

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE
XXIII CICLO

*Analisi funzionale in Saccharomyces cerevisiae delle
varianti missenso nei “tumor suppressor genes” SDH*

Coordinatore:

Prof. Nelson Marmioli

Docente guida

Prof.ssa Paola Goffrini

Tutor:

Prof.ssa Iliana Ferrero Fortunati

Dottoranda:

Elena Panizza

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 STRUTTURA E FUNZIONE DEL MITOCONDRIO: GENERALITÀ'.....	2
1.1.1 Il ciclo degli acidi carbossilici.....	4
1.1.2 La fosforilazione ossidativa.....	5
1.2 LE MALATTIE MITOCONDRIALI.....	8
1.2.1 Difetti OXPHOS e forme tumorali.....	10
1.3 BIOLOGIA E GENETICA DEI PARAGANGLIOMI.....	11
1.3.1 I geni di suscettibilità.....	12
1.3.2 I geni <i>SDH</i> come geni di suscettibilità.....	14
1.3.3 Mutazioni nei geni <i>SDH</i> e patologie correlate.....	16
1.4. IL COMPLESSO II O SUCCINATO DEIDROGENASI.....	20
1.4.1 La succinato deidrogenasi di lievito.....	21
1.5. DEFICIENZA SDH E ONCOGENESI: POSSIBILI MECCANISMI MOLECOLARI.....	26
1.6. IL LIEVITO COME MODELLO DI PATOLOGIE UMANE.....	30
1.6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> come modello di patologie associate a mutazioni della succinato deidrogenasi?.....	34
SCOPO DEL LAVORO.....	36
2. MATERIALI E METODI.....	37
2.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI.....	38
2.2 CEPPI BATTERICI UTILIZZATI.....	39
2.3 TERRENI DI CRESCITA.....	39
2.4 VETTORI PLASMIDICI.....	40
2.5 PCR.....	41
2.5.1 Amplificazioni standard.....	41
2.5.2 PCR da colonia.....	42
2.5.3 PRIMER.....	43
2.6 MUTAGENESI SITO SPECIFICA.....	44
2.6.1 PRIMER per la mutagenesi sito specifica dei geni <i>SDH2</i> , <i>SDH3</i> , <i>SDH4</i>	46
2.7 MANIPOLAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI.....	49
2.7.1 Digestione con endonucleasi di restrizione.....	49
2.7.2 Elettroforesi su gel ed escissione da banda.....	49
2.7.3 Purificazione e precipitazione del DNA.....	49
2.8 TRASFORMAZIONI.....	50
2.8.1 Trasformazione di <i>E.coli</i> mediante elettroporazione.....	50
2.8.2 Trasformazione di <i>S.cerevisiae</i> mediante LiAc.....	50
2.9 ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO.....	51
2.10 ESTRAZIONE RNA E NORTHERN BLOT.....	52
2.10.1 Estrazione RNA.....	52
2.10.2 Quantificazione RNA.....	53
2.10.3 Preparazione del gel per RNA.....	54
2.10.4 Northern Blot.....	54
2.10.5 ibridazione radioattiva mediante <i>Rediprime</i> TM DNA Labeling System.....	55
2.11 ANALISI FENOTIPICHE.....	56
2.11.1 Spot Assay.....	56
2.11.2 Analisi della mutabilità mitocondriale.....	56
2.11.3 Analisi dei citocromi respiratori.....	57
2.11.4 Analisi dell'attività respiratoria.....	57
2.11.5 Estrazione dei mitocondri.....	58

2.11.6 Quantificazione delle proteine (Metodo Bradford).....	59
2.11.7 Valutazione dell'attività dell'enzima Succinato Deidrogenasi (SDH).....	59
2.12 MISURAZIONE DEI LIVELLI DI OSSIDAZIONE INTRACELLULARE	61
2.13 COSTRUZIONE DEL DOPPIO MUTANTE BY4741 Δ <i>sdh4</i> Δ <i>ylri64w</i>	61

3. RISULTATI (I PARTE) **63**

3.1 ANALISI BIOCOMPUTAZIONALI	64
3.2 ANALISI FENOTIPICA DEI CEPPI BY4741 Δ <i>sdh2</i> e BY4741 Δ <i>sdh4</i>	66
3.2.1 Crescita ossidativa.....	66
3.2.2 Attività dell'enzima SDH	67
3.2.3 Funzionalità e struttura della catena respiratoria	67
3.3 COSTRUZIONE E ANALISI FENOTIPICHE DEL MUTANTE Δ <i>sdh3</i>	69
3.3.1 Costruzione del ceppo W303-1B Δ <i>sdh3</i>	69
3.3.2 Crescita ossidativa.....	70
3.3.3 Attività dell'enzima SDH	70
3.3.4 Funzionalità e struttura della catena respiratoria	71
3.4 CLONAGGIO DEI GENI <i>SDH2</i> , <i>SDH3</i> , <i>SDH4</i> E TRASFORMAZIONE DEI CEPPI MUTATI.....	72
3.5 CLONAGGIO DEI GENI <i>SDHB</i> E <i>SDHD</i> IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE PER LIEVITO E ANALISI DI COMPLEMENTAZIONE	73

4. RISULTATI (II PARTE)

STUDIO FUNZIONALE IN LIEVITO DI UNA NUOVA MUTAZIONE GERMINALE MISSENSO (C191Y)
DEL GENE *SDHB* DIAGNOSTICATA IN UN PAZIENTE AFFETTO DA TUMORE GLOMICO **77**

4.1 EFFETTO DELL'ALLELE MUTATO <i>sdh2</i> ^{C184Y} , EQUIVALENTE ALLA MUTAZIONE <i>hsdhb</i> ^{C191Y}	78
4.1.1 Crescita ossidativa.....	78
4.1.2 Analisi trascrizionale.....	79
4.1.3 Attività dell'enzima SDH, respirazione e contenuto dei citocromi respiratori nel mutante <i>sdh2</i> ^{C184Y}	80
4.1.4 Sensibilità allo stress ossidativo	81
4.1.5 Stabilità del DNA mitocondriale	83
4.1.6 Analisi in silico degli effetti della mutazione sulla conformazione dell'enzima	84
4.1.7 Discussione	85

5. RISULTATI (III PARTE)

IL LIEVITO COME MODELLO PER VALUTARE LA PATOGENICITÀ DI MUTAZIONI NEI GENI *SDHB*, *SDHC* e
SDHD NELLE SINDROMI PGL..... **86**

5.1 STUDI DI COMPLEMENTAZIONE IN LIEVITO DI VARIANTI ALLELICHE NEL GENE UMANO <i>SDHB</i>	87
5.1.1 Analisi <i>in silico</i> delle mutazioni nel gene <i>SDH2</i>	87
5.1.2 Costruzione degli alleli mutati <i>sdh2</i> e loro introduzione in <i>S.cerevisiae</i>	88
5.1.3 Crescita ossidativa e attività SDH	89
5.1.4 Funzionalità e struttura della catena respiratoria	92
5.1.5 Sensibilità allo stress ossidativo	94
5.1.6 Stabilità del DNA mitocondriale.....	95
5.1.7 Discussione	97
5.2 STUDI DI COMPLEMENTAZIONE IN LIEVITO DI VARIANTI ALLELICHE NEI GENI UMANI <i>SDHC</i> e <i>SDHD</i>	97
5.2.1 Analisi in silico delle mutazioni nei geni <i>SDH3</i> e <i>SDH4</i>	97
5.2.2 Costruzione degli alleli mutati <i>sdh3</i> e <i>sdh4</i> e loro introduzione in <i>S.cerevisiae</i>	99
5.2.3 Crescita ossidativa e attività SDH dei mutanti <i>sdh3</i> e <i>sdh4</i>	100
5.2.4 Sensibilità allo stress ossidativo	105

5.2.5 Stabilità del DNA mitocondriale	106
5.2.6 Discussione	107

6. RISULTATI (IV PARTE)

EFFETTI DI MUTAZIONI PUNTIFORMI SULLA CONFORMAZIONE DELL'ENZIMA SUCCINATO DEIDROGENASI DI LIEVITO	109
--	------------

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	115
----------------------------------	------------

1. Introduzione

I mitocondri, organelli citoplasmatici presenti nelle cellule eucariotiche, svolgono una grande varietà di processi metabolici essenziali (vedi paragrafo 1.1). Oltre alla riossidazione del NADH e alla produzione di ATP mediante la fosforilazione ossidativa (OXPHOS), i mitocondri sono sede di diverse reazioni metaboliche importantissime tra cui il ciclo degli acidi tricarbossilici (o ciclo di Krebs), la biosintesi dell'eme, la β -ossidazione degli acidi grassi, il metabolismo degli aminoacidi, la sintesi dei cluster Fe/S e, nelle cellule di mammifero, lo stoccaggio del calcio. Pertanto alterazioni della funzionalità mitocondriale, in particolare anomalie della via finale del metabolismo energetico cioè il sistema OXPHOS, sono causa di un gruppo eterogeneo di sindromi cliniche: le malattie mitocondriali (Zeviani and Carelli, 2007). Dal momento che il genoma nucleare e quello mitocondriale cooperano alla biogenesi del mitocondrio tali patologie possono verificarsi in associazione a mutazioni in ognuno dei due genomi (vedi paragrafo 1.2). Studi compiuti negli ultimi dieci anni hanno inoltre dimostrato che alcuni geni che codificano per proteine OXPHOS agiscono come “*tumor suppressor*” in quanto mutazioni a loro carico predispongono all’insorgenza di forme tumorali estendendo a nuovi fenotipi la definizione di malattie mitocondriali.

1.1 STRUTTURA E FUNZIONE DEL MITOCONDRIO: GENERALITA'

I mitocondri sono organelli di forma ellissoidale, generalmente con un diametro di 0,2-1 μm e una lunghezza di 1-4 μm circondati da una doppia membrana, la membrana mitocondriale esterna (OMM) e quella interna (IMM). Lo spazio compreso tra le due membrane è chiamato spazio intermembrana (IMS), mentre lo spazio racchiuso dalla membrana interna è la matrice mitocondriale.

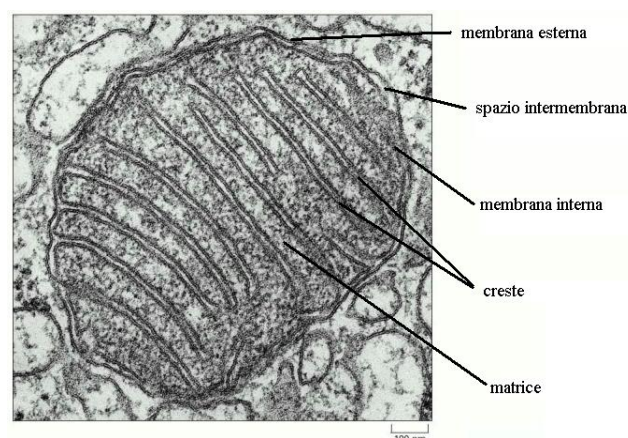


Fig. 1.1: Immagine al microscopio elettronico di un singolo mitocondrio di epatocita.

La membrana mitocondriale esterna 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 interna, priva di

colesterolo e ricca di un fosfolipide caratteristico, la cardiolipina, ha una permeabilità molto limitata, può essere attraversata quindi da molecole per le quali esistono trasportatori specifici (Scheffler *et al.*, 1999). Queste caratteristiche di permeabilità consentono la formazione di gradienti ionici attraverso questa barriera e la separazione delle funzioni metaboliche tra citoplasma e mitocondrio. La membrana mitocondriale interna si organizza in una serie di invaginazioni verso la matrice che prendono il nome di *cristae*, dove si concentrano la maggior parte degli enzimi respiratori. L'organizzazione in *cristae* ha l'effetto di aumentare la superficie della membrana interna e di ottimizzare i processi di produzione di energia.

I mitocondri sono organelli incredibilmente dinamici (Dimmer *et al.*, 2002): la loro morfologia e distribuzione riflettono la richiesta energetica della cellula (Bereiter-Hahn and Voth 1994; Warren and Wickner, 1996; Hermann and Shaw, 1998; Yaffe, 1999). Anche il numero di mitocondri per cellula è estremamente variabile, a seconda della specie e del tessuto presi in considerazione. Ad esempio nel muscolo e nel fegato dei mammiferi, dove la respirazione cellulare è intensa, sono presenti molti più mitocondri che in altri tessuti.

Una caratteristica peculiare dei mitocondri consiste nella presenza di un proprio genoma, DNA mitocondriale, o mtDNA. Ogni mitocondrio contiene più copie di mtDNA, il cui numero varia al variare 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, ma alcuni eucarioti inferiori posseggono un mtDNA di tipo lineare. Per quanto concerne l'organizzazione fisica dell'mtDNA, esso, al contrario del DNA nucleare, non è legato da istoni. Il DNA non è tuttavia "nudo", ma è legato da molteplici proteine (solubili e di membrana) che insieme al DNA, costituiscono una struttura dinamica chiamata nucleoide (Kaufman *et al.*, 2000; Meeusen *et al.*, 1999; Miyakawa *et al.*, 1987; Garrido *et al.*, 2003; Bogenhagen *et al.*, 2003; Chen and Butow, 2005).

Il mtDNA umano, che viene ereditato per via materna, codifica solo per 13 degli 85 polipeptidi che sono parte dei complessi della catena respiratoria, per 2 RNA ribosomali e 22 tRNA, richiesti per l'apparato traduzionale mitocondriale, che è solo parzialmente autonomo. Tutte le altre proteine coinvolte nella catena respiratoria e nei *pathway* mitocondriali sono a codificazione nucleare e importate nei mitocondri (Neupert *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007).

I principali *pathway* metabolici che hanno sede nel mitocondrio sono la degradazione ossidativa del piruvato e degli acili provenienti dalla degradazione degli acidi grassi, nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA o Ciclo di Krebs), e la fosforilazione ossidativa. La funzione essenziale del mitocondrio consiste nell'assorbimento dal citoplasma di substrati del metabolismo energetico (piruvato, acidi grassi, etc.) e nella loro trasformazione a H₂O e CO₂ con produzione della maggior parte dell'ATP di cui la cellula ha bisogno.

1.1.1 IL 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) che può derivare dalla degradazione degli zuccheri o degli acidi grassi. Gli enzimi che catalizzano la degradazione ossidativa degli zuccheri e degli acidi grassi sono situati nella matrice mitocondriale; questi enzimi rilasciano energia immagazzinata sotto forma di ATP. Gli zuccheri, vengono dapprima degradati a piruvato mediante glicolisi, i cui enzimi sono situati nel citoplasma. Il piruvato viene quindi importato nel mitocondrio, dove subisce una reazione di decarbossilazione ossidativa, ad acetil-coenzima A (Acetil-CoA) (Ochoa *et al.*, 1954; Perham *et al.*, 2000). Gli acidi grassi, che negli eucarioti superiori derivano principalmente dal processo di mobilizzazione dei trigliceridi, vengono importati nella matrice mitocondriale mediante il sistema di trasporto dell'acilcarnitina. Nella matrice mitocondriale, gli acidi grassi vengono convertiti ad acil-coenzima A e successivamente tali molecole subiscono il processo della β -ossidazione, costituito da cicli di quattro reazioni al termine di ciascuno dei quali è rilasciata una molecola di acetil-CoA più una molecola di acil-coenzima A con due atomi di carbonio in meno. Mentre negli eucarioti superiori la β -ossidazione avviene prevalentemente nei mitocondri, nel lievito la degradazione degli acidi grassi a gruppo acetile avviene prevalentemente nei perossisomi. Solo successivamente i gruppi acetile vengono trasportati, attraverso il sistema acetil-carnitina, nei mitocondri. L'acetil-CoA viene successivamente ossidato ad anidride carbonica attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici, o TCA, o ciclo di Krebs. Tale pathway metabolico, che ha sede nella matrice mitocondriale, è composto da otto reazioni attraverso le quali ogni molecola di acetil-CoA, viene convertita a due molecole di CO_2 , generando una molecola di ATP, tre molecole di NADH e una molecola di FADH_2 . La maggior parte dell'energia rilasciata viene pertanto immagazzinata sotto forma di potere riducente. E' importante sottolineare che il ciclo di Krebs non è fondamentale solo per il metabolismo ossidativo, ma fornisce anche sostanze, quali ad esempio l'ossalacetato e l' α -chetoglutarato, fondamentali per la sintesi degli aminoacidi.

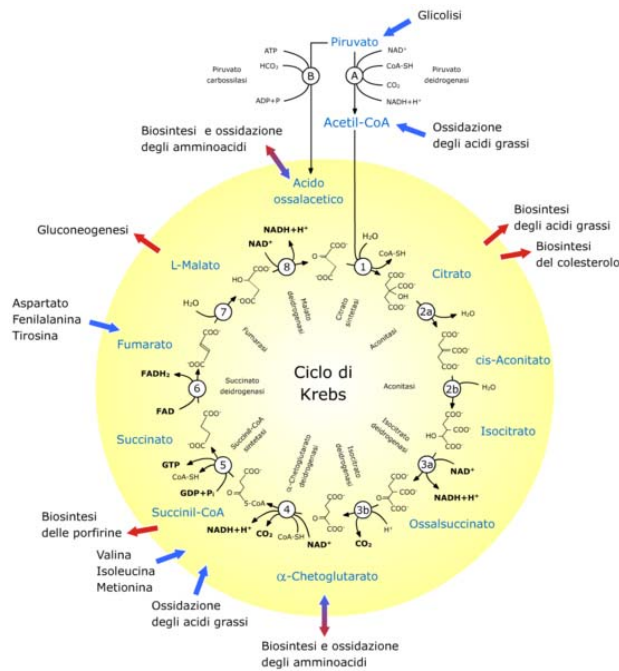


Fig. 1.2: Rappresentazione schematica del ciclo di Krebs.

1.1.2 LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

La fosforilazione ossidativa è il principale meccanismo attraverso il quale gli organismi aerobi convertono l'energia derivante dalla degradazione ossidativa delle sostanze organiche in ATP. La produzione di ATP nei mitocondri è accoppiata all'ossidazione del NADH e del FADH_2 e alla riduzione dell'ossigeno ad acqua all'interno della catena respiratoria. L'energia generata dall'ossidazione nella catena respiratoria è convertita in un gradiente protonico tra la matrice e lo spazio intermembrana. Il gradiente protonico è una forma di energia potenziale generata dalla catena respiratoria e trasformata in una forma di energia spendibile dall'organismo, l'ATP.

La catena respiratoria mitocondriale è costituita da cinque complessi multiproteici, situati nella membrana interna che subiscono cicli sequenziali di riduzione-ossidazione. L'accettore finale di questa catena di trasporto è l'ossigeno che viene ridotto ad acqua. Il trasporto degli elettroni è accoppiato all'espulsione nello spazio intermembrana di protoni che generano un gradiente elettrochimico basato sulla differente concentrazione di H^+ e differenza di carica a cavallo della membrana interna. Questo gradiente viene dissipato a livello di un quinto complesso proteico, detto ATP sintetasi, che accoppia il rientro di protoni nella matrice con la sintesi di ATP a partire da ADP e fosfato inorganico.

Una coppia di elettroni, derivante dal NADH, è in grado di rilasciare un quantitativo di energia sufficiente a produrre 3 molecole di ATP, mentre da una coppia elettronica ottenuta dal FADH_2 si ottengono 2 molecole. L'insieme della glicolisi e della fosforilazione ossidativa permettono di

ottenere ben 38 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio utilizzato (anche se questo valore può anche variare a seconda del rapporto $[ATP]/[ADP]$ intracellulare). In particolare, gli elettroni vengono trasportati secondo gradiente attraverso dei trasportatori che accettano ciclicamente elettroni, riducendosi, da un trasportatore con un potenziale di riduzione minore e cedono elettroni, ossidandosi, ad un trasportatore con un potenziale di riduzione maggiore.

Le classi di trasportatori presenti nella catena di trasporto mitocondriale sono:

- centri ferro-zolfo (Fe-S): rappresentano i gruppi prostetici delle proteine ferro-zolfo, 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 gli atomi di ferro che, ciclicamente, accettano un elettrone riducendosi a ione ferroso (Fe^{2+}) e cedono l'elettrone riossidandosi a ione ferrico (Fe^{3+});
- citocromi respiratori: sono proteine complessate ad una molecola di tipo eme, che conferisce 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 d'assorbimento a 560 nm; citocromo c, con un picco d'assorbimento a 550 nm. Nei citocromi, i veri trasportatori di elettroni sono i gruppi eme, di cui fa parte uno ione Fe^{2+} e, nel caso dei citocromi a, anche uno ione Cu^+ ;
- ubiquinone, o coenzima Q: è una molecola a struttura chinonica che, a differenza degli altri trasportatori, non è complessato 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 esterna. 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).

