomeri.

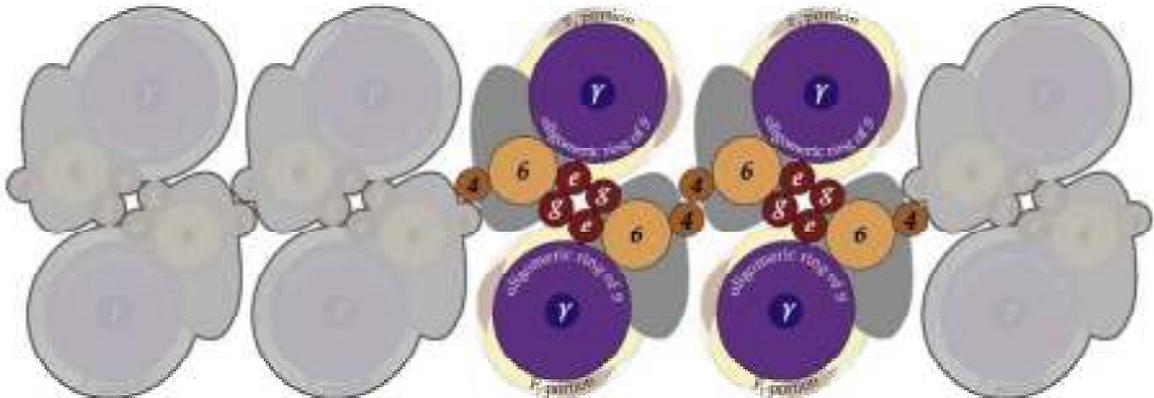


Figura A.21 Rappresentazione schematica vista dall'alto del putativo arraggiamento degli oligomeri dell'ATP sintasi. (Da Zick *et al.*, 2009).

E' stato proposto che la formazione dei dimeri e degli oligomeri imponga una certa curvatura alla membrana delle *cristae* (Figura A.22) (Dudkina *et al.*, 2006; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005; Strauss *et al.*, 2008).

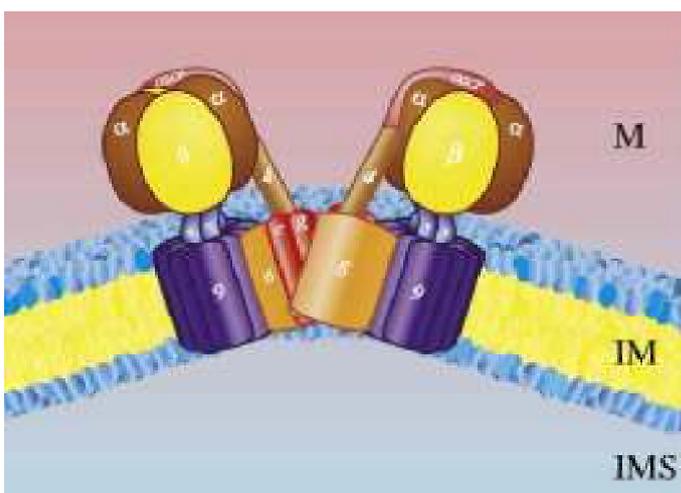


Figura A.22 Modello per l'induzione della curvatura della membrana da parte dei dimeri dell'ATP sintasi. (Da Zick *et al.*, 2009).

Recentemente il gruppo di Reichert ha studiato come vengono determinate molecolarmente le complesse strutture delle *cristae* che sono appena state descritte (Rabl *et al.*, 2009). In particolare è stata identificata una proteina che, insieme all'ATP sintasi, determina l'architettura delle *cristae*: Fcj1 (formation of *cristae junction* protein 1), una proteina che è presente soprattutto nella base delle CJ. Gli autori propongono un modello che spiega come Fcj 1 e le subunità e e g dell'ATP sintasi determinano la formazione delle *cristae*.

La delezione di *FCJ1* (*AIM28/FMP13/YKR014w*) porta alla perdita delle *cristae junction* (figura A.23A), mentre la sua overespressione porta ad un aumento delle CJ e alla formazione di ramificazioni interne alle *cristae* (figura A.23B) che possono essere considerate come CJ interne. Inoltre Fcj1 ha un ruolo regolatorio sulla stato oligomerico dell'ATP sintasi: la delezione di *FCJ1* determina l'aumento dei supercomplessi F₁-F₀, mentre la sua overespressione ne determina la riduzione (Rabl *et al.*, 2009).