La maggior parte dei trasportatori non è costituito da proteine isolate, ma forma dei complessi multiproteici che sono legati alla membrana interna, sono i complessi respiratori, ognuno dei quali è in grado di catalizzare il trasferimento degli elettroni attraverso una porzione di membrana. L'insieme di questi complessi respiratori prende il nome di catena respiratoria mitocondriale:

- Complesso I (o NADH-coenzima Q reduttasi, o NADH deidrogenasi): contiene 30 polipeptidi diversi e catalizza il trasferimento di due elettroni dal NADH al coenzima Q. Esso è costituito da una proteina a cui è legato un gruppo prostetico costituito da flavin

- mononucleotide (FMN), che ciclicamente accetta elettroni e protoni dal NADH e cede gli elettroni ai centri ferro-zolfo;
- Complesso II (o succinato-coenzima Q reduttasi o succinato deidrogenasi): catalizza il trasferimento di due elettroni dal succinato al coenzima Q. Esso è l'unico complesso che funge anche da enzima del ciclo di Krebs, in quanto catalizza l'ossidazione del succinato a fumarato. In questo caso l'accettore di protoni e di elettroni è il FAD, che si riduce a FADH₂ e che si riossida a FAD cedendo due elettroni al coenzima Q, attraverso i centri ferro-solfo presenti nel complesso. Il coenzima Q diffondendo liberamente attraverso la membrana mitocondriale interna, trasferisce elettroni al complesso III;
 - Complesso III (o citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi): contiene 10 polipeptidi, gruppi eme e un centro ferro-zolfo; catalizza il trasferimento di elettroni dal coenzima Q al citocromo c. Il trasferimento avviene, nell'ordine, attraverso i citocromi b (b₅₆₂ e b₅₆₆), i centri ferro-zolfo e il citocromo c₁. Il citocromo c si distingue dagli altri citocromi in quanto non fa parte di complessi: esso infatti si comporta come proteina debolmente ancorata alla membrana interna, in grado di diffondere lungo la parte esterna della membrana.
 - Complesso IV (o citocromo c ossidasi): contiene 13 polipeptidi e catalizza il trasferimento di elettroni dal citocromo c all'accettore finale, l'ossigeno. Esso è costituito dai citocromi a e a₃, oltre che da atomi di rame (Cu_B e centro Cu_A);
 - Complesso V (o ATP sintasi): non è un complesso respiratorio, ma un complesso che sintetizza ATP grazie all'energia rilasciata durante il trasporto di elettroni dalle molecole ridotte all'ossigeno. Il trasporto di elettroni si accompagna infatti ad un pompaggio di protoni attraverso la membrana interna, dalla matrice allo spazio intermembrana, tramite i complessi respiratori: questo pompaggio crea un gradiente di protoni attraverso la membrana, che fornisce l'energia per la sintesi di ATP. La dissipazione di questo gradiente, attraverso il complesso V, permette la sintesi di ATP a partire da ADP e fosfato inorganico. 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 i trasportatori della membrana interna.

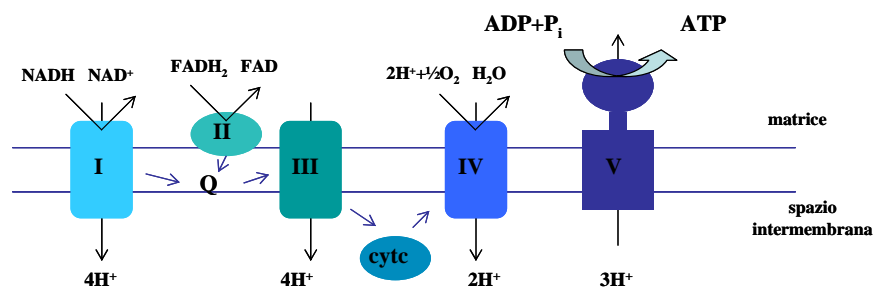


Fig. 1.3: Complessi enzimatici del sistema OXPHOS mitocondriale. I: NADH-coenzima Q reduttasi; II: succinato-coenzima Q reduttasi; III: citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi; IV: citocromo c ossidasi; V: ATP sintasi; Q: coenzima Q; cytc: citocromo c. Le frecce blu rappresentano gli elettroni.

La catena respiratoria mitocondriale è un sistema conservato tra gli organismi eucariotici. Al contrario di quanto si osserva nell'uomo, nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* manca il complesso I e vi è un unico gene che codifica la NADH deidrogenasi.

Per l'assemblaggio e il mantenimento dei complessi respiratori attivi sono necessari una serie di fattori accessori. Il loro assemblaggio, infatti, pone un difficile problema per le cellule eucariotiche, i complessi I, III, IV e V contengono sub-unità codificate dai due genomi quello nucleare e quello mitocondriale, quindi è richiesto un coordinamento tra la sintesi e l'assemblaggio. Di conseguenza nella cellula ci sono un gran numero di proteine dedicate all'assemblaggio di questi complessi. L'analisi genetica di mutanti respiratorio deficienti di lievito ha portato all'identificazione di una serie di fattori di assemblaggio o *chaperones* necessari per la biogenesi dei complessi respiratori. Sono state infatti identificate numerose proteine *helper* che assicurano l'assemblaggio post-traduzionale dei complessi della catena respiratoria senza essere parte essi stessi di tali complessi. Questi fattori includono enzimi coinvolti nella sintesi dei gruppi prostetici, proteine che mediano l'inserzione delle sub-unità respiratorie all'interno della membrana e potenziali *chaperones* che facilitano l'assemblaggio dei complessi (Fontanesi *et al.*, 2008; Barrientos *et al.*, 2009; Lenaz *et al.*, 2010). Per quanto riguarda il complesso II, nonostante si abbiano numerose conoscenze sulla struttura e sulla funzione catalitica, solo recentemente sono state identificate e descritte due proteine coinvolte specificatamente nell'assemblaggio di tale complesso (Ghezzi *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2009).

1.2 LE MALATTIE MITOCONDRIALI

Il deficit energetico del metabolismo mitocondriale nell'uomo accomuna un gruppo eterogeneo di sindromi cliniche: le malattie mitocondriali (Zeviani and Carelli, 2007). Nonostante il mitocondrio sia sede di varie vie metaboliche fondamentali, per malattie mitocondriali in senso stretto si intende un vasto gruppo di fenotipi clinici caratterizzati da un deficit di fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Le patologie mitocondriali hanno tipicamente un decorso progressivo e comprendono un ampio spettro di fenotipi clinici, associati all'insufficienza della fosforilazione ossidativa, che ne rendono difficile e complessa la diagnosi. I tessuti maggiormente colpiti sono quelli con una più alta richiesta energetica e quindi più dipendenti dal metabolismo ossidativo, quali il tessuto nervoso, il tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, ma anche i reni, il fegato, il sistema endocrino e la retina (Land *et al.*, 2004). Di conseguenza i pazienti possono presentare, in varia combinazione e diverso grado di compromissione, degenerazione muscolare, cardiopatia, disordini dei movimenti, diabete mellito, deficit renale, demenza e vari sintomi oftalmologici (McKenzie *et al.*, 2003) possiamo pertanto affermare che sono stati identificati 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. Vi sono sintomi comuni a più patologie, mentre altri sono specifici di alcune patologie. Lo studio clinico delle patologie mitocondriali risulta particolarmente complesso; infatti mutazioni diverse possono causare sindromi simili e viceversa la medesima mutazione può portare, in soggetti diversi, a malattie differenti (Schon *et al*, 1997). Se da una parte devono esserci meccanismi comuni che spiegano perché i pazienti con mutazioni diverse possono avere un fenotipo clinico simile, dall'altra devono esserci meccanismi diversi per spiegare perché lo stesso difetto genetico può causare fenotipi clinici così differenti fra loro.

La classificazione delle patologie mitocondriali si basa principalmente sulla tipologia di ereditarietà. I difetti genetici possono riguardare il DNA mitocondriale (mtDNA) o il DNA nucleare: infatti il genoma mitocondriale codifica solamente per 13 proteine (8 nel lievito) ragione per cui i mitocondri sono dipendenti da processi extra-mitocondriali per la loro funzione e biogenesi. Le mutazioni in geni mitocondriali possono colpire tutte le copie di mtDNA in un individuo (omoplasma) oppure solo alcune copie (eteroplasma): in quest'ultimo caso c'è un livello soglia richiesto perché si abbia l'espressione di un difetto biochimico nelle singole cellule. In queste patologie il quadro ereditario sarà materno poiché ogni individuo riceve i mitocondri solo dalla madre: il difetto potrà essere quindi ereditato dai figli di una madre affetta ma non da quelli di un padre affetto, ma potrà anche insorgere spontaneamente (mutazioni sporadiche) in una famiglia.

Le mutazioni del mtDNA sono state a lungo considerate la causa predominante delle patologie mitocondriali ma oggi si sa che in più del 50% dei casi di queste malattie nell'adulto e più dell'80% dei casi di malattie nel bambino, sono causati da mutazioni a livello di geni nucleari. A causa dell'estrema complessità della fosforilazione ossidativa e della sua peculiare organizzazione genetica, il numero di geni potenzialmente coinvolto è molto elevato e tende a coincidere con il proteoma mitocondriale stesso (Calvo *et al*, 2006). Il quadro ereditario di questa classe di patologie sarà quello classico mendeliano.

E' stata proposta una classificazione genetico-clinica per le patologie mitocondriali (Leonard and Schapira, 2000; DiMauro and Schon, 2003; Zeviani *et al*, 2003), che possono essere determinate 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 del mtDNA.

In particolare mutazioni in geni nucleari che inibiscono il processo di fosforilazione ossidativa, o più in generale il metabolismo mitocondriale, causano patologie diverse, fra cui le più comuni sono la sindrome di Leigh, la sindrome di Barth, l'atassia di Freidreich e il paraganglioma ereditario.

1.2.1 DIFETTI OXPHOS E FORME TUMORALI

Da lungo tempo si pensa che difetti della funzionalità mitocondriale svolgano un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione del cancro. Quasi 80 anni fa lo scienziato Otto Warburg, avendo osservato che il metabolismo energetico delle cellule tumorali è differente da quello delle cellule normali, ipotizzò che il cancro fosse causato da un difetto del sistema OXPHOS che costringe le cellule a produrre energia attraverso la glicolisi nonostante le condizioni aerobiche (Warburg 1956; Maximo *et al.*, 1998; Modica-Napolitano *et al* 2004; Gottlieb *et al* 2005; Singh *et al* 2009). Questa caratteristica dei tumori è descritta come “effetto Warburg”. Nel corso degli ultimi anni l'effetto Warburg è stato rivalutato ed è oggetto di crescente interesse nella ricerca sul cancro (Gambhir *et al* 2002; Czarnecka *et al* 2006; Kaelin *et al* 2009). L'effetto Warburg giocherebbe un ruolo importante nello sviluppo del tumore rimodellando il profilo metabolico delle cellule tumorali, che ne permette la sopravvivenza in condizioni avverse. Da allora numerosi studi suggeriscono che il sistema OXPHOS sia gravemente compromesso nel cancro. Infatti il deficit di fosforilazione ossidativa è descritto come uno dei fenotipi più comuni della maggior parte dei tumori.

Inoltre la scoperta nell'ultimo decennio che geni che codificano per proteine OXPHOS agiscono come “*tumor suppressor*” ha rinnovato l'interesse per l'effetto Warburg. Mutazioni nei geni *SDH* sono state ritrovate in forme tumorali quali paragangliomi e feocromocitomi (vedi paragrafo 1.3.2) mentre mutazioni nel gene che codifica per l'enzima del ciclo di Krebs, fumarato idratasi (FH) portano a leiomiomi, fibromi uterini, carcinoma renale (Tomlinson *et al.*, 2002) associando per la prima volta gli enzimi mitocondriali e la loro disfunzione con la tumorigenesi. Oltre a mutazioni di tipo ereditario sono state trovate anche mutazioni somatiche o germinali in geni coinvolti nel metabolismo OXPHOS: mutazioni nel gene *NDUFA13/GRIM19*, essenziale per l'assemblaggio e l'attività del complesso I, sono associate a una particolare forma di tumore alla tiroide. Recentemente mutazioni nei geni per l'isocitrato deidrogenasi 1 and 2 (*IDH1* e *IDH2*) che catalizzano la conversione dell'isocitrato in α chetoglutarato sono state ritrovate in tumori al cervello (Vander Heiden *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009) e alla prostata.

Quanto sopra riportato assieme alle crescenti conoscenze relative al proteoma mitocondriale e alla scoperta di nuovi geni-malattia amplia i fenotipi clinici associati a difetti OXPHOS estendendo il concetto di malattia mitocondriale.

1.3 BIOLOGIA E GENETICA DEI PARAGANGLIOMI

Paraganglioma e feocromocitoma sono tumori del sistema nervoso autonomo (Neumann *et al* 2002; Baysal 2002; Boedeker *et al.*,2009). I paragangliomi (PGL) sono definiti come tumori extra-surrenali che originano dai gangli della catena del simpatico nel torace, nell'addome e nella pelvi. Come tali, sono tumori neuroendocrini e di derivazione dalla cresta neurale (formazione embrionale, di derivazione neuroectodermica, le cui cellule daranno origine ai diversi elementi costitutivi del sistema nervoso) e precisamente sia della parte che darà origine alla porzione simpatica (i cui gangli sono localizzati nell'addome e nel torace) che a quella parasimpatica (i cui gangli sono localizzati nella regione testa/collo HNPG, head and neck paraganglioma) del sistema nervoso autonomo. Insorgono a carico delle cellule del glomo, particolari cellule che fungono da punto di connessione tra diversi tipi di cellule nervose e da speciali chemiorecettori situati lungo i vasi sanguigni con un ruolo di regolazione della pressione sanguigna e del flusso del sangue. La maggior parte delle cellule del glomo è concentrata nel corpo carotideo che è localizzato a livello della biforcazione delle carotidi comuni. La localizzazione dei tumori extrasurrenali è soprattutto a livello addominale in corrispondenza dei gangli celiaci, mesenterici superiori e mesenterici inferiori. Solo il 10% circa è localizzato a livello toracico, l'1% nella vescica e meno del 3% nei distretti della testa e del collo dove si rinvengono in più di 20 sedi diverse: in maggior numero a livello della biforcazione carotidea, ma anche più raramente, nella fossetta giugulare, nella loggia tiroidea, nella cavità timpanica, a livello laringeo.

Analogamente ai paragangliomi, anche i feocromocitomi (PH) sono tumori di derivazione dalla cresta neurale, ma il tessuto da cui derivano è parte di quello che darà origine alla porzione ortosimpatica del sistema nervoso autonomo. Le cellule neoplastiche che caratterizzano questa forma tumorale derivano da particolari cellule chiamate cellule cromaffini localizzate prevalentemente nella ghiandola surrenalica (midollare del surrene). Dal punto di vista citologico, le cellule della midollare hanno un citoplasma che contiene granuli di catecolamine, cui è dovuta la caratteristica reazione cromaffine che il citoplasma stesso presenta, ovverossia la capacità di colorarsi in bruno in presenza di sali di cromo. La funzione fisiologica della midollare del surrene è di secernere catecolamine (dopamina, adrenalina e noradrenalina) che aiutano l'organismo a far fronte a sollecitazioni quali il freddo, l'ipoglicemia, ipossia. Queste molecole sono importanti nella tonicità dei vasi e quindi il feocromocitoma può portare a ipertensione arteriosa, aritmie cardiache e diaforesi (sudorazione eccessiva). Sia le cellule normali che le cellule neoplastiche della midollare del surrene rispondono in modo diretto all'ipossia. Circa nell'85% dei soggetti adulti il feocromocitoma deriva dalle cellule cromaffini della midollare del surrene e la restante percentuale origina dalle cellule cromaffini localizzate a livello addominale, pelvico e raramente a livello del collo e del torace.

Sia i paragangliomi della testa e del collo che quelli addominali sono estremamente rari. I paragangliomi sono di solito tumori benigni a crescita lenta la cui incidenza nella popolazione è 1:30.000-1:100.000. E' disponibile, quindi, una quantità limitata di dati sulla popolazione per ottenere una stima attendibile dell'incidenza annuale del paraganglioma. Complica ulteriormente la valutazione della reale incidenza l'aumento della frequenza di HNPGL tra gli abitanti di alta quota. Lo sviluppo, infatti, di HNPGL sembra essere 10 volte più alta tra gli abitanti delle montagne andine. I fattori di rischio noti per la formazione di paragangliomi della testa e del collo includono condizioni associate all'ipossia cronica come malattie respiratorie o cardiache croniche con ipossemia arteriosa e vivere ad alta quota. Tuttavia è nota una predisposizione genetica sulla base di una positività famigliare all'insorgenza del tumore, la percentuale di tumori causati da predisposizione ereditaria è all'incirca del 35%. È stato dimostrato oltre quarant'anni fa (Arias-Stella *et al.*,1969) che gli esseri umani e, varie altre specie di mammiferi, abitanti zone ad alta quota sviluppano una iperplasia del corpo carotideo e tumori benigni. L'osservazione che il principale organo di oxygen-sensing del corpo potrebbe dare origine a tumori in condizioni di scarsità di ossigeno è stata la prima indicazione che l'ossigeno potrebbe agire come modificatore ambientale della tumorigenesi. Ad alta quota il paraganglioma ha un'incidenza fino a 1 su 10 negli essere umani (e 1 su 2 nei bovini) e i tumori in condizioni di scarsità di ossigeno hanno una crescita alterata. In un recente lavoro (Cerecer-Gil *et al.*, 2010) è stato riportato il caso di una paziente affetta da paraganglioma della testa e del collo in cui la predisposizione genetica è la spiegazione principale per la formazione del tumore, ma la modalità di crescita di questo e il tempo di comparsa di una recidiva, dopo la prima operazione, indica che deve esserci un ruolo dell'altitudine sullo sviluppo del tumore.

1.3.1 I GENI DI SUSCETTIBILITÀ

A differenza della maggior parte dei paragangliomi che si possono considerare sporadici o "non-syndromic" alcune famiglie hanno ereditato una predisposizione a sviluppare paragangliomi della testa e del collo e feocromocitomi. Questi pazienti spesso sviluppano paragangliomi multipli, bilaterali e talvolta maligni. Questi tumori si possono presentare anche in giovane età e solitamente i pazienti si definiscono affetti da "*paraganglioma-pheochromocytoma associated syndrome*" (delle sindromi associate a paraganglioma e feocromocitoma). L'insorgenza del quadro clinico di paragangliomi o feocromocitomi è compresa in 4 differenti sindromi: quella di Von Hippel Lindau, dovuta a mutazione del gene onco-soppressore *VHL*, la MEN 2 (multiple endocrine neoplasia type2), causata dalla mutazione del proto-oncogene *RET*, la neurofibromatosi di tipo 1 legata alla mutazione del gene *NF1* e le sindromi da paraganglioma famigliare (PGL) associate a mutazioni nei geni che codificano per l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (Neumann *et*

al., 2002; Opocher *et al.*, 2010). Sono tutte malattie rare ereditarie, caratterizzate da mutazioni germinali del gene di suscettibilità corrispondente. Generalmente si tratta di famiglie con diversi membri affetti dalla patologia, tuttavia in casi apparentemente isolati di feocromocitoma o paragangliomi sono stati identificate mutazioni germinali.

I pazienti con mutazioni germinali nel gene *VHL* sono ad alto rischio per lo sviluppo di emangioblastoma del sistema nervoso centrale e della retina, tumore delle cellule chiare del rene e feocromocitoma. Il gene *VHL* si trova sul cromosoma 3p25-26 e è mutato in quasi il 100% dei pazienti che presentano il quadro clinico della sindrome di Von Hippel Lindau. Le mutazioni in *VHL* possono essere mutazioni missenso, non senso, mutazioni nei siti di splicing, piccole o estese delezioni. Dall'analisi del gene *VHL* in emangioblastomi e nelle cellule tumorali del rene è stato rilevato un'inattivazione di entrambi gli alleli di questo gene in questi tumori. In tutti i casi il gene wild-type è deletato o silenziato con ipermetilazione mentre il secondo allele porta la mutazione. Questo evento di inattivazione dell'allele wild-type è un evento precoce nella crescita dei tumori. La perdita di funzione del gene *VHL* porta ad una stabilizzazione costitutiva del fattore HIF (ipoxia-inducibile factor). La Proteina *VHL* non funzionante è collegata a una disregolazione della trascrizione del fattore HIF, con conseguente over-espressione di diversi polipeptidi indotti da ipossia., come fattori pro-angiogenici e fattori di crescita (come il fattore di crescita vascolare endoteliale VEGF) e fattori di crescita di tumori, fattori necessari per sostenere un aumento del metabolismo del tumore.

Le caratteristiche cliniche della malattia MEN2 comprendono carcinoma midollare della tiroide, feocromocitoma, iperparatiroidismo, anomalie dello sviluppo. La predisposizione allo sviluppo della MEN2 è causata da mutazioni della linea germinale del protooncogene *RET* che si trova sul cromosoma 10q11.2 il protooncogene *RET* comprende 21 esoni, ma la predisposizione alla malattia è ristretta a mutazioni negli esoni 10, 11, 13 e 16. La suscettibilità tessuto specifica può essere spiegata con la regolazione del gene *RET*. I massimi livelli di espressione di questo protooncogene sono stati osservati nei primi mesi di sviluppo del rene e nei tessuti derivati della cresta neurale, come i nervi periferici e le cellule di tipo C della tiroide e delle ghiandole surrenali. Il gene codifica per un singolo recettore trans membrana tirosina chinasi e la sua attivazione innesca una cascata di interazioni tra proteine intracellulari con conseguente proliferazione cellulare, differenziamento e aumento della motilità cellulare.

Circa l'1% dei pazienti a cui è diagnosticato un feocromocitoma possono essere affetti da neurofibromatosi di tipo 1, una malattia ereditaria dominante a penetranza completa, ma a espressività altamente variabile. La neurofibromatosi di tipo 1 è causata da una mutazione germinale del gene *NF1*, che è localizzato nel cromosoma 17q11.2. Mutazioni germinali in *NF1* causano perdita di eterozigosità, quindi perdita dell'allele wild type, soprattutto nei casi di

mutazioni in *NF1* associate a neurofibromatosi. Il gene *NF1* codifica per la neurofibromina, una proteina di all'incirca 317kDa, localizzata in diversi compartimenti intracellulari come il reticolo endoplasmatico, i microtuboli e i mitocondri. Nei tessuti di circa il 70% dei pazienti è stata ritrovata una forma tronca di questa proteina.

Molto recentemente, utilizzando diverse, strategie genomiche è stato trovato un nuovo locus di suscettibilità in individui affetti da feocromocitoma nel cromosoma 2q11, che inizialmente è stato chiamato FP (*familial pheochromocytoma*) (Qin *et al.*, 2010). Il locus è stato successivamente identificato come una regione che contiene 205 geni e sequenziando il DNA di una cellula tumorale è stata individuata una mutazione che causa una variazione del sito di *splicing* prossimale al gene *TMEM127*, che codifica per una putativa proteina transmembrana. *TMEM127* è una proteina altamente conservata, con tre regioni trans-membrana ma non si conoscono domini funzionali. La proteina si trova sia nella membrana plasmatica sia nel citoplasma e questa osservazione ha suggerito che *TMEM127* possa partecipare al traffico di proteine tra la membrana plasmatica, il Golgi e i lisosomi. È stato quindi sequenziato il DNA di cellule tumorali o di geni della linea germinale di 102 pazienti affetti da feocromocitoma, di cui 19 con una chiara storia familiare e 83 apparenti casi sporadici. Sono state individuate sette mutazioni nel gene *TMEM127* sono varianti dei siti di *splicing* o mutazioni non senso, che comportano un'interruzione prematura della sintesi della proteina, con formazione di una proteina tronca, indicando che il gene *TMEM127* è un gene *tumor suppressor*. In totale sono state descritte quattro varianti del gene *TMEM127* in 12 famiglie e tre mutazioni sono state trovate associate a casi sporadici di feocromocitoma, in tutti i casi non si erano trovate mutazioni negli altri geni di suscettibilità.

1.3.2 I GENI *SDH* COME GENI DI SUSCETTIBILITA'

Il 2000 rappresenta una tappa fondamentale nello studio della genetica delle sindromi associate a paragangliomi e feocromocitomi; infatti sono stati scoperti come responsabili dell'insorgenza della patologia i geni che codificano per l'enzima succinato deidrogenasi (SDH) (Baysal *et al.*, 2000; Baysal *et al.*, 2002; Neumann 2002; Benn *et al.*, 2003; Neumann *et al.*, 2004 Schiavi *et al.*,2006). In particolare, diversi studi sulla predisposizione ereditaria alla formazione di tumori della testa e del collo ha portato alla scoperta della “*familial paraganglioma syndrome*” causata da mutazioni germinali in *SDHD* (PGL1), *SDHC* (PGL3), *SDHB* (PGL4) e solo di recente *SDHAF2* (PGL2) (Hao *et al* 2009). Tali geni si comportano pertanto come *tumour suppressor* per i tumori di derivazione cresta neurale. Mutazioni germinali nei geni *SDH* sono responsabili del 6% dei paragangliomi sporadici e del 9% dei feocromocitomi, del 29% dei casi pediatrici e del 38% dei tumori maligni e di oltre l'80% dei paragangliomi e dei feocromocitomi familiari. L'analisi

genetica ha permesso l'identificazione di tre loci causa della predisposizione ereditaria alla comparsa di paragangliomi soprattutto della testa e del collo. Questi loci sono mappati sul cromosoma 11 e 1 e sono nominati PGL1 su 11q23, PGL3 su 1q21-23 e PGL4 su 1p36e corrispondono rispettivamente ai geni che codificano per le sub-unità D,C e B del complesso SDH. Considerando le varie mutazioni che coinvolgono i geni del complesso SDH, la predisposizione ereditaria al cancro è a trasmissione autosomica dominante con una penetranza incompleta ed età dipendente (Van der Mey *et al.*, 1989). Inoltre per il gene *SDHD*, localizzato sul cromosoma 11q, la malattia si osserva quasi esclusivamente quando la mutazione è trasmessa dal padre, è stato quindi ipotizzato un imprinting genomico dell'allele materno, ovvero se la mutazione è ereditata per via materna non si ha evidenza clinica di malattia, che si presenta invece qualora la mutazione sia trasmessa per via paterna. Infatti, i figli di padri affetti da tumore lo sviluppano a loro volta, questo non succede quando affetta da tumore è la madre. Potrebbe avvenire una modificazione epigenetica, come la metilazione di isole CpG sui cromosomi dei genitori potrebbe conferire una reversibile differenza sui cromosomi materno e paterno durante la gametogenesi, ma sono pochi i dati che provano questo imprinting materno, mentre si osserva in molti casi una perdita di eterozigotità LOH (*loss-of-heterozygosity*) nel tessuto tumorale (Gimenez-Roqueplo *et al* 2003), coerente con l'ipotesi classica del “*two-hit*” di Knudson per l'induzione della formazione di tumori (Knudson 1986). Da semplici analisi di perdita di eterozigotità o squilibrio allelico, la cancellazione somatica dell'allele wild-type è presente in almeno il 78,5% di tumori correlati a mutazioni in *SDHD* e al 60% di tumori correlati a *SDHB* e in tutti i tumori correlati a mutazioni germinali in *SDHC* (Pasini *et al.*, 2009). Come possibile “*two-hit*” non è stata trovata nessuna mutazione puntiforme somatica o ipermetilazione del promotore dei geni *SDHx*. La soppressione nelle cellule somatiche dell'allele wild-type *SDH* sembra quindi il preferenziale “*two-hit*” e questa osservazione può suggerire la necessità della perdita concomitante del vicino gene *tumor suppressor*. Mutazioni germinali in *SDHD*, infatti, sembrano associate alla perdita del cromosoma 11 che implica la concomitante perdita del materno TSG (*tumor suppressor gene*) espresso sul cromosoma 11p15.5 e forse di un altro TSG sul braccio lungo e corto dello stesso cromosoma. La perdita di tutto il cromosoma 11 materno potrebbe spiegare la penetranza quasi completa delle mutazioni germinali in *SDHD* a trasmissione paterna (Hensen *et al.* 2004). Una mutazione germinale eterozigote in un gene *SDHx* di solito, quindi, è associata a perdita dell'allele non mutato nel tumore, si ha la perdita di eterozigotità nella cellula tumorale, coerentemente con l'ipotesi di Knudson che la tumorigenesi sia associata a un secondo hit che coinvolga geni *tumor-suppressor* (Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2003).

In alcuni paragangliomi associati a mutazioni in *SDHB*, *C* e *D* è stata dimostrata una completa perdita dell'attività enzimatica della succinato deidrogenasi e una attivazione della via ipossico-

angiogenico tramite l'attivazione del fattore HIF1- α , fattore di trascrizione inducibile da ipossia e dei suoi geni bersaglio come *VEGF*, che codifica per un fattore di crescita vascolare endoteliale (Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2001, Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2002). La connessione tra PGL2 e mutazioni in *SDHAF2* è una scoperta molto recente e le caratteristiche cliniche dei tumori associati con questa mutazione devono ancora essere indagate a fondo, fin ora i tumori isolati sono paragangliomi della testa e del collo (Hao *et al.*, 2009).

Il 10% dei pazienti affetti da paraganglioma la comparsa del tumore è dovuta alla sindrome familiare da paraganglioma, quindi a mutazioni nei geni della succinato deidrogenasi (Martin *et al.*, 2007). Al 30% degli individui con mutazioni in nei geni della succinato deidrogenasi l'insorgenza del tumore è all'incirca intorno ai 30 anni e il restante 70% svilupperà il tumore entro gli 80 anni (Ricketts *et al.*, 2009 Timmers *et al.*, 2009).

1.3.3 MUTAZIONI NEI GENI *SDH* E PATOLOGIE CORRELATE

Mutazioni nelle diverse sub-unità della succinato deidrogenasi portano a patologie diverse. Mutazioni germinali nel gene *SDHA* causano una patologia neurodegenerativa infantile, mentre mutazioni in *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* causano una predisposizione genetica alla formazione di paragangliomi o feocromocitomi. Anche mutazioni nei geni che codificano per i fattori di assemblaggio specifici per la succinato deidrogenasi sono associate a patologie diverse. Mutazioni nel gene *SDHAF1* causano una malattia neurodegenerativa, la leucoencefalopatia infantile progressiva; mentre mutazioni in *SDH5* (*SDHAF2*) sono state associate a forme tumorali.

SDHA Bourgeron nel 1995 descrisse per primo, in due fratelli affetti dalla sindrome di Leigh, una mutazione omozigote nel gene nucleare *SDHA*, che codifica per la sub-unità flavoproteica della succinato deidrogenasi, come responsabile del deficit del complesso II della catena mitocondriale e responsabile della comparsa della malattia. I genitori di questi bambini erano cugini di primo grado ed erano eterozigoti per la mutazione in *SDHA*, che era assente nei 120 controlli. Questo caso è stato importante perché per la prima volta una mutazione in un gene nucleare è stata trovata come causa di un deficit nella catena respiratoria. Molti anni dopo sono stati trovati altri pazienti affetti dalla sindrome di Leigh con deficit nella succinato deidrogenasi (Parfait *et al.*, 2000, Horvath *et al.*, 2006) ed è stata in particolare identificata la mutazione Gly555Glu nel gene *SDHA* come responsabile della malattia (Van Coster *et al.*, 2003). In particolare la sindrome di Leigh, nota anche come encefalopatia sub-acuta necrotizzante (SNEM), è una malattia neurodegenerativa progressiva infantile (Finsterer *et al.*, 2008). I pazienti affetti da questa malattia presentano una neuropatologia caratteristica consistente in un ritardo nello sviluppo o una regressione psicomotoria, debolezza, oftalmoplegia esterna, acidosi lattica, atassia, distonia, vomito e convulsioni. I pazienti hanno spesso lesioni bilaterali costituite da focolai di

necrosi lungo il midollo spinale, il tronco encefalico o il cervello. I sintomi specifici della malattia dipenderanno dalla posizione di queste lesioni necrotiche. Non esiste una cura per la sindrome di Leigh ed i pazienti spesso muoiono entro alcuni mesi dalla diagnosi della malattia. Questa sindrome è una malattia geneticamente eterogenea con molteplici causa per l'alterazione nella funzione mitocondriale come difetti o mancanze nella catena di trasporto degli elettroni (il deficit nel complesso II è solo nel 2-4% dei casi di carenze nella catena respiratoria associate alla sindrome), nel complesso della piruvato deidrogenasi, difetti del DNA mitocondriale (Rustin *et al.*, 1997; Parfait *et al.*, 2000).

Recentemente è stata ritrovata in un paziente affetto da paraganglioma una mutazione germinale in *SDHA*, Arg589Trp, associata a perdita di eterozigotà nel tumore, questo ad indicare che anche *SDHA* può agire da *tumor-suppressor* nei paragangliomi così come gli altri geni *SDH*.

SDHB (PGL4) tra le 98 differenti mutazioni germinali del gene *SDHB* il 46% sono mutazioni missenso, 23% sono mutazioni frameshift, 13% difetti di splicing, 9% mutazioni missenso, 2% delezioni o inserzioni di un aminoacido e 7% sono estese delezioni (Pasini *et al.*, 2009). I portatori di mutazioni a carico del gene *SDHB* sono affetti da feocromocitoma extrasurrenalico, spesso secernente e maligno, associato o meno a paragangliomi della testa e del collo. Si può dire che l'età media in cui viene diagnosticato il paraganglioma è compresa all'incirca tra i 30 e i 40 anni, i più giovani pazienti affetti da PGL si sono osservati in portatori di mutazioni in *SDHB* e sono un bambino di tre anni affetto da feocromocitoma e uno di 9 anni affetto da paraganglioma della testa e del collo (Ricketts *et al.*, 2009). La maggiore preoccupazione clinica per le sindromi PGL causate da mutazioni in *SDHB* è la natura altamente aggressiva dei paragangliomi che possono manifestarsi anche in giovane età. A differenza di mutazioni germinali in *SDHD* non esiste una chiara correlazione tra fenotipo e genotipo per le mutazioni in *SDHB*.

SDHC (PGL3) sono state identificate 15 mutazioni germinali diverse nel gene *SDHC*, la maggior parte sono mutazioni nonsense 47%, mutazioni di splicing 33% e estese delezioni 7%. Queste mutazioni sono principalmente associate allo sviluppo di paragangliomi della testa e del collo, solo 19 casi sono stati segnalati fino ad oggi come portatori di mutazioni germinali *SDHC* con un totale di 30 pazienti affetti tra cui 11 membri di famiglia (Pasini *et al.*, 2009). In generale mutazioni in *SDHC* sembrano legate alla formazione di paragangliomi benigni sporadici. Tuttavia è stato segnalato in un paziente un paraganglioma maligno secernente catecolamine (Niemann *et al.*, 2003) e recentemente mutazioni in *SDHC* si sono associate a PGL del surrene e extra-surrenalico (Mannelli *et al.*, 2007 Peczkowska *et al.*, 2008).

SDHD (PGL1) i portatori di mutazioni del gene *SDHD* possono sviluppare principalmente paragangliomi della testa e del collo, spesso multifocali, e occasionalmente in feocromocitomi surrenalici, ma meno frequentemente extra-surrenalici (Baysal *et al.*, 2000). I

paragangliomi trovati in questi pazienti sono raramente maligni e solo occasionalmente secernono catecolamine. Sono state identificate, associate a paragangliomi, 68 mutazioni germinali nel gene *SDHD* la maggior parte di queste sono mutazioni *frameshift* (40%), mutazioni nonsense (25%) e mutazioni in siti di splicing (9%) (Pasini *et al.*, 2009). Anche se i feocromocitomi sono rari in pazienti con mutazioni nella linea germinale *SDHD* e si verificano solo occasionalmente è stato recentemente (Ricketts *et al.*,2009 Timmers *et al.*,2009) descritto che le mutazioni che provocano la perdita di espressione della proteina o proteine tronche o instabili sono stati associati ad un rischio significativamente aumentato di feocromocitoma rispetto a mutazioni missenso che non incidono sulla stabilità della proteina. L'età media della diagnosi di paragangliomi in pazienti affetti da PGL1 è compresa in un range che va da 20 anni per i casi di feocromocitoma a 40 anni per i paragangliomi della testa e del collo (Neumann *et al.*, 2004; Ricketts *et al.*, 2009). Per *SDHD* è evidente come la malattia si osserva quasi esclusivamente quando la mutazione viene trasmessa dal padre, è stato quindi ipotizzato un imprinting materno. Nonostante la modalità di trasmissione è stato osservato che entrambi gli alleli del gene *SDHD* hanno una normale espressione nei tessuti normali e perdita dell'intero cromosoma 11 materno nei tessuti tumorali. Si assiste quindi alla perdita selettiva del cromosoma 11 materno nelle cellule somatiche, quindi la trasmissione della malattia è esclusivamente paterna.

SDHAF2 (SDH5) (PGL2) il gene mutato in queste forme tumorali è stato localizzato sul cromosoma 11, 11q11.3 ma solo recentemente è stato identificato come *SDH5* codificante per la proteina Sdh5p responsabile dell'assemblaggio della succinato deidrogenasi, necessaria per l'inserimento del fattore covalente FAD nella sub-unità catalitica Sdh1 (Hao *et al.*, 2009). La PGL2 è stata per la prima volta identificata in una famiglia olandese che presentava paragangliomi della testa e del collo (Van Baars *et al.*,1982; Mariman *et al.*, 1995). La stessa mutazione Gly78Arg è stata ritrovata, oltre nella famiglia olandese, anche in casi di paragangliomi familiari in Spagna (Bayley *et al.*,2010), non si può parlare di un effetto fondatore ma la mutazione probabilmente è la più probabile e la più ricorrente in questo gene, in questi tumori. È interessante notare che, sia PGL1 sia PGL2 sembrano essere ad eredità paterna e che via sia un imprinting materno. Entrambi *SDHD* (PGL1) e *SDH5* (PGL2) sono codificati sul cromosoma 11 è possibile ipotizzare che questo cromosoma sia incline a una forma specifica di imprinting, modello di ereditarietà osservato solo in queste due forme di paraganglioma. Le mutazioni in *SDH5* potrebbero spiegare un sottoinsieme di quasi il 30% dei pazienti affetti da paragangliomi, per i quali non erano state identificate mutazioni nelle sub-unità SdhB, C e D.

SDHAF1 sono state recentemente descritte due mutazioni omozigoti missenso (G57R e R55P) nel gene *SDHAF1* trovate in bambini affetti da leucoencefalopatia infantile progressiva, associata a difetti nella succinato deidrogenasi (Ghezzi *et al.*, 2009). Sono stati studiati due set

famigliari, il primo consiste in un grande numero di parenti consanguinei di origine turca comprendente parecchi bambini affetti dalla malattia e l'altro composto da tre bambini malati e relativi genitori, originari di un piccolo paese nelle valli alpine della Lombardia nel nord Italia. Due dei bambini italiani affetti sono cugini di secondo grado, essendo nati da genitori che sono cugini di primo grado. Sebbene l'accertamento formale della consanguineità degli altri genitori non sia riuscito e sia stato impossibile collegare la famiglia del terzo bambino con le altre due, è stato assunto che tutti i pazienti abbiano ereditato la stessa mutazione, probabilmente omozigote, sulla base di una presentazione clinica praticamente identica della malattia e di una comune origine geografica. I sintomi consistono essenzialmente in una rapida e progressiva regressione psicomotoria che si manifesta dopo un intervallo iniziale di 6-11 mesi di assenza della malattia. Tale regressione è associata a difetti nello sviluppo della parola seguiti da quadriparesi spastica e perdita parziale del controllo posturale con distonia, ossia alterazione tonica dei muscoli accompagnata da crisi neurodislessiche caratterizzate da contrazioni toniche talora molto dolorose della muscolatura del collo, della bocca e della lingua. I pazienti subiscono una relativa stabilizzazione delle loro condizioni cliniche con una sopravvivenza oltre la prima decade di vita nella maggior parte dei casi, sebbene la loro crescita sia severamente danneggiata in modo consistente. L'analisi biochimica dei complessi della catena respiratoria nei mitocondri del muscolo e dei fibroblasti dei pazienti hanno mostrato un'attività del 20-30% residua della succinato deidrogenasi.

L'analisi delle manifestazioni cliniche di 689 pazienti portatori di mutazioni deleterie in *SDHB* (264), *SDHC* (30) e *SDHD* (395) ha portato al riconoscimento di una correlazione tra genotipo e fenotipo (Pasini *et al.*, 2009). All'incirca nel 60% dei pazienti portatori di mutazioni in *SDHD* e *SDHC* si ha una storia familiare della patologia, mentre la maggior parte delle mutazioni in *SDHB* è stata ritrovata in casi di PLG sporadici, circa il 69%. L'età media di diagnosi di tumore è all'incirca trent'anni con alcune differenze per quanto riguarda il gene mutato, 32/33 anni per i pazienti portatori di mutazioni in *SDHB* e *SDHD*, 38 anni per i portatori di mutazioni in *SDHC*. La malattia è diagnosticata nel primo decennio di vita nel 25% dei pazienti portatori di mutazioni in *SDHB* e nel 15% dei portatori di mutazioni in *SDHD*, nessun caso di tumore in età infantile riguarda mutazioni in *SDHC*. Il fenotipo più frequente associato a mutazioni germinali in *SDHB* è lo sviluppo di paraganglioma extra-surrenalico, soprattutto addominale ma anche toracico, ma vi sono anche casi di feocromocitoma surrenanale e paragangliomi della testa e del collo. Le mutazioni in *SDHD* causano più frequentemente paragangliomi della testa e del collo e solo in alcuni casi feocromocitomi o paragangliomi extra-surrenalici. I 30 casi di mutazioni in *SDHC* sono associati esclusivamente a paragangliomi della testa e del collo. Studi sulla penetranza di

queste mutazioni, cioè la probabilità di sviluppare la malattia in chi porta mutazioni germinali nei geni SDH, hanno rivelato che mutazioni in *SDHB* causano tumore nel 76% dei casi, la metà di questi si manifesta prima dei trent'anni ed è alta la probabilità che si tratti di tumori maligni. Mentre chi ha ereditato mutazioni in *SDHD* ha il 100% di probabilità di manifestare il tumore entro i cinquant'anni.