Dall'altro lato, come visto precedentemente, la mancanza delle subunità e e g dell'ATP sintasi favorisce la dissociazione dell'F₁-F₀ in monomeri, senza alterare l'attività enzimatica del complesso V. Questi mitocondri hanno le *cristae junction* ma non hanno le *cristae tip*, cioè la regione terminale delle *cristae*. Di conseguenza si osserva un aumento delle *cristae* che si estendono attraverso il mitocondrio, terminando da entrambi i lati con CJ (figura A.23C) (Rabl *et al.*, 2009).

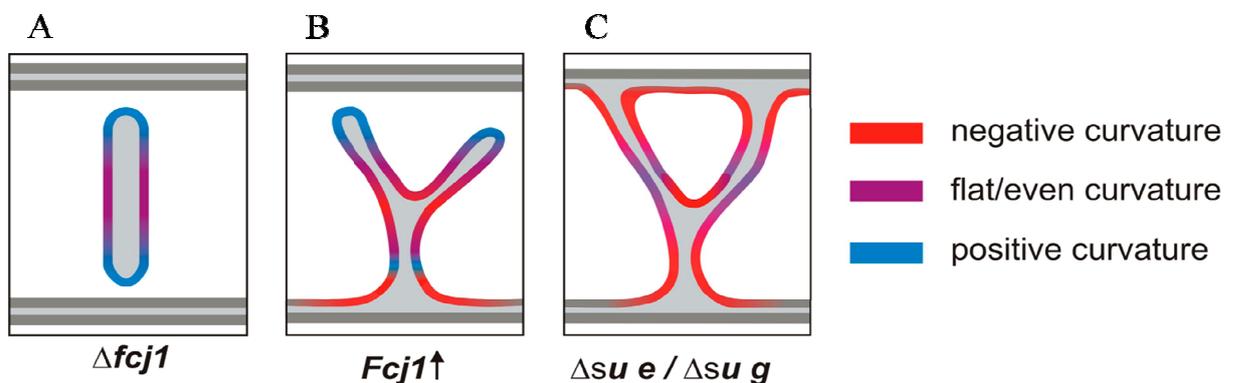


Figura A.23 Rappresentazione schematica delle *cristae* nei mutanti privi di Fcj1 (A), caratterizzati dall'over-espressione di Fcj1 (B) e deleti delle subunità e e g dell'ATP sintasi (C). (Da Rabl *et al.*, 2009)

In conclusione, i dati mostrano una funzione opposta di Fcj1 e Su e e Su g. Fcj1 è critico per la formazione delle *cristae junction*, mentre la formazione delle *cristae tip* richiede le subunità e e g dell'ATP sintasi, in linea con il loro arricchimento nelle rispettive regioni della membrana mitocondriale interna (Rabl *et al.*, 2009) e la loro azione è di sfavorire (per Fcj1) o favorire (per Su e/Su g) la formazione di dimeri/oligomeri dell'ATP sintasi.

Gli autori hanno proposto un modello delle basi molecolari della generazione delle *cristae junction* e delle *cristae tip* (Rabl *et al.*, 2009).

Nei mitocondri di molti organismi si possono distinguere diversi elementi strutturali: le *cristae sheet* sono composte da due “fogli” della membrana mitocondriale interna vicini tra loro, creando uno spazio sottile tra di essi; questi fogli sono delimitati da “tip” o “rim” (punta,

bordo) nel quale il doppio strato lipidico mostra una forte curvatura positiva; alla base, le *cristae* sono connesse alla IBM attraverso le *cristae junction* che hanno una complessa architettura tridimensionale. Alla base delle CJ (CJ base), dove si aprono nella IBM, la membrana presenta una curvatura negativa; questa è seguita da una regione tubulare stretta (CJ neck) con una curvatura positiva; infine, la struttura diventa più ampia ed è caratterizzata sia da una curvatura positiva che negativa (figura A.24).