1.4 IL COMPLESSO II O SUCCINATO DEIDROGENASI

Il complesso II della catena respiratoria (succinato-ubichinone ossido reductasi o succinato deidrogenasi, SDH) è un complesso flavo proteico situato nella membrana interna del mitocondrio. Esso fa parte sia del ciclo dell'acido citrico sia della catena respiratoria, infatti catalizza l'ossidazione del succinato a fumarato e trasferisce gli elettroni direttamente all'ubichinone, riducendolo a ubichinolo. Tale complesso rappresenta quindi l'unico link diretto tra l'attività del ciclo dell'acido citrico e il trasporto di elettroni nella membrana mitocondriale.

Il complesso II della catena respiratoria, SDH, è costituito da due domini distinti: un dominio dimerico idrofilico periferico e un dominio dimerico idrofobico che lega l'intero complesso alla membrana mitocondriale interna. Il dominio idrofilico consiste in una sub-unità flavoproteica (Fp), in cui il cofattore covalente FAD dell'enzima è parte del sito catalitico, e una sub-unità ferro-zolfo (Ip) contenente tre differenti cluster Fe-S $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+1+}$, $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+1+}$ e $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+0}$ per il trasferimento di elettroni tra il FAD e l'ubichinone. Le sequenze primarie dei domini Fp e Ip sono altamente conservate tra le specie e quindi questo è indicativo della presenza di geni ancestrali comuni. I domini idrofobici mostrano una maggiore diversità, essendo costituiti da una o due sub-unità con un diverso contenuto di gruppi eme di tipo *b*, e una minore similarità di sequenza; queste ancora contengono i siti di legame per i chinoni e gli inibitori. Nei batteri il complesso è orientato con il dominio idrofilico rivolto nel citoplasma e il dominio idrofobico ancorato alla membrana citoplasmatica. Tutti i complessi eucariotici hanno il complesso idrofilico nella matrice mitocondriale ancorato alla membrana mitocondriale interna dalle sub-unità idrofobiche (Ackrell *et al.*, 2000).

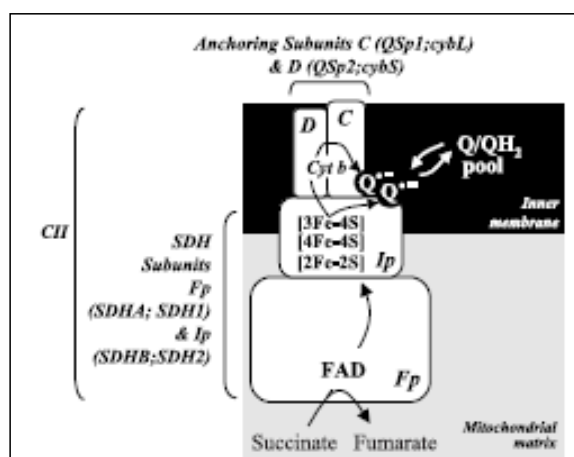


Fig. 1.4: Visione schematica del complesso II della catena respiratoria. Lo schema mostra le sub-unità Fp e Ip ancorate alla membrana mitocondriale interna dalle sub-unità C e D. (Rustin et al., 2002).

L'enzima, ubiquitario in tutte le specie, è un eterotetramero, di 124 kDa, composto da quattro sub-unità che sono codificate unicamente da altrettanti geni nucleari, *SDHA-D* nei mammiferi (corrispondenti ai geni *SDH1-4* in lievito): tali geni vengono generalmente considerati come geni housekeeping che presentano espressione ubiquitaria (Parfait *et al.*, 2000). Ciascuna sub-unità viene formata da una proteina precursore composta da una sequenza N-terminale di *targeting* per il mitocondrio, che viene rimossa mediante taglio proteolitico in seguito al trasporto all'interno dell'organello. Le sub-unità SdhAp e SdhBp (corrispondenti a Sdh1p e Sdh2p rispettivamente nell'uomo) formano il dimero catalitico che contiene il sito attivo, il FAD e i tre cluster ferro-zolfo. Le sub-unità SdhC e SdhD (corrispondenti a Sdh3 e Sdh4 rispettivamente nel lievito) sono proteine integrali di membrana che contengono il gruppo eme e i siti di riduzione dell'ubichinone.

1.4.1 LA SUCCINATO DEIDROGENASI DI LIEVITO

Il dimero catalitico di lievito può ossidare il succinato e ridurre gli accettori artificiali di elettroni senza le sub-unità di membrana (Lemire and Oyedotun 2002). Queste sub-unità sono comunque necessarie per la riduzione dell'ubichinone.

Il dimero catalitico è costituito da:

- Sdh1p, sub-unità flavo proteica, codificata dal gene *SDH1* localizzato sul cromosoma XI. La proteina deriva da un precursore di 640 aminoacidi (70 kDa) con una sequenza di *targeting* all'N-terminale di 28 aminoacidi. La perdita del gene *SDH1* causa perdita dell'attività respiratoria, perdita delle attività SDH-dipendenti e assenza di flavina precipitabile. Per questo motivo Sdh1p sembra essere la principale flavoproteina covalente in lievito. Il cofattore FAD viene attaccato in seguito alla rimozione proteolitica della sequenza di *targeting* nella matrice. Sul cromosoma X si trova il gene *SDH1b* (*YJL405w*), la proteina Sdh1bp ha un'identità di sequenza dell'84% con Sdh1p (Colby *et al.*, 1998). Il gene *SDH1b* è

in grado di complementare la delezione del gene *SDH1* quando è espresso in un vettore multicopia, ma la crescita su fonti di carbonio respirabili è nettamente più lenta quando è presente in singola copia. Il gene *SDH1b* è poco espresso ed è improbabile che il suo prodotto genico contribuisca in modo significativo all'attività della succinato deidrogenasi nei mitocondri. I livelli di espressione del gene *SDH1b* sono 100-500 volte inferiori rispetto a quelli del gene *SDH1*.

- Sdh2p, sub-unità ferro-zolfo, codificata dal gene *SDH2*. L'identità di sequenza tra la proteina umana SdhBp e la proteina di lievito Sdh2p è del 64%. Nelle sequenze proteiche i residui più conservati sono i cluster di residui di cisteina che coordinano i centri ferro-zolfo. Sdh2p è un polipeptide di 266 aminoacidi (30kDa) con una sequenza di targeting mitocondriale di circa 20 aminoacidi. I sette aminoacidi all'estremità C-terminale, contenenti dimeri Lys-Lys, sono essenziali per l'assemblaggio e per l'attività dell'enzima.

Sdh1p e Sdh2p formano il dimero catalitico ancorato alla membrana interna sul lato rivolto verso la matrice: l'assenza di una sub-unità porta inevitabilmente all'assenza dell'altra, suggerendo che la formazione del dimero sia necessaria per la stabilità delle singole sub-unità. Non è chiaro se in lievito il dimero catalitico possa formare stabilmente in assenza di uno o di entrambe le sub-unità di ancoraggio. Il pathway di trasporto degli elettroni attraverso il dimero catalitico è ormai abbastanza chiaro: gli elettroni fluiscono dal succinato al FAD e in successione ai cluster [2Fe:2S], [4Fe:4S] e [3Fe:4S]. Da qui gli elettroni entrano poi nel dimero di membrana.

L'ancoraggio del dimero catalitico alla membrana mitocondriale interna è mediato da un eterodimero di due subunità idrofobiche, Sdh3p e Sdh4p, di 16,675 e 16,638 kDa rispettivamente. Tale dimero di membrana contiene un gruppo eme di tipo *b* e il sito attivo per la riduzione dell'ubichinone.

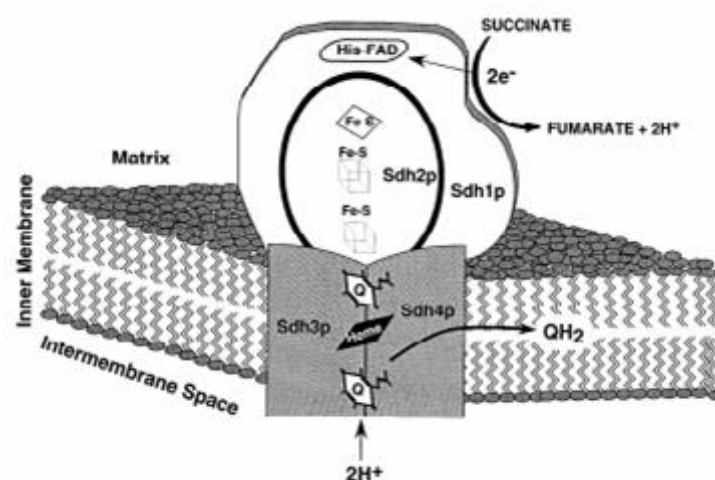


Fig. 1.5: Modello di SDH di lievito (Lemire and Oyedotun, 2002).

Analisi di idrofobicità hanno predetto che ciascuna subunità di membrana contiene tre regioni idrofobiche in grado di formare eliche transmembrana. Il modello attuale per il dominio di membrana in tutte le succinato deidrogenasi, oggi supportato da due strutture cristalline, prevede la presenza di un *core* di quattro eliche anti-parallele. In questo modello le tre eliche transmembrana di Sdh3p sono numerate dalla I alla III, mentre le tre eliche di Sdh4p sono numerate da IV a VI. Le eliche transmembrana I, II, IV e V formano un fascio di eliche anti-parallele con le due eliche III e VI che “dondolano” all’esterno. Numerose osservazioni con l’SDH di lievito suggeriscono che le eliche transmembrana III o VI possono essere necessarie per fornire rigidità e stabilità al fascio di eliche. È stato quindi proposto che esse servano come cerniere idrofobiche per stabilizzare il fascio di eliche. È stato inoltre osservato che mutazioni che troncano Sdh3p o Sdh4p e che rimuovono le eliche III o VI danneggiano severamente la crescita respiratoria e l’attività enzimatica, ma non portano ad una completa perdita di funzione. Questo suggerisce che le eliche III e VI non sono richieste per la catalisi, ma giocano piuttosto un ruolo nel mantenimento dell’integrità strutturale del dimero di membrana.

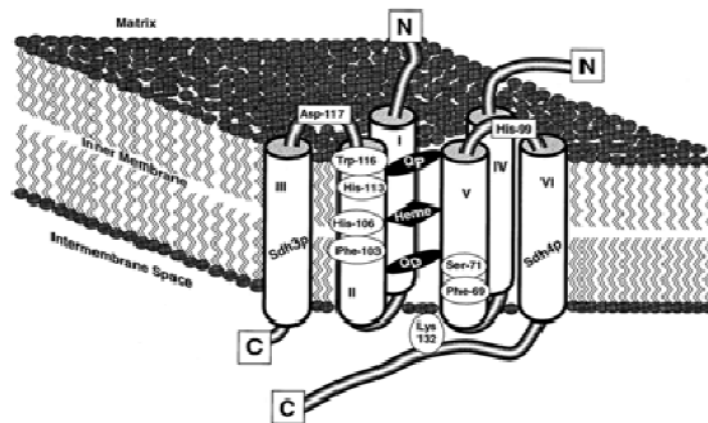


Fig. 1.6: Modello strutturale del dimero di membrana (Lemire and Oyedotun, 2002).

A differenza del dimero catalitico, che mostra una notevole conservazione tra le specie delle sequenze aminoacidiche e nella composizione in cofattori, le sub-unità di ancoraggio alla membrana variano considerevolmente nella struttura primaria delle sub-unità e nel contenuto dei gruppi eme (Lemire and Oyedotun 2002).

Il *genome database* di *S. cerevisiae* contiene una ORF, chiamata *YMR118C*, localizzata sul cromosoma XIII, che codifica per una putativa proteina della membrana mitocondriale di 196 aminoacidi che ha un’identità di sequenza con Sdh3p del 57%. I geni *YLR164W* e *YOR297C* codificano per due proteine che hanno rispettivamente il 52% e il 36% di identità con la proteina Sdh4. Il gene *YOR297C* codifica per la proteina Tim18p, una sub-unità del complesso di import TIM22 che media l’ingresso nella membrana interna dei mitocondri di numerose proteine

(Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Come Sdh4p, Tim18p è una proteina transmembrana della membrana mitocondriale interna, con tre eliche trans-membrana, con la porzione N-terminale localizzata nella matrice e il C-terminale localizzato nello spazio intermembrana. L'unico collegamento tra le proteine Sdh4p e Tim18p sembra essere l'identità delle loro sequenze, che sembrano funzionalmente indipendenti. Il gene *YLR164W*, come dimostrato da recenti lavori, svolti nel nostro Dipartimento, i cui risultati non sono ancora stati pubblicati, se espresso in multicopia complementa la delezione di *SDH4*. Questi geni paraloghi non hanno un ruolo nella respirazione mitocondriale e la loro delezione non ha effetti sulla vitalità cellulare o sulla capacità di crescere su fonti di carbonio respirabili. Sdh3p e Sdh4p sono le uniche proteine necessarie per la corretta funzionalità del complesso e per il suo ancoraggio alla membrana mitocondriale interna.

Esperimenti condotti in *S. cerevisiae* hanno dimostrato che mutazioni a carico di uno qualunque dei geni che codificano per le quattro sub-unità Sdh compromettono la funzionalità dell'intero complesso (Oyedotun and Lemire, 2001). In lievito, infatti, diversi mutanti *sdb* sono incapaci di crescere su fonti di carbonio non fermentabili quali etanolo e glicerolo. Mutazioni a carico di uno o l'altro dei due geni, *SDH1* o *SDH2*, che codificano per le due subunità catalitiche del complesso, impediscono la formazione del dominio catalitico e portano alla perdita dell'attività succinato deidrogenasica (Oyedotun and Lemire, 2001). Analogamente, mutazioni a carico dei geni che codificano per i domini di ancoraggio impediscono l'ingresso nella catena respiratoria, via ubiquinone, degli elettroni derivanti dall'ossidazione del succinato. Infatti, nonostante il dominio catalitico sia in grado di ossidare il succinato e ridurre accettori di elettroni artificiali, il mancato ancoraggio alla membrana di tale dominio porta ad una perdita dell'attività dell'enzima che non è in grado di trasferire gli elettroni all'accettore naturale ubiquinone. L'insieme di tali risultati dimostra che l'enzima succinato deidrogenasi è fondamentale per la respirazione cellulare (Ciriacy *et al.*, 1977; Tzagoloff *et al.*, 1990).

Prima del 2009, per quanto riguarda il complesso II non si conoscevano proteine specifiche responsabili del suo l'assemblaggio. Tramite screening di complementazione di mutanti respiratorio deficienti che presentavano perdita specifica dell'attività succinico deidrogenasica (Oyedotun and Lemire, 2002), è stato identificato un gene (*TCM62*) il cui prodotto è richiesto per la sua biogenesi. Esso codifica per una proteina di 572 aminoacidi e di peso molecolare di 64 kDa, che mostra un'identità di sequenza del 17.3% con la proteina di lievito Hsp60, un chaperone molecolare. Tcm62p è una proteina mitocondriale il cui N-terminale è presente nella matrice mitocondriale, mentre il C-terminale è accessibile dallo spazio intermembrana. Il ruolo di Tcm62p come chaperone è stato proposto quando grandi complessi oligomerici di circa 200kDa contenenti sia Tcm62p che SDH sono stati trovati attraverso gel di elettroforesi in condizioni

native (Dibrov *et al.*, 1998). Con l'overespressione di Tcm62p si è osservato che si formano degli aggregati proteici insolubili all'interno dei mitocondri che intrappolano Sdh1p e Sdh2p, che sono quindi le sub-unità dell'enzima con cui Tcm62p interagisce specificamente. L'interazione avviene probabilmente tra Tcm62p la sub-unità ferro-zolfo della proteina, in quanto si trova un arricchimento della proteina Sdh2 negli aggregati e non Sdh1p. Quindi Tcm62p potrebbe essere coinvolta nella formazione o nell'inserzione dei cluster ferro-zolfo; in alternativa tale proteina potrebbe stabilizzare la sub-unità Sdh2p fino a che essa non forma un complesso stabile con Sdh1p. La perdita di funzione o un'espressione alterata di *TCM62* influisce notevolmente su SDH e ha effetti minori sugli altri componenti della catena respiratoria. Tcm62p, quindi non è un assemblatore specifico della succinato deidrogenasi, ma potrebbe facilitare anche l'assemblaggio di altri complessi, che possiedono altre vie di assemblaggio o sono in grado di assemblarsi spontaneamente, ma in modo meno efficiente. Rimane da capire quali step del *pathway* di assemblaggio di SDH richiedano l'assistenza di uno chaperone. Più interessante sarebbe capire perché il complesso di lievito possa richiedere questo tipo di assistenza, dal momento che altri organismi (che non hanno una controparte a Tcm62p) non la richiedono.

Il primo assemblatore specifico per la succinato deidrogenasi, la proteina Sdhaf1, è stato scoperto con lo studio di bambini affetti da leucoencefalopatia progressiva, associata ad una significativa diminuzione dell'enzima SDH e della sua attività (Ghezzi *et al.*, 2009). Sdhaf1p ha di una sequenza proteica di 115 aminoacidi che presenta come peculiarità due motivi tripeptidici Leu-Tyr-Arg (LYR) conservati, che sono presenti all'estremità N-terminale di numerose sequenze proteiche in diverse specie. Il gene umano *SDHAF1* è omologo al gene di lievito *YDR379C-A*, ribattezzato *SDH6*. Il mutante nullo *Δsdh6* è incapace di crescere utilizzando l'acetato come unica fonte di carbonio e ha un abbattimento dell'attività SDH del 60-70%. Questo mutante di lievito è stato utilizzato per studiare se due mutazioni missenso (R55P e G57R) che cosegregano con la leucoencefalopatia progressiva, sono effettivamente responsabili della diminuita attività del complesso II riscontrata nei pazienti.

Ci sono almeno otto proteine umane contenenti LYR Motif (LYRM), compresa Sdhaf1, il motivo LYR rappresenta una *signature* per le proteine coinvolte nel metabolismo Fe-S. Ad esempio, LyrM-4p, il cui ortologo in lievito è Isd11p, è una proteina che gioca un ruolo essenziale nella biosintesi dei centri Fe-S mitocondriali. LYRM-6 è la subunità NDUFA6 da 14 kDa del complesso I, che svolge un'attività NADH-deidrogenasica. Probabilmente Sdhaf1, così come NDUFA6 possono essere importanti per l'inserzione o la ritenzione dei centri Fe-S all'interno del backbone proteico del complesso II e I rispettivamente. La mancata incorporazione dei centri Fe-S all'interno del complesso II può eventualmente inibire la formazione o destabilizzare la

struttura dell'olocomplesso: da qui deriverebbe la diminuita attività dell'enzima succinico deidrogenasi.

Un altro assemblatore recentemente isolato è la proteina Sdh5, che corrisponde alla proteina Yol07, ri-nominata nell'uomo SDHAF2, la sua funzione è l'inserimento del cofattore FAD nella sub-unità catalitica dell'enzima (Hao *et al.*, 2009). Utilizzando il lievito come sistema modello è stato dimostrato che Sdh5p è una proteina solubile che si trova nella matrice mitocondriale che è richiesta per la crescita su fonti di carbonio non fermentabile e per la respirazione cellulare. Nel mutante *sdh5* non è osservabile alcuna attività della succinato deidrogenasi, mentre l'attività degli altri enzimi del ciclo di Krebs e degli enzimi della catena respiratoria è normale. Il complesso SDH sembra parzialmente assemblato in assenza di Sdh5p ma risulta instabile. È stato dimostrato, inoltre, che la proteina Sdh5 è co-purificata con la proteina Sdh1. L'interazione Sdh1-Sdh5 è stata confermata dall'osservazione che Sdh5p, come Sdh2p, vengono completamente degradati nel ceppo *Δsdh1*. Al contrario la perdita di *SDH2* causa un aumento dei livelli della proteina Sdh5, presumibilmente a causa di una maggiore formazione del complesso Sdh1/Sdh5, che si forma perché Sdh2 è assente. Con l'over-espressione del gene *SDH5* nelle cellule wild-type non si aumentano i livelli di flavinazione della proteina Sdh1p. Risultati ottenuti in mutanti difettivi per la flavinazione hanno dimostrato che Sdh5p è necessaria per legare il FAD. Un significativo effetto dell'overespressione di *SDH5* potrebbe richiedere uno stato di ridotta flavinazione di Sdh1, come è stato osservato in un ceppo delecto nel trasportatore del FAD Flx1 (Tzagoloff *et al.*, 1996; Bafunno *et al.*, 2004), nel quale la concentrazione di FAD mitocondriale è ridotta. Nel mutante *Δflx1* la proteina Sdh1 non è flavinata, ma quando *SDH5* è overespresso la flavinazione della sub-unità è all'incirca il 50% di rispetto al wild-type. Studi in *Escherichia coli* hanno dimostrato che l'incorporazione del FAD era quasi impercettibile quando il batterio esprimeva solo Sdh1, mentre era aumentata drammaticamente quando era co-espresso anche Sdh5, ma non Sdh2, a dimostrazione del fatto che Sdh5 è necessaria e sufficiente per legare il FAD alla sub-unità Sdh1.

1.5 DEFICIENZE SDH E ONCOGENESI: POSSIBILI MECCANISMI MOLECOLARI

I meccanismi molecolari e cellulari che collegano le mutazioni nei geni *SDH* e la tumorigenesi non sono ancora chiari e non è ben chiaro quale sia l'associazione tra diversi fenotipi clinici e le anomalie nelle diverse sub-unità della succinato deidrogenasi. Sembra possibile che quando si verifica una mutazione nelle sub-unità della succinato deidrogenasi, il succinato possa essere ancora ossidato a fumarato, ma si accumulino degli elettroni perché non trasferiti attraverso i centri ferro zolfo della sub-unità B fino all'ubichinone legato alle sub-unità C e D,

questi elettroni possono essere trasferiti all' O_2 generando anioni superossido. Alti livelli di specie reattive dell'ossigeno, ROS, possono causare un danno ossidativo del DNA nucleare e/o mitocondriale, quindi mutagenesi e tumorigenesi. In cellule con mutazioni nel gene *SDHC* è stato rilevato un aumento intracellulare della produzione di ROS, che porta ad un aumento della tumorigenesi (Ishii N. *et al.*, 2006 e Ishii N.*et al.*,2007). Per lo studio sistematico dello stress ossidativo e dei suoi effetti molecolari e cellulari sono stati utilizzati mutanti *mev-1* di *Caenorhabditis elegans* (la mutazione *mev-1* è stata identificata nel gene putativo *cyt-1*, omologo dell'umano *SDHC* (Ishii *et al.*,1998)) e una linea cellulare NIH3T3 di fibroblasti di topi transgenici, con mutazioni equivalenti al quelle del gene umano *SDHC* (Ishii T. *et al.*, 2005). Questo studio ha permesso di affermare che l'accumulo di ROS può portare nell'uomo a patologie quali l'invecchiamento precoce, malattie neurodegenerative e tumorigenesi.

Le mutazioni nelle sub-unità SdhBp e SdhDp della succinato deidrogenasi associate a paragangliomi possono causare una completa perdita dell'attività enzimatica che è stata associata all'attivazione della via ipossico-angiogenica tramite l'attivazione del fattore di trascrizione inducibile da ipossia HIF-1 (Hypoxia-inducible Factor) e dei suoi principali geni bersaglio come VEGF (Vascular Growth Endotelial Factor), fattori angiogenetici che possono a loro volta stimolare l'angiogenesi e la crescita del tumore (Gimenez-Roqueplo *et al.*,2001, Gimenez-Roqueplo *et al.* 2002). Queste osservazioni spiegano anche l'alta vascolarizzazione dei paragangliomi.

Sono stati proposti due modelli che mettono in relazione deficienze nella succinico deidrogenasi e l' oncogenesi; entrambi prevedono la stabilizzazione e l'attivazione del fattore trascrizionale HIF-1 (Selak *et al.*, 2005; Gottlieb. and Tomlinson 2005). A concentrazioni di ossigeno normali, "normossia", i livelli di HIF-1 α sono molto bassi a causa della sua costante degradazione. La degradazione di HIF-1 α viene segnalata dalla sua idrossilazione sui due residui prolina (pro 402 e pro 564) nel dominio ODD operata dagli enzimi prolil-idrossilasi (PHDs), la cui attività enzimatica è ossigeno, ferro e 2-oxoglutarato dipendente (Srinivas *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 2001; Masson and Ratcliffe,2003). Gli enzimi PHDs catalizzano la conversione dei residui prolina, O_2 , e alfa-ketoglutarato a idrossiprolina, diossido di carbonio, e succinato usando ascorbato e Fe^{2+} come cofattori. In condizioni ipossiche, l'attività PHDs è ridotta, e di conseguenza HIF-1 α è stabilizzato. HIF-1 quindi attiva un set di geni coinvolti in angiogenesi, proliferazione, sopravvivenza cellulare, e glicolisi.

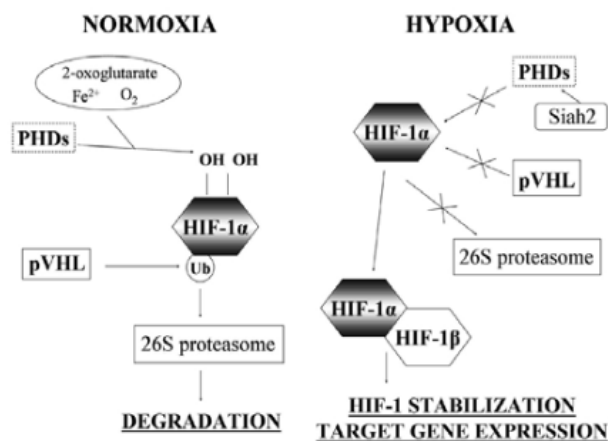


Fig. 1.7: Rappresentazione schematica del controllo dell'ossigeno sulla regolazione del fattore HIF1- α (Lodoba *et al.* 2010).

L'aumento dei ROS potrebbe agire come segnale per la stabilizzazione del fattore di trascrizione HIF-1 α . Alti livelli di specie reattive dell'ossigeno possono inibire l'attività delle PHD perché inducono una risposta pseudo-ipossica promuovendo l'ossidazione del ferro ferroso e dell'ascorbato, inibendo la modificazione e la degradazione di HIF-1 α . Un altro interessante modello di tumorigenesi dovuto all'inattivazione dei geni *SDH* prevede che, in seguito all'accumulo di succinato a livello citosolico, l'attività degli enzimi prolil-idrossilasi sia bloccata, con conseguente stabilizzazione di HIF-1- α e trascrizione dei suoi geni bersaglio. Il succinato è un acido dicarbossilico, capace di attraversare la membrana mitocondriale interna (unico vero ostacolo per i piccoli metaboliti nel mitocondrio) attraverso carrier dicarbossilato. Il succinato che si accumula nella matrice mitocondriale a causa di un mal funzionamento di SDH esce poi nel citosol dove inibisce l'attività delle PHDs. Le prolil-idrossilasi per catalizzare la conversione dei residui prolina, O₂, e alfa-ketoglutarato a idrossiprolina, diossido di carbonio, usano come cofattori succinato, ascorbato e Fe²⁺. Quindi il succinato non è solo il sub-strato della succinato deidrogenasi nel mitocondrio ma anche prodotto delle PHD nel citosol. Quindi, il succinato accumulato, con un'inibizione a feedback delle PDH, causa la stabilizzazione di HIF1 α e l'attivazione del complesso HIF.

La stabilizzazione di HIF-1 sarebbe in grado di stimolare la trascrizione di geni che promuovono la sopravvivenza in condizioni di scarso ossigeno (definite ipossia) e in particolar modo verrebbe attivata sia la via glicolitica (permettendo la produzione di ATP tramite una via indipendente dall'ossigeno) sia il fattore di crescita endotelio-vascolare (VEGF) che promuove l'angiogenesi, sia in condizioni fisiologiche che tumorali (Conway *et al.*, 2001). E' stato dimostrato che il gene VEGF partecipa all'angiogenesi stimolando la proliferazione di cellule vascolari, in condizione di ipossia (Neufeld *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 2001). Altri geni direttamente sotto il controllo

trascrizionale dell'HIF-1 sono Epo (eritropoietina) che incrementa la produzione dei globuli rossi (Semenza *et al.*, 1991), e geni che incrementano il trasporto del glucosio e la glicolisi per produrre energia in assenza della fosforilazione ossidativa. (Dang and Semenza, 1999).

Una spiegazione al possibile rapporto tra disfunzione mitocondriale e cancro è stato già proposto nel 1956 da Otto Warburg, il quale ha caratterizzato la produzione di energia all'interno dei tumori solidi rispetto a un tessuto normale (Warburg 1956; Chen *et al.*, 2009 Kirches *et al.*, 2009). In un tessuto normale il 90% dell'ATP è prodotto dalla fosforilazione ossidativa e il restante 10% dalla glicolisi. A contrario una cellula tumorale utilizza in modo meno efficiente la fosforilazione ossidativa, con la quale si produce solo il 50% di ATP e il restante 50% con la glicolisi. È difficile ridurre la funzione mitocondriale della cellula senza aumentare la glicolisi perché sono gli unici due meccanismi che producono energia, quindi si può ipotizzare che la ridotta attività mitocondriale causi l'aumento dell'attività glicolitica. Si è pensato che questo cambiamento avvenga anche in presenza di concentrazioni di ossigeno sufficienti per supportare la funzione mitocondriale, si definisce infatti “glicolisi aerobica”. I difetti nella respirazione cellulare, accompagnati da un lento sviluppo rafforzato dalla “glicolisi aerobica” durante la cancerogenesi, effetto Warburg, potrebbe essere il cambiamento metabolico che definisce l'inizio della formazione del cancro.

HYPOXIA INDUCIBLE FACTORS

I fattori inducibili da ipossia (Hypoxia Inducible Factors, HIF) sono i maggiori regolatori dell'omeostasi dell'ossigeno e svolgono un ruolo nello sviluppo, nella fisiologia post-natale così come nello sviluppo di tumori solidi, quindi il blocco dell'induzione o dell'attività di questi fattori di trascrizione potrebbe essere un modo per controllare la progressione tumorale (Loboda *et al.*, 2010).

Il fattore HIF è un dimero composto da una sub-unità HIF- α di 120kDa, regolata dall'ossigeno, e da una sub-unità HIF-1 β di 91-94 kDa, costitutivamente espressa, conosciuta con l'acronimo ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator), in quanto originariamente identificata come una proteina di legame degli aryl hydrocarbon receptor. Ci sono tre isoforme della sub-unità HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) e tre paraloghi di HIF-1 β . HIF-1 α e HIF-2 α sono particolarmente critici per la risposta all'ipossia e formano un complesso con HIF-1 β , mentre il ruolo di HIF-3 α non è chiaro. HIF-2 α ha una struttura simile a HIF-1 α , ma è espressa solo in alcuni tessuti, contrariamente a HIF-1 α che è ampiamente presente (Wiesener *et al.* 2003). HIF-1 α regola l'attivazione trascrizionale di più di 100 geni e si pensa che nelle cellule endoteliali umane regoli oltre il 2% dei geni, direttamente o indirettamente (Manalo *et al.*, 2005).

Entrambe le sub unità α e β appartengono alla famiglia degli attivatori trascrizionali con dominio basic helix-loop-helix (bHLH) per il legame con il DNA e il dominio PER-ARNT-SIM (PAS), importante per la dimerizzazione (Wang *et al.*,1995). Oltre a questi domini, è presente un dominio oxygen-dependent degradation (ODD) e due domini di attivazione in trans: NAD e CAD, dominio di attivazione rispettivamente all' N-terminale e al C-terminale. Il dominio di attivazione all' N-terminale delle sub-unità HIF-1 α e HIF-2 α sono essenziali per la specificità dei geni bersaglio (Dayan *et al.*,2006; Hu *et al.*,2007), mentre il dominio di attivazione al C-terminale contribuisce alla regolazione di molti, ma non tutti, i geni bersaglio del complesso HIF1. HIF-1 α è costitutivamente espresso e tradotto nella cellula, ma in condizioni di normossia è soggetto ad una rapida degradazione (Huang *et al.*, 1996) tramite il pathway ubiquitina dipendente che consiste nell'idrossilazione di due residui di prolina (Pro402 e Pro564) che si trovano nel dominio ODD, operata dagli enzimi prolil- drossilasi (PHDs), la cui attività è ossigeno dipendente. Una volta che i due specifici residui di prolina sono idrossilati avviene un'interazione altamente specifica con la proteina von Hippel-Lindau (pVHL) (Hon *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2002), che recluta sul dominio ODD un complesso di poli-ubiquitinazione (Ivan and Kaelin, 2001), complesso che guida il processo di degradazione di HIF-1 α mediata dal proteosoma 26S (Kamura *et al.*, 2000). Un'altra importante modificazione post-traduzionale che influenza la stabilità di HIF-1 α /HIF-2 α , consiste nell'acetilazione, da parte dell' acetil-transferasi arrest-defective 1 (ARD1), del residuo di lisina 532, che favorisce l'interazione tra HIF-1 α con la proteina pVHL, quindi la destabilizzazione e la degradazione del fattore HIF-1 α . In condizioni di ipossia l'attività degli enzimi PHDs è ridotta, e questo esclude l'interazione con il pVHL e quindi il targeting per la successiva proteolisi; inoltre, sempre in condizioni ipossiche, ARD1 è espresso in quantità inferiori rispetto e ciò contribuisce a una minore interazione con pVHL (Jeong *et al.*, 2002). Quando ciò si verifica la subunità HIF-1 α /HIF-2 α è stabile e viene trasportata nel nucleo dove può dimerizzare con HIF-1 β formando, in seguito al reclutamento di numerosi co-attivatori, un complesso trascrizionalmente attivo che riconosce specifiche sequenze regolative, le Hypoxia Response Element (HRE), sequenze altamente conservate presenti a monte del promotore di numerosi geni di risposta all'ipossia (Semenza *et al.*, 1996).

1.6 IL LIEVITO COME MODELLO DI PATOLOGIE UMANE

La maggior parte delle conoscenze scientifiche che riguardano le proprietà fondamentali degli organismi viventi deriva dagli studi compiuti in sistemi modello tra cui il lievito, eucariote monocellulare, *S. cerevisiae*.

Il lievito, condivide molte delle caratteristiche della biologia cellulare degli eucarioti superiori: possiede infatti tutte le strutture intracellulari presenti nelle cellule superiori fra cui i mitocondri (Botstein *et al.*, 1991) e i principali processi metabolici sono conservati tant'è che è stato definito "honorary mammal" (Resnick and Cox 2000).

L'utilizzo di *S. cerevisiae* presenta diversi vantaggi: cresce rapidamente, in terreni semplici e poco costosi, e in diverse condizioni colturali: il lievito esiste sia allo stato aploide che diploide, rendendo possibile studiare l'effetto di mutazioni sia dominanti che recessive. Sono inoltre disponibili svariati strumenti di ingegneria genetica fra cui la trasformazione con plasmidi monocopia o multicopia ad alta efficienza.

La creazione di *knockout* genici trae vantaggio dal genoma estremamente compatto del lievito ed è facilitata dall'elevata efficienza di ricombinazione omologa che 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 mutanti, come anche per creare nuovi ceppi.

S. cerevisiae è il primo organismo eucariotico il cui genoma è stato completamente sequenziato; l'intera sequenza nucleotidica, 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). Il progetto genoma ha identificato 6300 geni (Goffeau *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 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. Molte *open reading frames* (ORF) del genoma di lievito rimangono ancora senza una funzione assegnata (Costanzo *et al.* 2001; Sickmann *et al.*, 2003), ma nonostante questo *S. cerevisiae* è attualmente uno degli organismi eucariotici nel quale analisi sia genomiche che proteomiche 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). Questo è stato possibile per due ragioni: la scarsità di introni e la possibilità di comparare le sequenze geniche con altri 13 genomi di lieviti emicomiceti parzialmente sequenziati che ha notevolmente facilitato la scoperta di geni (Blandin *et al.*, 2000). Grazie all'elevata efficienza di ricombinazione omologa propria di *S. cerevisiae*, è stata generata una collezione di ceppi di lievito, sia in contesto aploide che diploide, che comprende 5943 differenti delezioni geniche (Winzeler *et al.*, 1999).

È interessante notare che il 46% delle proteine umane note possiede omologhi in lievito e che il 31% delle proteine codificate dal genoma lievito possiede un ortologo umano (Venter *et al.*, 2001).

Le proteine conservate tra il lievito e l'uomo 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 biogenesi del mitocondrio; spesso però hanno architetture diverse dei loro domini, le proteine umane hanno strutture più complesse. Nonostante ciò diversi studi hanno dimostrato 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). Pertanto il lievito è diventato uno strumento insostituibile per lo studio di geni umani associati a patologie a funzione ignota identificati attraverso il clonaggio posizionale.

Un'altra caratteristica estremamente importante e peculiare del *S. cerevisiae* è che, diversamente dalla maggior parte degli organismi eucariotici, può sopravvivere anche in assenza della funzionalità respiratoria e in presenza di delezioni parziali o totali del DNA mitocondriale purché abbia a disposizione una fonte di carbonio fermentabile (Tzagoloff and Dieckmann, 1990).

Tale caratteristica rende il lievito particolarmente utile per lo studio della biogenesi mitocondriale e delle basi molecolari di patologie umane dovute a disfunzioni del metabolismo 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. I mutanti *petite* possono derivare sia da mutazioni in geni nucleari (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 con una frequenza molto elevata, pari a circa l'1-2%, in quanto il DNA mitocondriale è soggetto a un'elevata frequenza di mutazione. (Nagai *et al.*, 1961; Dujon, 1981; Campbell and Duffus, 1988 e Contamine and Picard, 2000). La frequenza della comparsa dei *petite* è comunque variabile a

seconda del ceppo, della ploidia e delle condizioni di crescita. Grazie alla 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*.

In *S. cerevisiae* alcuni fenotipi correlati alla disfunzione del metabolismo mitocondriale sono facilmente osservabili; infatti mutazioni che inibiscono la funzionalità mitocondriale possono determinare riduzione o inibizione della crescita su fonti ossidabili, alterazione degli spettri di assorbimento dei citocromi respiratori, alterazione dell'attività respiratoria.

Diversi studi hanno dimostrato che il lievito è un sistema modello adatto per dimostrare la patogenicità delle mutazioni che vengono ritrovate in geni coinvolti in malattie mitocondriali (Fontanesi *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2005; Schwimmer *et al.*, 2005; Spinazzola A. *et al.*, 2009; Rinaldi *et al.*, 2010; Baruffini *et al.*, 2011).

La diagnosi delle patologie mitocondriali, come è già stato sottolineato, è spesso piuttosto complessa, soprattutto di quelle che coinvolgono mutazioni in geni nucleari, in cui spesso è difficile correlare un dato fenotipo ad una mutazione genica. Infatti, mutazioni nello stesso gene possono generare sintomi diversi e mutazioni in differenti geni possono portare al medesimo fenotipo patologico. Di conseguenza, anche quando è possibile trovare diverse famiglie con componenti che presentano gli stessi sintomi, non ci sono garanzie che essi presentino lo stesso difetto genetico (Chinnery, 2003). L'incremento delle conoscenze relative a geni nucleari implicati in patologie mitocondriali è il risultato dello sviluppo della tecnica del clonaggio posizionale (*Positional cloning*): essa prevede la mappatura della regione cromosomica contenente il gene associato alla malattia mediante analisi di *linkage* condotte nelle famiglie dei pazienti, attraverso l'individuazione di polimorfismi vicini al *locus* patologico che pertanto vengano ereditati con il gene mutato (Collins, 1995). Tale analisi, però, è possibile solo se si hanno a disposizione famiglie numerose, con più membri affetti dalla malattia; inoltre l'affidabilità dell'analisi dipende da quanto è stretta l'associazione tra polimorfismo e *locus* della malattia. L'identificazione di geni nucleari associati a patologie mitocondriali attraverso il clonaggio posizionale è limitata perché la maggior parte delle famiglie sono piccole e spesso solo un membro è colpito dalla malattia, inoltre il fenotipo clinico è solitamente complesso. Il clonaggio posizionale identifica delle regioni cromosomiche che dovrebbero contenere il difetto genetico, regioni che, in generale, contengono più geni. E' possibile dunque che vi sia un solo gene candidato, ma è anche possibile che vi siano più geni, di cui magari nessuno è noto codificare proteine mitocondriali (Chinnery, 2003). Pertanto al clonaggio posizionale segue, in generale, il sequenziamento di uno o più geni per identificare mutazioni potenzialmente patologiche.

L'identificazione di una mutazione patologica è complicato perché fra i diversi individui sono presenti polimorfismi, che rendono difficoltosa l'identificazione di una mutazione patologica e, anche nel caso in cui vi sia un solo polimorfismo, non è detto che questo sia effettivamente la mutazione patologica. Inoltre anche qualora vi fosse una mutazione deleteria, quale la presenza di un codone di stop, non è detto che questa sia la vera causa della patologia e non piuttosto una mutazione non correlata.