Secondo il modello di Rabl e colleghi, Fcjl interferisce direttamente o indirettamente con l'oligomerizzazione dell'ATP sintasi e quindi favorisce la curvatura negativa della membrana e in questo modo Fcjl controlla la formazione della base delle *cristae junction*. Mentre nelle regioni dove l'oligomerizzazione non è contrastata, gli oligomeri, che si formano grazie alle subunità e e g, impongono una curvatura positiva della membrana e in questo modo favoriscono la formazione delle *cristae tip*.

Quindi, in definitiva, potrebbe essere il rapporto tra Fcjl e Su e/Su g nelle varie regione delle *cristae* a determinare la forma delle *cristae* stesse. Infatti queste proteine sono preferenzialmente localizzate in regioni diverse: Fcjl è preferenzialmente localizzato nelle *cristae junction* (favorendo la curvatura negativa) e poco presente nella CJ neck, la regione che connette la base delle CJ con le *cristae sheet* (favorendo la curvatura positiva); mentre Su e/Su g sono particolarmente abbondanti nelle *cristae tip* (favorendo la curvatura positiva) e quasi assenti dalle *cristae junction* (favorendo la curvatura negativa). La regione delle *cristae sheet* sembra invece contenere entrambe Fcjl e Su e/Su g e per questo avrebbe una forma piana.

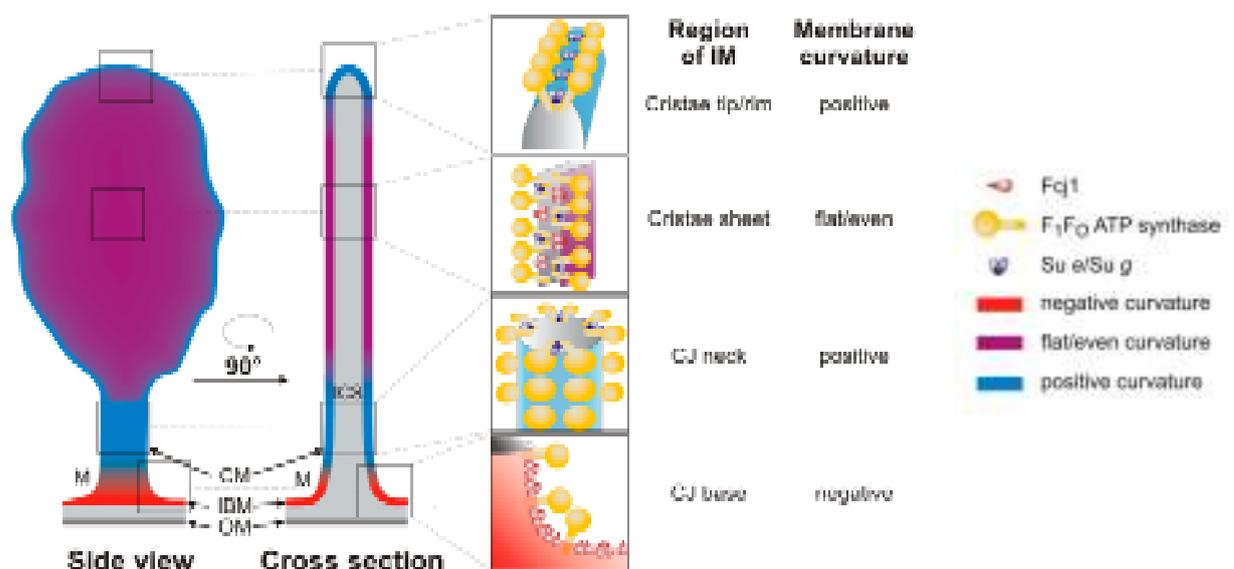


Figura A.24 Modello della formazione delle *cristae* e delle *cristae junction* nei mitocondri. Rappresentazione schematica della curvatura della membrana nelle diverse regioni della *cristae membrane* e sublocalizzazione delle proteine Fcjl e Su e/Su g. A sinistra vi è la rappresentazione delle *cristae* e affianco la sezione ruotata di 90°. (Da Rabl *et al.*, 2009)