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 è ovviamente ancora più importante nei casi sporadici, quando non è disponibile la storia familiare del paziente.

Per la validazione nel modello lievito possiamo sfruttare diverse strategie, come la complementazione eterologa. Si sfrutta la collezione di deletanti di *S. cerevisiae*: in particolare il gene ortologo umano, sia nella forma selvatica che nelle sue forme mutate, viene inserito mediante trasformazione nel mutante nullo di lievito, in modo da stabilire la possibile relazioni genotipo/fenotipo. Tramite questa strategia di complementazione funzionale, da una parte si può confermare il ruolo del gene umano e dall'altra si può validare la mutazione associata alla disfunzione mitocondriale. Tramite questo approccio è stato possibile identificare vari ortologi umani di proteine mitocondriali di lievito (Valnot *et al.*, 2000; De Lonlay *et al.*, 2001).

Non sempre, però, esistono gli ortologi di geni umani in lievito, oltre al fatto che non sempre ad una omologia di sequenza corrisponde una omologia funzionale fra geni umani e di lievito.

Un'altra strategia consiste nell' inserire tramite mutagenesi sito-specifica, mutazioni "patologiche" nei geni di lievito ortologi a geni che, mutati, conferiscono la malattia. In questo modo si può capire, sulla base delle analisi fenotipiche se la mutazione in questione è causa della malattia (validazione) e successivamente si può cercare di comprendere i meccanismi molecolari attraverso cui la mutazione agisce.

Il lievito è anche un ottimo modello per studiare gli effetti di mutazioni recessive e per determinare la dominanza/recessività di una mutazione.

1.6.1 *Saccharomyces cerevisiae* COME MODELLO DI PATOLOGIE ASSOCIATE A MUTAZIONI DELLA SUCCINATO DEIDROGENASI?

La scoperta del legame tra mutazioni nei geni SDH e la comparsa di paraganglioma o feocromocitoma ha portato a uno screening genetico dei pazienti, anche in assenza di una chiara storia familiare. Tale *screening* prevede la sequenza di tutti i geni di suscettibilità finora noti mediante amplificazione PCR utilizzando come template il DNA estratto dai linfociti dei pazienti

affetti (Bayley *et al.*, 2006). Queste analisi possono portare all'identificazione di nuove varianti nei geni di suscettibilità *SDH* che a priori non possono essere classificate come mutazioni causa/predisponenti alla patologia. Infatti oltre a mutazioni non senso o estese delezioni, che si possono assumere come patogene per le sindromi PGL, si possono ritrovare mutazioni missenso, sostituzioni che modificano i siti di *splicing*, piccole inserzioni o delezioni *in-frame* che sono di incerto significato. Anche i geni di individui sani possono presentare varianti di sequenza e la grande maggioranza di queste possono essere completamente innocue o non avere alcun effetto noto sul fenotipo. Alcune varianti possono essere patogene solo in particolari condizioni di stress, come la carenza di ossigeno in alcuni casi di paraganglioma oppure possono predisporre alla malattia, che si manifesta solo in combinazione con altre varianti geniche. Per questi motivi i cambiamenti che si limitano a sostituire un amminoacido con uno diverso, conseguenza di una mutazioni missenso, sono più difficili da interpretare.

Si rende pertanto necessario validare la mutazione ovvero stabilire se c'è un legame causa-effetto tra mutazione e malattia; questo richiede l'utilizzo e l'integrazione di diversi approcci tra cui l'analisi dell'albero genealogico, l'analisi funzionale in linee cellulari mutanti o in sistemi modello creati *ad hoc*, analisi bioinformatiche e analisi immunoistochimiche. Relativamente a questo ultimo approccio recentemente è stato messo a punto un protocollo immunoistochimico specifico che valuta direttamente sul tessuto tumorale l'attività SDH in quanto si ha una perdita di colorazione per il ferro, contenuto nella sub-unità SdhB del complesso II. È stato dimostrato su una serie di 220 paragangliomi e feocromocitomi che 102 tumori che presentavano una mutazione in uno dei geni *SDH* erano negativi per la colorazione della sub-unità SdhB, mentre quando le mutazioni erano nei geni *RET*, *VHL* e *NF1* i tessuti risultavano positivi.

Per quanto riguarda l'analisi dell'albero genealogico, questo non sempre è fattibile in quanto diversi sono i casi sporadici di malati per i quali non si hanno informazioni familiari e anche nei casi in cui vi sia un quadro familiare compatibile di associazione mutazione-patologia, non si può avere la garanzia che quella sia davvero la causa della malattia. Qualora, infatti, un gene mutato, vicino al gene identificato inizialmente nei malati, fosse la causa della patologia potrebbe non essere stato scoperto e, in quanto ereditato insieme all'altro, rimanere sconosciuto.

Attraverso un approccio di tipo bioinformatico si tenta di predire quali siano i possibili effetti di una mutazione sulla conformazione nativa dell'enzima, in relazione al suo funzionamento.

Come è già stato accennato per distinguere fra varianti innocue o mutazioni è possibile valutare "funzionalmente" l'anomalia genetica identificata misurando con test specifici quanto "funziona" la proteina prodotta da quella particolare anomalia. Per quanto riguarda il sistema della succinato deidrogenasi non sono disponibili linee cellulari umane derivate dalla cresta neurale per poter fare studi funzionali, né modelli animali adeguati.

In studi recenti *S. cerevisiae* è stato utilizzato per studiare le conseguenze di specifiche mutazioni nei geni *SDH* sull'attività enzimatica e respiratoria del complesso II (Guo *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007; Szeto *et al.*, 2007).

Allo scopo quindi di valutare le conseguenze di specifiche mutazioni missenso ritrovate in pazienti affetti da paraganglioma nei geni *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* e di analizzarne la patogenicità ci si è chiesti se il lievito potesse essere un buon modello anche per lo studio di questa nuova disfunzione mitocondriale associata al cancro.

SCOPO DEL LAVORO

Da circa tre anni è in atto una collaborazione tra il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di Dottorato e i Dipartimenti Clinici delle Università di Firenze (Prof. M. Mannelli), Padova (Prof. G. Opocher), Brescia (Prof. M. Castellano) e Friburgo (Prof. H. Neumann) dove, tramite sequenziamento del DNA di leucociti provenienti dai pazienti affetti da sindromi PGL sono state trovate mutazioni, alcune delle quali non ancora descritte, a carico dei tre geni di suscettibilità *SDHB*, *SDHC* e *SDHD*.

Il presente progetto di tesi si propone come prima cosa lo studio in lievito di una nuova mutazione missenso, C191Y, trovata nel gene *SDHB* in una paziente affetta da un tumore al glomo carotideo per valutare l'attendibilità del modello da noi proposto. Successivamente verranno creati in lievito fenotipi biochimici dovuti a una serie di mutazioni missenso nei geni *SDHB*, *C*, e *D* al fine di analizzare se ci sia una relazione tra le patologie PGL e specifiche mutazioni (validazione).

Il modello lievito potrà poi contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari attraverso i quali mutazioni nelle diverse sub-unità costituenti lo stesso complesso mitocondriale, la succinato deidrogenasi, possano portare all'insorgenza di una sindrome proliferativa, "*paraganglioma-pheochromocytoma associated syndrome*", e sul ruolo svolto dai mitocondri alterati nell'instaurarsi della patologia. Infatti, anche se l'analisi dei tessuti tumorali di pazienti affetti può dare informazioni riguardo alla biologia cellulare di tali tumori, per poter studiare l'effetto delle diverse mutazioni della *SDH*, come l'aumento di ROS, l'accumulo di succinato o la stabilità del mtDNA è molto vantaggioso poter utilizzare il lievito come modello.

2. Materiali e metodi

2.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI

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

NOME	GENOTIPO	REFERENZA
BY4741	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Collezione Euroscarf (Brachmann et al., 1998)
BY4741 Δ <i>sdb2</i>	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> <i>SDH2::KanMX4</i>	Collezione Euroscarf (Brachmann et al., 1998)
BY4741 Δ <i>sdb4</i>	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> <i>SDH2::KanMX4</i>	Collezione Euroscarf (Brachmann et al., 1998)
BY4741 Δ <i>ylr164w</i>	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> <i>YLR164w::KanMX4</i>	Collezione Euroscarf (Brachmann et al., 1998)
BY4741 Δ <i>sdb4</i> Δ <i>ylr164w</i>	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> <i>SDH4::KanMX4 YLR164w::Higro'</i>	Questo lavoro
W303-1B	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15</i> <i>can1-100</i>	Thomas and Rothstein (1989)
W303-1BΔ <i>sdb3</i>	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15</i> <i>can1-100 SDH3::Higro'</i>	Questo lavoro

2.2 CEPPI BATTERICI UTILIZZATI

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

NOME	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 1%.
- **TERRENO MASSIMO (YPA):** Terreno YP addizionato di Adenina 75 mg/L.
- **TERRENO MINIMO (YNB + DO):** YNB w/o aa w/o NH₄SO₄ (FORMEDIUM) 1,9 g/L, NH₄SO₄ 5 g/L, addizionato di Drop-out, secondo la formula di Kaiser (Kaiser *et al.*, 1994) (adenina 1 g (1%), alanina 2 g (3.96%), arginina 2 g, asparagina 2 g, acido aspartico 2 g, glutammina 2 g, acido glutammico 2 g, glicina 2 g, istidina 2 g, inositolo 2 g, isoleucina 2 g, leucina 10 g (19.8%), lisina 2 g, metionina 2 g, fenilalanina 2 g, prolina 2 g, serina 2 g, treonina 2 g, triptofano 2 g, tirosina 2 g, uracile 2 g, valina 2 g) a seconda delle opportune auxotrofie dei diversi ceppi.

I terreni vengono all'occorrenza solidificati aggiungendo Agar (ForMedium™) 2%. Ogni terreno veniva addizionato di una o più fonti di carbonio a diverse concentrazioni. Le fonti utilizzate sono state glucosio, 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%.

La temperatura ottimale di crescita per *S. cerevisiae* è di 28°C. Le crescite in terreno liquido vengono condotte in agitazione costante.

Per la crescita di *E. coli* sono stato utilizzato il seguente terreno:

- **TERRENO LB :** Bacto-triptone (DIFCO) 1%, Estratto di lievito (DIFCO) 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7,2-7,5
- **TERRENO LBA:** Terreno LB addizionato di Ampicillina (SIGMA) 100 mg/L.

I terreni vengono all'occorrenza solidificati aggiungendo Agar (FORMEDIUM) 2%.

Le colture di *E. coli* vengono 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 et al., 1991	2.1
pYEX-BX	<i>URA3</i> , leu2-d	Vettore shuttle, vettore di espressione ad alto numero di copie	Clontech Laboratories	2.2
pAG32		Vettori di <i>E. coli</i>	Goldstein and McCusker, 1999	2.3

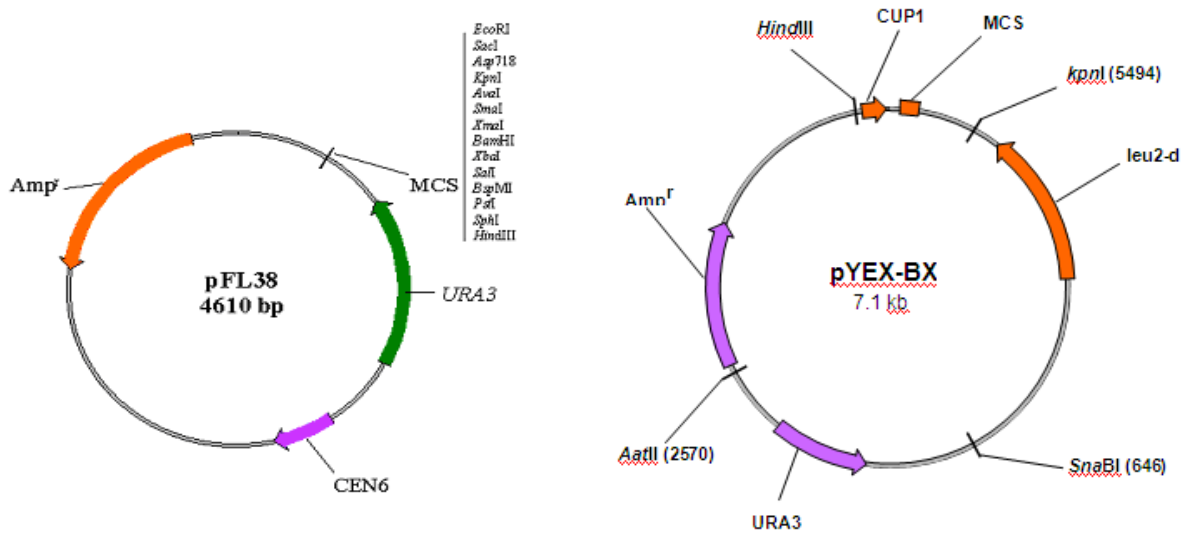


Fig 2.1: Plasmide pFL38

Fig 2.2: Plasmide pYEX-BX

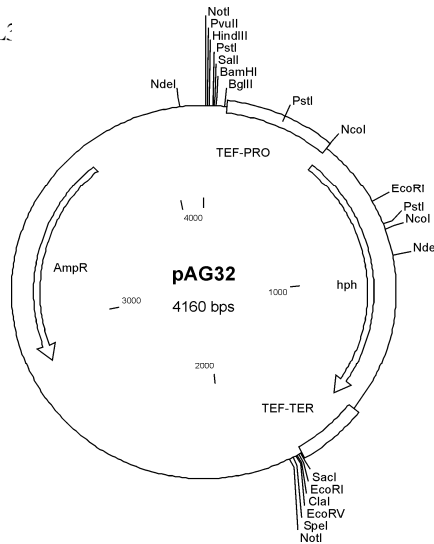


Fig 2.3: Plasmide pFL38

2.5 POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Tutte le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.

2.5.1 AMPLIFICAZIONI STANDARD

Per le classiche reazioni di amplificazione è stata utilizzata la polimerasi “KOD Hot Start” (Novagen®): essa è dotata di caratteristiche di elevata processività ed alta fedeltà. In questo studio tale polimerasi è stata utilizzata per amplificare la cassetta di delezione Hyg^R; per l'amplificazione dei geni *SDH2*, *SDH3* e *SDH4*, per tutti è stato utilizzato come template il DNA genomico dei ceppi di lievito; per la costruzione della sonda utilizzata per le analisi di espressione del gene *SDH2*, a partire da DNA plasmidico.

Come il produttore suggerisce, come template si fa uso di 10 ng di DNA plasmidico e di circa 100 ng di DNA genomico per un volume finale di reazione di 50 µl. Per portare il mix di reazione al volume finale voluto si utilizza H₂O bidistillata sterile e filtrata. La composizione del mix di reazione è descritta in tabella:

KOD Hot Start	Volume Mix	Conc.	Conc. Finale
Templato	X µl	Y ng/ml	10 – 100ng
Primer A	1,5 µl	10 µM	0,3 µM
Primer B	1,5 µl	10 µM	0,3 µM
MgSO ₄	3 µl	25 mM	1,5 mM
dNTPs	5 µl	2 mM	0,2 mM
KOD buffer	5 µl	10X	1X
KOD pol.	1 µl	1 U/µl	0,02 U/µl
H ₂ O	fino a vol		
Volume finale	50 µl		

L'amplificazione con la KOD polimerasi ha utilizzato i seguenti parametri:

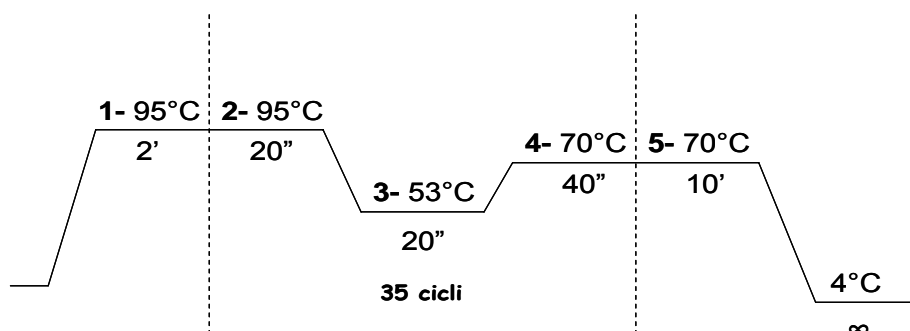


Fig 2.4: Condizioni standard di PCR con KOD polimerasi. 1 denaturazione iniziale; 2 Denaturazione; 3 Annealing; 4 extension; 5 Final extension.

2.5.2 PCR DA COLONIA

La PCR da colonia è una amplificazione che utilizza come “templato” le cellule intere di lievito che vengono rotte per trattamento al calore in uno step preliminare alla reazione di amplificazione vera e propria, condotto già nel termociclatore. Non è richiesta una estrema fedeltà della polimerasi perché solitamente si utilizza per le analisi di controllo.

In questo studio per PCR da colonia di *S. cerevisiae* si è utilizzata la “GoTaq® DNA Polimerase” (Promega) con lo scopo di controllare la corretta integrazione della cassetta Hyg^R

È stato utilizzato il protocollo seguente:

1. Sospendere in sterilità una piccola quantità di cellule (proveniente da un singolo clone) in 10 µl di H₂O bidistillata sterile.
2. Preparare un MIX PCR e un MIX Taq i cui volumi sono dipendenti dal numero di campioni da analizzare. Vengono riportati i volumi delle componenti dei due MIX/campione:

Mix PCR	Volume Mix	Conc. Iniziale	Conc. Finale
Primer A	1,5 µl	25 µM	0,75 µM
Primer B	1,5 µl	25 µM	0,75 µM
MgCl₂	3 µl	25 mM	1,5 mM
dNTPs	1 µl	10 mM	0,2 mM
GoTaq®Flexi Buffer	5 µl	10X	1X
H₂O	fino a vol		
Volume finale	42 µl		

Mix GoTaq	Volume Mix	Conc. Iniziale	Conc. Finale
GoTaq®DNA Pol.	0,2 µl	5 U /µl	1 U
H₂O	fino a vol		
Volume finale	µl		

3. In eppendorf da PCR aggiungere 42 µl di MIX PCR per campione e 3 µl di sospensione cellulare vortexata brevemente.
4. Bollire la soluzione a 95°C per 15 minuti direttamente in termociclatore.
5. Al termine dei 15 minuti fermare il termociclatore, trasferire i campioni in ghiaccio e aggiungere 5 µl di MIX Taq ad ogni campione.
6. Portare a termine la PCR alle condizioni scelte, per 35 cicli.

Le condizioni utilizzate per le PCR da colonia sono state le seguenti:

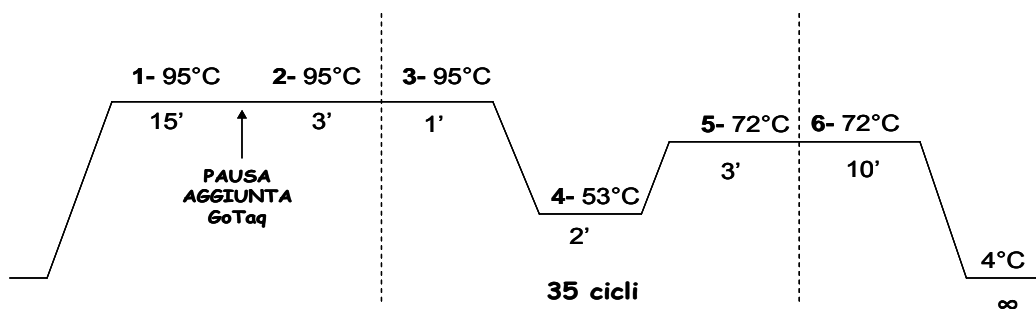


Fig. 2.5: Condizioni PCR con GoTaq polimerasi. 1 Rottura iniziale delle cellule; 2 denaturazione iniziale; 3 Denaturazione; 4 Annealing; 5 extension; 6 Final extension.

2.5.3 PRIMER

In tabella 2.1 sono riportati i primer utilizzati per le distruzioni, i clonaggi e primer interni ai geni che sono serviti per la costruzione di sonde o il controllo delle distruzioni. I primer utilizzati, diluiti 25 μ M, a partire da una madre concentrata 100 μ M, sono riassunto nella tabella seguente:

Tabella 2.1:

NOME	SEQUENZA 5'-3'
Distruzione ^a	
FSDH3kan	AGCTCTAAGAATAATAAACGATGTCTGCAATGATGGTCAAGTTAGGACT GCGTACGCTGCAGGTCGAC
RSDH3kan	GTAGAAACAGGTGCGTCGCCTTAAAGAATCATAAATCATAAAGTTAATAA ATCGATGAATTCGAGCTCG
YLR164HYGF	CAGTGGACAGACCGTTTATCAGTTCTAATGAATCAGCAACCGTACGCTGC AGGTCGAC
YLR164HYGR	GGTAGTCACCACTAACCAAACCATATGATTAATGATGAATCGATGAAT TCGAGCTCG
Clonaggio ^b	
HSDH2F	CGCGAAGCTTGCTGAGGTGCAAATGGCCACCC
SSDH2R	CCCCGTCGACCACCTTGTCGCCTAGATGG
ESDH4F	CGCGGAATTCCGATTAGGCGTCAAGTCCTTAG
XSDH4R	CCCCTCTAGACGGAGCTGGGAAACAAAGCTC
BSDH3F	GCGCGGATCCGCCGCTATCTAGGTCTCTCC
PSDH3R	CCCCCTGCAGGCTTCAATAAGTATCCGG
Controllo distruzione	
K2	GAAAGAAGAACCTCAGTGGC
FYLR164WB	CCCCGGATCCGATGCCCTGAGAGCAA

RYLR164WH	CCCCAAGCTTGTTCATTCA
Costruzione sonda	
FinS2	CTGCAGCTACGCATACCCCCAG e SSDH2R

2.6 MUTAGENESI SITO SPECIFICA

L'applicazione del protocollo QuickChange® *XL Site Directed Mutagenesis kit* su DNA di interesse permette di ottenere sostituzioni di aminoacidi, mutazioni puntiformi ed eventualmente delezioni o inserzioni di uno o più aminoacidi nella proteina codificata dal gene oggetto di mutagenesi.

Il protocollo prevede l'utilizzo di una polimerasi ad alta fedeltà come la PfuTurbo®, di un termociclatore, di un DNA a doppio filamento che funga da template e di primer specifici contenenti la mutazione che si vuole inserire. Il DNA utilizzato come template, normalmente, non è altro che un vettore contenente il gene di interesse, isolato da un microrganismo metilante (dam^+); i due primer sono oligonucleotidi contenenti la mutazione desiderata, complementari ai filamenti opposti del vettore: tali primer, una volta appaiati al template, vengono estesi dalla DNA polimerasi durante la fase di estensione nel termociclatore e vengono incorporati nel nuovo plasmide che si forma, il quale conterrà così la mutazione desiderata. Come per una normale reazione di PCR, cicli successivi di annealing ed estensione dei primer mutageni portano ad ottenere una grande quantità di plasmide mutato che, tuttavia, conterrà due nick vicino ai primer sui filamenti opposti del vettore.

Per prima cosa è necessario disegnare i primer contenenti la mutazione desiderata e ottenere, mediante estrazione da cellule batteriche dam^+ , il vettore contenente l'inserito da mutare, che fungerà da template.

È preferibile preparare più reazioni di mutagenesi per ogni campione utilizzando diverse concentrazioni di DNA template e mantenendo costante la concentrazione dei primer. Per la preparazione delle reazioni si deve seguire il seguente schema:

BUFFER 10X	5 μ l
dsDNA (template)	Da 5 a 50ng
Primer #1	125ng
Primer #2	125ng
Mix dNTP	1 μ l
Acqua	Fino ad arrivare a un V_f di 50 μ l
PfuTurbo	1 μ l

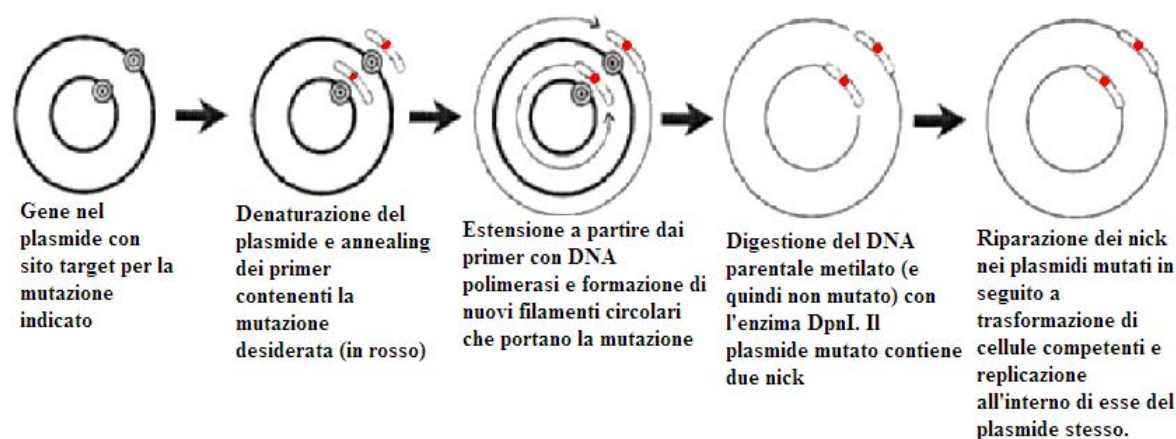
Le reazioni così costituite vengono poste all'interno del termociclatore impostato con il seguente programma:

Temperatura	Tempo	N° cicli
95°C	30 sec	1
95°C	30 sec	
55°C	1 min	Da 12 a 18 a seconda
68°C	1 min/Kb di lunghezza del templat	della mutazione desiderata

Il numero di cicli varia in ragione della mutazione che dobbiamo inserire. Nel caso di una mutazione puntiforme sono sufficienti anche solo 12 cicli, se si tratta del cambiamento di un singolo amminoacido ne servono almeno 16, mentre se andiamo a fare una inserzione o una delezione multipla di amminoacidi sono necessari almeno 18 cicli ripetuti. Terminato il passaggio nel termociclatore le eppendorf sono poste in ghiaccio per due minuti al fine di abbassare la temperatura al di sotto di 37°C. A questo punto, all'interno dei nostri tubi di reazione, si hanno tre tipi di plasmidi:

- Plasmidi parentali: costituiti da entrambi i filamenti non mutati
- Plasmidi misti: costituiti da un filamento neosintetizzato, che quindi porta la mutazione, e da uno parentale non mutato
- Plasmidi mutati: che portano su entrambi i filamenti la mutazione.

Per riuscire ad ottenere solo questi ultimi è necessario operare una digestione utilizzando l'enzima *DpnI*. Tale enzima riconosce la sequenza 5'-Gm⁶ATC-3' ed è in grado di digerire DNA metilato ed emimetilato. Poiché il nostro templat derivava da un microrganismo metilante (*dam*⁺) e la reazione di amplificazione è stata condotta in vitro, quindi senza enzimi in grado di metilare il DNA, solamente il DNA parentale sarà degradato in seguito al trattamento e si otterranno solo i plasmidi mutati. Per il trattamento con l'enzima si aggiunge 1µl di *DpnI* ad ogni eppendorf contenente i prodotti di reazione, si miscela dolcemente, si centrifuga la eppendorf per 1 minuto a 7000-8000 giri e si ripone in termostato a 37°C per 1 ora. Con i plasmidi mutati ottenuti è poi possibile trasformare cellule batteriche competenti. Con la replicazione del vettore contenente l'inserito mutato all'interno della cellula trasformata vengono anche eliminati i due nick e si ottengono normali plasmidi contenenti il gene che porta la mutazione voluta.



2.6.1 PRIMER MUTAGENESI SITO SPECIFICA DEGLI GENI *SDH2* *SDH3* E *SDH4*

Nelle tabelle 2.2, 2.3 e 2.4 sono riportati i primer per la costruzione degli alleli mutati dei geni *SDH2*, *SDH3* e *SDH4* rispettivamente. I primer utilizzati per la mutagenesi sito specifica, diluiti 25 μM , a partire da una madre concentrata 100 μM , sono riportati in tabella (le sequenze sottolineate corrispondono ai cambiamenti di base introdotti):

Tabella 2.2

OLIGONUCLEOTIDI UTILIZZATI PER <i>SDH2</i>		AA
SEQUENZE (5'-3')		
MUTAGENESI SITO SPECIFICA		
FS8F	TAGGGATGTTGAACGTG <u>T</u> <u>T</u> CTTGAGAAGGAAGGCC	S8F
RS8F	GGCCTTCCTTCTCAAG <u>A</u> <u>A</u> CACGTTCAACATCCCTA	
FR46S2	GATTGAAAACTTTTAAAGTTTACT <u>T</u> ATGGAATCCAGACGAGCCAAG	R46L
RR46S2	CTTGGCTCGTCTGGATTCCAT <u>A</u> <u>A</u> GTAACCTTTAAAAGTTTTCAATC	
FR46Q	CCAGATTGAAAACCTTTTAAAGTTTAC <u>C</u> ATGGAATCCAGACGAGC	R46Q
RR46Q	GCTCGTCTGGATTCCAT <u>T</u> GGTAAACCTTTAAAAGTTTTCAATCTGG	
FL65S2	TACAGTCATATCAAGTGGAT <u>A</u> <u>G</u> GAAATGACTGTGGGCCCATGGT	L65R
RL65S2	ACCATGGGCCACAGTCATT <u>C</u> ATCCACCTTGATATGACTGTA	
FK80S2	CTTGATGCGCTGTTAAAGATC <u>G</u> AAGACGAACAGGATTCTACCCT	K80E
RK80S2	AGGGTAGAATCCTGTTCTG <u>T</u> CGATCTTTAACAGCGCATCAAG	

FR90Q	CAGGATTCCTACCCTAACTTTT <u>C</u> AAAGATCATGTAGAGAAGGT	R90Q
RR90Q	ACCTTCTCTACATGATCTTT <u>G</u> AAAAAGTTAGGGTAGAATCCTG	
F127S2	ACGAATCCAAACAACCTCAAG <u>G</u> TTTATCCATTACCCCACATGTT	I127V
RI127S2	AACATGTGGGGTAATGGATA <u>A</u> ACCTTGAGTTGTTTGGATTTCGT	
FR177S2	GTGCTACAAAGTATTTGAAGATC <u>A</u> TAAGAAACTGGATGGTCTTTAC	R177H
RR177S2	GTAAGACCATCCAGTTTCTTAT <u>G</u> ATCTTCAATACTTTGTAGCAC	
S2M forward	CGAATGTATTCTGTGTGCATAT <u>T</u> GCTCTACTTCATGTCCATC	C191Y
S2M reverse	CGATGGACATGAAGTAGAGCA <u>A</u> TATGCACACAGAATACATTCG	
FC196S2	GTGCATGCTGCTCTACTTCATG <u>G</u> CCATCGTACTGGTGGAACCA	C196W
RC196S2	TGGTTCACCAGTACGATGG <u>C</u> CATGAAGTAGAGCAGCATGCAC	
FR217S2	CCGTGCTAATGCAAGCCTACCTTTGGCTAATTGACTCTAGAGAC	R217L
RR217S2	GTCTCTAGAGTCAATTAGCCA <u>A</u> CGGTAGGCTTGCATTAGCAGGG	
FR242C	CTCCATGTCATTGTACT <u>G</u> CTGTGCACACCATCATGAAC	R242C
RR242C	GTTTCATGATGGTGTGACAG <u>C</u> AGTACAATGACATGGAG	
FR242S2	CAACTCCATGTCATTGTACAGTTGTGCACACCATCATGAAGTG	R242S
RR242S2	GAGTTCATGATGGTGTGAC <u>A</u> ACTGTACAATGACATGGAGTTG	
FG260S2	GTCCAAAGGGCTTGAATCCT <u>C</u> GTTTGGCTATTGCTGAAATTAAG	G260R
RG260S2	CTTAATTTTCAGCAATAGCCAAAC <u>G</u> AGGATTCAAGCCCTTTGGAC	

Tabella 2.3:

OLIGONUCLEOTIDI UTILIZZATI PER <i>SDH3</i>		AA
SEQUENZE (5'-3')		
MUTAGENESI SITO SPECIFICA		
FR50CS3	TAAACAAGCAAAGAGCAAAG <u>TGTC</u> CTATTTCTCCACATCTGAC	R50C
RR50CS3	GTCAGATGTGGAGAAATAGGACACTTTGCTCTTTGCTTGTTTA	
FI58TS3	CTATTTCTCCACATCTGACCA <u>CT</u> TACCAGCCACAATTAAGTTG	I58T
RI58TS3	CAAGTTAATTGTGGCTGGTAAGTGGTCAGATGTGGAGAAATAG	
FT193MS3	CACCGCCGTTCCTCGGTA <u>TGT</u> ATTTATTAAGTTTATGA	T193M
RT193MS3	TCATAAAGTTAATAAAATACATACCGAGAACGGCGGTG	
FM164LS3	CACCGCCGTTCCTCGGTT <u>TGT</u> ATTTATTAAGTTTATGA	M164L
RM164LS3	TCATAAAGTTAATAAAA <u>AC</u> ATACCGAGAACGGCGGTG	

Tabella 2.4:

OLIGONUCLEOTIDI UTILIZZATI PER <i>SDH4</i>		AA
SEQUENZE (5'-3')		
MUTAGENESI SITO SPECIFICA		
FH50R	CCAATGATGCC <u>CG</u> TCCCCCCCCC	H50R
RH50R	GGGGGGGGACG <u>CG</u> GGGCATCATTGG	
FP53L	TGATGCCTACGTCCCC <u>TC</u> CCCTGAGAATAAATTAGA	P53L
RP53L	TCTAATTTATTCTCAGGGAGGGGGACGTAGGCATCA	
FE112GS4	TTTTGGGATATTGTTACATGG <u>GT</u> TTTAACTCTTGTATCACCG	E112G
RE112GS4	CGGTGATACAAGAGTTAAA <u>ACC</u> CATGTAACAATATCCCAAAA	

FG106DS4	TTTTGGGATATTGTTACATGGATTTTAACTCTTGTATCACCG	G106D
RG106DS4	CGGTGATACAAGAGTTAAAATCCATGTAACAATATCCCAAAA	

2.7 MANIPOLAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

2.7.1 DIGESTIONE CON ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE

Per le reazioni di restrizione si fa uso di enzimi Biolabs e relativi tamponi consigliati. Normalmente il volume in cui si conduce la reazione è di 20µl con 2µl di Buffer10X, 1-2 U di enzima, 0.5-2µg di DNA e H₂O bidistillata fino a volume. Dove consigliato si aggiunge BSA in concentrazione finale 1X. Nel caso di digestioni doppie si controllano sul server Biolabs le condizioni consigliate per la reazione.

L'incubazione avviene a 37°C per almeno due ore.

2.7.2 ELETTROFORESI SU GEL ED ESCISSIONE DA BANDA

Condotta facendo uso di gel concentrati allo 0,8-1% e tampone di corsa (TAE) e di caricamento (Loading Buffer) secondo Sambrook and Russel (2001).

Si aggiunge l'agarosio al tampone TAE 1X, si porta a ebollizione e poi si lascia raffreddare fino a raggiungere la temperatura di 50°C; si aggiungono 2 µl di etidio bromuro che si intercala alle basi del DNA conferendogli fluorescenza alla lunghezza d'onda di 254 nm. Il gel viene quindi colato in un opportuno supporto in cui sono posizionati appositi pettini per la formazione dei pozzetti in cui viene caricato il campione. Una volta che il gel è solidificato, il supporto viene trasferito nella cella elettroforetica riempita di tampone TAE 1X fino a ricoprire completamente il gel.

Ai campioni da caricare si aggiunge il "Dye" costituito da glicerolo 30%.

Per l'escissione da banda, 100-500 mg di gel vengono scissi con una lama. L'estrazione da gel veniva condotta col kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), risospesando in un volume finale di acqua pari a 40-50 µl.

2.7.3 PURIFICAZIONE E PRECIPITAZIONE DEL DNA

La purificazione dei prodotti di amplificazione PCR, come pure del DNA exciso da gel di agarosio, avviene con il kit commerciale "Wizard® Gel and PCR Clean-Up System" (Promega).

Per precipitare il DNA si aggiunge 1/10 del volume del DNA di partenza di Sodio Acetato 3M pH 5,2 e successivamente si tratta aggiungendo 2,5 volumi di etanolo 96%. Si pone poi la soluzione a -20°C over night o un paio d'ore a -80°C.

Il giorno successivo si centrifuga per 20 minuti a 4°C a 13000 giri, si aspira il surnatante con l'ago e si lascia asciugare il pellet sotto cappa. Infine si risospende il pellet in 20 µl di acqua bidistillata sterile.

2.8 TRASFORMAZIONI

2.8.1 TRASFORMAZIONE DI *Escherichia coli* MEDIANTE ELETTROPORAZIONE

E' stato utilizzato il seguente protocollo:

1. Mantenere la cuvetta da elettroporazione e il DNA plasmidico (il prodotto di una ligazione direttamente) in ghiaccio.
2. Una aliquota in eppendorf di cellule di *E. coli* elettrocompetenti (50µl) è mantenuta in ghiaccio fino a scongelamento delle cellule (circa 5 minuti).
3. Aggiungere 0.8 - 1µl di prodotto di ligazione alle cellule e mescolare con la pipetta mantenendo l'eppendorf in ghiaccio.
4. Trasferire tutta la soluzione in cuvetta ed elettroporare.
5. Trasferire in nuova eppendorf con 1 ml di LB ed incubare a 37°C per 1h.
6. Piastrare su terreno LBA ed Xgal + IPTG se necessario.

Le cellule di *E. coli* elettrocompetenti vengono ottenute seguendo il protocollo di Dower et al., 1988.

2.8.2 TRASFORMAZIONE DI *S. cerevisiae* MEDIANTE LIAC

Per la trasformazione di *S. cerevisiae* si seguono le indicazioni del protocollo di Gietz et Woods 2002:

- Giorno 1: Preparazione preinoculo
 - Inoculare le cellule in 10 ml di YPA Glu2%.
 - Incubare a 28°C o/n.
- Giorno 2: Trasformazione
 1. Preparare la soluzione di trasformazione (TRAFO).

Mix per 10 trasformazioni da effettuare con 5 µl di DNA:

 - 2400 µl di PEG 50%
 - 360 µl di LiAc 1M
 - 550 µl di DNA carrier (HS-ssDNA) 2 mg/ml (denaturarlo bollendo per 5 minuti e poi tenerlo almeno 2 minuti in ghiaccio)
 - 240 µl di H₂O bidistillata sterile
 - Volume finale 3550 µl

2. Prelevare 1.5 ml di precoltura e trasferire sterilmente in una eppendorf.
3. Centrifugare 5 minuti a bassa velocità ed eliminare il surnatante.
4. Aggiungere 355 µl di TRAF0 al pellet cellulare.
5. Aggiungere 5 µl di DNA (10-100 ng).
6. Vortexare a velocità elevata fino a risospendere il pellet (circa un minuto).
7. Incubare a 42°C per 1h e 30'.

Per esprimere un marcatore è necessario effettuare un passaggio di rigenerazione:

- I. Durante l'incubazione preparare in sterilità una provetta per ogni trasformazione contenente 2 ml di terreno YPA Glu2%.
- II. Centrifugare 15 secondi a 6000-8000 rpm e rimuovere il surnatante.
- III. Risospendere il pellet in 150 µl di H₂O bidistillata sterile.
- IV. Trasferire la sospensione cellulare nella provetta, sempre in sterilità.
- V. Incubare a 28°C in agitazione per 2-4 h e successivamente recuperare tutte le cellule in una singola eppendorf.
8. Centrifugare per 15 secondi a 6000-8000 rpm.
9. Risospendere in 1ml di H₂O bidistillata sterile e ricentrifugare.
10. Risospendere dolcemente in 1ml di H₂O bidistillata sterile. Determinare eventualmente la concentrazione cellulare e piastrare con sferette, diluendo se necessario.
11. Incubare a 28°C.

2.9 ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO

L'estrazione di DNA plasmidico da *E. coli* viene eseguita mediante kit commerciale "Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System" (Promega) che sfrutta un protocollo di lisi alcalina e purificazione mediante colonnine cromatografiche.

Alternativamente per estrarre DNA plasmidico da *E. coli* si segue il protocollo di Miniprep con Fenolo/Cloroformio secondo Sambroock and Russel (2001):

- 1) I batteri contenenti il DNA da estrarre vengono inoculati in falcon contenenti 2ml di terreno selettivo (LB + ampicillina) e vengono messi ad incubare in agitazione a 37°C over night.
- 2) Il giorno seguente si versa la coltura in eppendorf da 1.5 ml, si centrifuga per un minuto a temperatura ambiente a 13000 giri e si aspira il surnatante con l'ago.
- 3) Si risospende il pellet il 100 µl di una soluzione fredda contenente glucosio 50 mM, EDTA 10 mM e Tris HCl 25 mM in modo da favorire la rottura cellulare e si lasciano le eppendorf aperte a temperatura ambiente per 5 minuti.

- 4) Si aggiungono quindi 200 µl di una seconda soluzione preparata al momento con NaOH 10N e SDS 20% e si agitano le eppendorf per inversione.
- 5) Dopo averle lasciate chiuse in ghiaccio per 5 minuti si aggiungono 150 µl di una terza soluzione fredda contenente potassio acetato e acido acetico, agitando per inversione subito dopo l'aggiunta.
- 6) Si lasciano quindi le eppendorf in ghiaccio per 5 minuti, poi si centrifuga per 5 minuti a 4°C e si trasferisce il surnatante in nuove eppendorf.
- 7) A questo punto si aggiungono 450 µl della fase arancione di fenolo cloroformio (fenolo saturato basico), si vortexa e si centrifuga per 5 minuti a temperatura ambiente a 13000 giri per separare le fasi.
- 8) Si trasferiscono le fasi superiori in nuove eppendorf, si aggiunge 1 ml di etanolo 95%, si mescola per inversione e si lasciano le eppendorf chiuse a temperatura ambiente per 2 minuti.
- 9) Si centrifuga per 10 minuti a temperatura ambiente a 13000 giri e dopo aver aspirato il surnatante con l'ago si aggiungono 500 µl di etanolo 70%.
- 10) Si centrifuga per 5 minuti a temperatura ambiente a 13000 giri, si aspira il surnatante con l'ago lasciando il pellet il più asciutto possibile e si lascia quindi asciugare il pellet sotto cappa per circa 30 minuti.
- 11) Infine si risospende il pellet in acqua addizionata di RNasi (10 ng/ml) in modo da eliminare eventuali tracce di RNA.

2.10 ESTRAZIONE RNA E *NORTHERN BLOT*

2.10.1 ESTRAZIONE RNA

Materiali utilizzati:

- ACQUA+DEPC 1%
- TES: Tris 1M pH8, EDTA 0,5M pH8, SDS 20%, DEPC, acqua bidistillata sterile
- FENOLO SATURATO ACIDO: 50% fenolo, 50% fenolo cloroformio isoamilico saturato con acqua
- CLOROFORMIO ISOAMILICO: cloroformio 96%, alcol isoamilico 4%
- SODIO ACETATO: 3M pH 5,3

Protocollo:

Da una precoltura in terreno minimo addizionato di glucosio 2%, si effettua un inoculo in 50 ml di terreno minimo addizionato di glucosio 0.6% in modo che il giorno seguente le cellule siano cresciute ad 1OD.

Le cellule cresciute si raccolgono tramite centrifugazione e il pellet ottenuto si risospende in 2 ml di H₂O+DEPC 1%, suddividendo la sospensione ottenuta in due eppendorf per ceppo. Si centrifugano le eppendorf a 14000 rpm a 4 °C. Si aspira il surnatante con l'ago e si immergono le cellule per qualche secondo in azoto liquido; si possono in questo modo conservare a -80 °C o si può proseguire come indicato dal protocollo di estrazione. Si aggiungono 400 µl di TES e 400 µl di fenolo cloroformio saturato acido, per denaturare le proteine presenti in soluzione. Si agita per inversione per 10 secondi e si incubano le eppendorf nel termoblock a 65°C per 60 minuti, avendo l'accortezza di mescolare le soluzioni per inversione ogni 15 minuti. Terminata l'ora, si pongono le eppendorf in ghiaccio per 5 minuti e si centrifuga per ulteriori 5 minuti a 4°C a 14.000 giri. Si trasferisce la fase acquosa superiore ottenuta, in una nuova eppendorf a cui si aggiungono 400 µl di fenolo cloroformio saturato acido, per purificare gli acidi nucleici dalle proteine denaturate e dagli eventuali residui di membrane lipidiche. Si agita vigorosamente per 10 secondi e si ripongono le eppendorf in ghiaccio per 5 minuti; si centrifuga per 5 minuti a 4°C a 14.000 giri e si trasferisce la fase acquosa in una nuova eppendorf. Si esegue un lavaggio con 400 µl di cloroformio isoamilico e successivamente si precipitano gli RNA aggiungendo alla miscela 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 5,5 (40 µl), 1ml d'etanolo 96% freddo. Si lascia 30 minuti in azoto liquido 1 ora a -80°C o overnight a -20°C. Si procede centrifugando per 10 minuti a 4°C a 14.000 giri; si aspira il surnatante con l'ago e si aggiungono 500 µl d'etanolo 70% freddo per eliminare i sali. Si centrifuga per ulteriori 5 minuti a 4°C a 14.000 giri, si aspira il surnatante e si lascia asciugare il pellet sotto cappa, mantenendo le eppendorf in ghiaccio per prevenire l'azione delle RNasi. Quando il pellet è asciutto, si risospende l'RNA in 50 µl di H₂O+DEPC 1%. Il campione ottenuto può così essere congelato a -80 °C dopo una rapida immersione in azoto liquido.

2.10.2 QUANTIFICAZIONE RNA

Per ogni campione si esegue una diluizione 1:100, preparata mettendo in una cuvette di quarzo 996 µl d'acqua bidistillata e 4 µl di ciascun campione. Si utilizza uno speciale programma dello spettrofotometro Beckman DU®530 che permette di verificare la concentrazione dall'assorbanza degli acidi nucleici nel campione, considerando che 1 O.D. = 40 µg/ml di RNA. Il bianco è eseguito con 1 ml di acqua bidistillata sterile e ciascuna misura viene effettuata in doppio. Si quantizza misurando l'assorbanza a 260 nm (assorbimento tipico delle basi azotate) e a 280 nm (assorbimento tipico degli aminoacidi aromatici) e si calcola il rapporto A₂₆₀/A₂₈₀ per verificare la purezza dell'estrazione (il rapporto ideale è compreso tra 1.8 e 2.0). Si calcola poi la concentrazione espressa in µg/µl moltiplicando l'O.D. misurato a 260 nm per 40 µg/ml e per il fattore di diluizione; la concentrazione è data dalla media dei valori calcolati. E' importante

conoscere la concentrazione di ogni campione di RNA, per poter risalire al volume di campione necessario per caricare 20 µg di RNA per la successiva corsa elettroforetica.

2.10.3 PREPARAZIONE DEL GEL PER RNA

Materiali utilizzati

- SOLUZIONE A: 1,2 gr d'agarosio, 73 ml d'acqua+DEPC 0,1%
- SOLUZIONE B: 10 ml di MOPS 10X, 16,5 ml di formaldeide
- MOPS 1X: 100 ml di MOPS 10X, 900 ml d'acqua bidistillata
- MOPS 10X
- AGAROSIO
- ACQUA BIDI STERILE PER RNA
- BROMURO DI ETIDIO diluito

Protocollo:

I campioni di RNA, precedentemente preparati, si fanno correre su un gel denaturante per RNA per minimizzare la formazione di strutture secondarie che possono alterare la velocità di migrazione: il gel è denaturante perché si impiega la formaldeide nella preparazione. Si preparano le soluzioni A e B al momento rispettivamente in una beuta sterile e in un cilindro; si fa sciogliere l'agarosio presente nella soluzione A con una piastra riscaldante e si riporta a volume con acqua+DEPC 0,1%. Quando la temperatura della soluzione è inferiore ai 60 °C, si possono aggiungere la soluzione B e 2.5 µl di bromuro d'etidio diluito (10%). Si versa la soluzione così ottenuta nella cella elettroforetica posta sotto cappa e si lascia raffreddare. Una volta polimerizzato il gel, si riempie l'apparato elettroforetico con il tampone di corsa MOPS 10X, preparato al momento, facendo attenzione a ricoprire tutta la superficie del gel. Al termine della preparazione è possibile caricare i campioni e si lascia migrare il gel per circa 3 ore a 100 Volt mantenendo il tampone in movimento grazie all'ausilio di una pompa peristaltica.

2.10.4 Northern blot

Terminata la corsa, si prepara il gel da sottoporre al blotting ovvero al trasferimento degli RNA da una struttura difficilmente maneggiabile, il gel, ad una facilmente maneggiabile, il filtro. Si taglia il gel in un angolo per identificare l'orientamento del caricamento dei campioni e si preparano i filtri delle stesse dimensioni del gel. Si pone il gel su un apposito supporto (posizionato in una vaschetta) rivestito di carta Whatman imbevuta con SSC 20X, un tampone ad alta forza ionica. Tra il gel e il supporto si inseriscono tre foglietti di carta Whatman, delle stesse dimensioni del gel bagnati con lo stesso tampone, si dispone il gel e su di esso si ripone il filtro, opportunamente orientato. Si dispongono altri 3 foglietti di carta Whatman imbevuti e una

serie di pacchi di carta assorbente. Ai lati della pila di fogli di carta assorbente, si sistemano dei fogli di pellicola trasparente necessari per costringere il tampone ad attraversare solo il gel. Il flusso del tampone, presente nella vaschetta, attraversa il gel e media il trasferimento degli RNA dal gel al filtro. Il legame degli RNA al filtro si stabilizza con un trattamento per 3 minuti alla luce ultravioletta.

2.10.5 IBRIDAZIONE RADIOATTIVA MEDIANTE REDIPRIME™ DNA LABELLING SYSTEM

Materiali utilizzati:

- TE (pH8): Tris HCl 1M pH8, EDTA 0,1M pH 8, acqua bidistillata
- LABELLING MIX: Soluzione tamponata di dATP, dGTP, dTTP; una Klenow senza attività esonucleasica, random primers (9mers)
- EDTA 0,2 M pH 8
- SOLUZIONE D'IBRIDAZIONE: 35% SDS 20%, 0,2% EDTA 0,5M pH8, 50% Na₂HPO₄ 1M pH 7.2, acqua bidistillata
- SOLUZIONE DI LAVAGGIO: 5% SDS 20%, 0,02% EDTA 0,5M pH8, 4% Na₂HPO₄ 1M pH 7.2, acqua bidistillata

Protocollo:

Il DNA da marcare per la produzione della sonda si diluisce in un volume totale di 46 µl di H₂O, per avere una concentrazione di 2,5-25 ng/µl. Si procede con la denaturazione del DNA, ponendo le eppendorf contenenti il DNA nel termoblock a 95°C per 5 minuti e per altri 5 minuti in ghiaccio. Si trasferisce il DNA denaturato nelle eppendorf contenenti la labelling mix facendo in modo che la soluzione sia omogenea (deve essere di colore azzurro). Si aggiungono 3 µl di ³²P dCTP, mescolando gentilmente con la pipetta per 4/5 volte. Si incubano le eppendorf contenenti la miscela radioattiva nel termoblock a 37°C per 20 minuti; si ferma la reazione con 5 µl di EDTA.

Durante l'incubazione si prepara il tubo per l'ibridazione, mettendo al suo interno 20 ml di soluzione d'ibridazione a 65°C, bagnando bene le pareti. Si introducono i filtri da ibridare con la superficie degli acidi nucleici rivolta verso l'interno (le eventuali bolle d'aria devono essere eliminate utilizzando una pipetta). La sonda da aggiungere nei tubi deve essere prima sottoposta ad un processo di denaturazione per 5 minuti a 95 °C e 5 minuti in ghiaccio; si può poi aggiungere alla miscela di ibridazione. Si lascia in rotazione nella stufa a 65°C per circa 20 ore. Terminato il processo di ibridazione, si effettuano 4 lavaggi, di circa 30 minuti ciascuno con 100 ml di soluzione di lavaggio calda. Si lasciano asciugare i filtri (non troppo per consentire

ibridazioni successive), si avvolgono con la pellicola trasparente e si ripongono in un'apposita cassetta per l'esposizione alla lastra autoradiografica. Dopo un opportuno periodo, la lastra esposta al filtro è sviluppata in camera oscura incubandola, al buio per 2 minuti nella soluzione di sviluppo (Kodak) e 2 minuti nella soluzione di fissaggio (Kodak).

2.11 ANALISI FENOTIPICHE

2.11.1 SPOT ASSAY

È un test di crescita che permette di valutare eventuali differenze tra ceppi in determinate condizioni ambientali. Il saggio prevede di partire da pre-culture in fase esponenziale di cui si determina la concentrazione cellulare. Si allestiscono poi delle diluizioni a 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cells/ml. Sui terreni desiderati si dispongono in maniera ordinata 4/5 spot per ceppo del volume di 10 µl. In questo modo si avranno 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cellule in ogni spot. Le piastre così inoculate vengono incubate nelle condizioni fisiologiche desiderate. A seconda delle condizioni gli spot sono visibili dopo almeno 24h e vengono fotografati ogni giorno fino alle 72h o più.

2.11.2 ANALISI DELLA MUTABILITÀ MITOCONDRIALE

Mutanti con difetti della funzionalità mitocondriale dovuti a delezioni o perdita del mtDNA si presentano fenotipicamente come colonie di piccole dimensioni, definite “*petite*”. Tali mutanti non sono in grado di crescere su fonti di carbonio ossidabili (Lattato, Etanolo, Glicerolo). La valutazione della frequenza di mutanti *petite* viene eseguita nel seguente modo:

1. Striscio dei ceppi scelti su terreno massimo addizionato di etanolo 2% e crescita a 28°C per almeno 3 giorni. Questo passaggio permette di controselezionare tutti i “*petites*” accumulati spontaneamente nel ceppo di interesse prima dell'esperimento.
2. Replicare su una piastra del terreno selezionato per l'analisi, addizionato di glucosio al 2%, e incubare nelle condizioni desiderate, preferibilmente a 37°C per 24h.
3. Replicare su una nuova piastra dello stesso terreno e incubare nuovamente per 24h.
4. Risospendere una parte della coltura in H₂O bidistillata sterile e determinare la concentrazione cellulare.
5. Piastrare 250 cellule su terreno minimo selettivo contenente glucosio 0,2% ed etanolo 2%. Incubare a 28°C per tre quattro giorni e procedere al conteggio.

Il conteggio permetterà di risalire alla percentuale di mutanti *petite* che si sono generati durante la crescita (circa 15 generazioni) del ceppo scelto e nelle condizioni volute. Il passaggio finale è condotto su terreno contenente glucosio 0,2% - etanolo 2% perché in questo modo quando il glucosio disponibile è terminato i ceppi selvatici potranno continuare a crescere utilizzando

l'etanolo, e producendo così delle colonie grandi, mentre i mutanti *petite* si bloccheranno, rimanendo di dimensioni molto più piccole. Questo fattore permette quindi di discriminare tra mutanti e selvatici. Nei casi dubbi si può procedere allo striscio dei cloni interessati su terreno contenente solo una fonte ossidabile di carbonio per controllare la crescita.

2.11.3 ANALISI DEI CITOCROMI RESPIRATORI

Il profilo dei citocromi respiratori si registra su cellule intere facendo uso di uno spettrofotometro CARY UV 300.

Dopo una pre-coltura di 24h in YNB+DO(considerando le opportune auxotrofie)+glucosio 2%, si inoculano 2 beute da 100ml di terreno minimo YNB+DO(considerando le opportune auxotrofie)+glucosio 0,6% per ogni ceppo. A crescita avvenuta, cioè quando il glucosio è stato completamente esaurito, le cellule sono raccolte in biberon sterili e pesati. Si centrifuga per cinque minuti a 5000 rpm, si elimina il terreno e si risospendono le cellule in un volume complessivo di 3 ml. Allo spettrofotometro si registra lo spettro continuo tra 620 e 540 nm. I picchi a 602-560-550 nm sono corrispondenti ai citocromi aa3 (parte del complesso COX), b e c.

2.11.4 ANALISI DELL'ATTIVITÀ RESPIRATORIA

Per ogni campione viene preparata una precoltura in 10 ml di terreno minimo YNB+DO (considerando le opportune auxotrofie)+glucosio2%. Successivamente l'inoculo viene fatto partendo da questa pre-coltura, di cui si inoculano circa 1 ml in 100 ml di terreno minimo YNB+DO+glucosio 0,6%; le colture vengono messe a crescere a 28°C in agitazione per 36ore. A crescita avvenuta le colture vengono divise in appropriati biberon e si centrifugano per 10 minuti a 5000 rpm a 4°C. Si elimina il surnatante e il pellet viene risospeso in acqua bidistillata sterile per eliminare eventuali tracce di terreno. Dopo aver nuovamente centrifugato, il pellet viene risospeso in 2,5 ml di acqua bidistillata sterile.

L'attività respiratoria viene determinata mediante l'utilizzo dell'ossigrafo Hansatech, ponendo nell'apposita camera 100 µl di cellule diluite in 1 ml di tampone di respirazione (0,1M K-ftalato, pH 5,0) in presenza di glucosio 10 mM. Sotto tale camera vi è una membrana sovrapposta a due elettrodi che consente il passaggio dell'ossigeno non consumato; questo viene convertito in impulsi elettrici elaborati da un software che crea una curva la cui pendenza rappresenta il consumo di ossigeno. Questo viene misurato alla temperatura di 30°C utilizzando un elettrodo Clark. Per calcolare il consumo di ossigeno è necessario interpolare la retta ottenuta per calcolarne la pendenza e determinare il fattore di normalizzazione con il calcolo del peso secco effettuato su 1 ml di coltura.

I valori vengono poi espressi come micromoli di ossigeno consumato per minuto per milligrammo di peso secco cellulare.

2.11.5 ESTRAZIONE DEI MITOCONDRI

Per l'estrazione dei mitocondri si è utilizzato il seguente protocollo, in cui le condizioni di crescita possono variare a seconda delle necessità (Ferrero I et al., 1981):

- Preparazione materiale:

Il giorno prima dell'estrazione mettere a 4°C palline di vetro (glassbeads), biberon piccoli e tampone di estrazione così preparato:

- Sorbitolo 0,6 M
- 10 mM Imidazolo
- EDTA pH 8 0,5 mM
- pH 6,4

Il tampone preparato viene utilizzato previa aggiunta di BSA 0,1% o BSA 0,1% + PMSF 1 mM.

- Preparazione colture cellulari:

Da un pre-cultura in fase esponenziale inoculare 2 beute per ceppo con 100 ml di YNB +DO (-U a seconda del marcatore)+Glu 0,6%. Incubare per circa 36h a 28°C in agitazione.

- Protocollo:

1. Misurare l'OD600 per controllare il livello di crescita cellulare. Raccogliere in sterilità i 200ml di coltura per ceppo in due biberon da 250 ml pesati. Da qui la sterilità non sarà più necessaria mentre è obbligatorio lavorare sempre in ghiaccio.
2. Centrifugare 10' a 5000 rpm e 5°C ed eliminare il surnatante.
3. Calcolare il peso umido delle colture. Un' estrazione ottimale richiede almeno 2,5 g di peso umido.
4. Risospendere il pellet in 10 ml di Tampone Estrazione + BSA 0,1% e trasferire in biberon da 30 ml. Sciacquare il biberon grande con altri 10 ml dello stesso tampone, trasferiti anch'essi nel biberon piccolo.
5. Centrifugare 10' a 5000 rpm 5°C ed eliminare il surnatante.
6. Risospendere i pellet in tampone + BSA 0,1% + PMSF 1mM e trasferire in nuovi biberon contenenti palline in vetro rispettando le seguenti proporzioni:
 - a. 2 ml di tampone + BSA0,1% + PMSF 1mM per grammo di peso umido
 - b. 3 g di palline per grammo di peso umido.
7. Rompere le cellule vortexando 30" per 8 volte.

8. Preparare un vetrino di controllo e verificare lo stato delle cellule. Per evitare di perdere gli enzimi solubili della matrice mitocondriale la percentuale di cellule rotte non dovrebbe superare il 50-60 %. Se le cellule non sono abbastanza rotte aggiungere dei cicli di rottura.
9. Trasferire il surnatante in eppendorf poste in ghiaccio e centrifugare 5' a 5°C e 5000 rcf.
10. Trasferire il surnatante in nuove eppendorf e centrifugare a 17000 rcf per 30'- 40' a 5°C.
11. Eliminare il surnatante (o eventualmente conservarlo se si vogliono valutare delle attività enzimatiche nella frazione citosolica) e risospendere il pellet in 50 µl di tampone + BSA 0,1% + PMSF 1mM con una bacchetta di vetro.
12. Eliminare il surnatante e risospendere accuratamente i pellet in 50 µl di tampone + BSA 0,1% + PMSF 1mM con una bacchetta di vetro.
13. Unire gli estratti dello stesso ceppo in una unica eppendorf e mantenere sempre in ghiaccio.

2.11.6 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE (Metodo Bradford)

Il metodo (Bradford et al., 1976) è basato sull'interazione non covalente che si forma tra il colorante Coomassie Brilliant Blue R250 e le proteine. La formazione di tale complesso determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465nm a 595 nm che può essere misurato spettrofotometricamente.

Si devono innanzitutto effettuare le opportune diluizioni dei campioni delle quali si prelevano 800 µl che vengono aggiunti a 200 µl di reattivo Bradford. Il tutto viene posto all'interno di una cuvetta di quarzo che viene miscelata e successivamente lasciata a riposo per 20 minuti. Terminato questo tempo si può procedere con la lettura allo spettrofotometro a 595nm tenendo presente che ogni lettura va fatta in doppio e che lo strumento va precedentemente tarato con un bianco costituito da 200 µl di colorante addizionato a 800 µl di acqua. La diluizione iniziale dei campioni ha lo scopo di far sì che l'OD sia compreso tra 0,2 e 0,8, poiché solo all'interno di questo intervallo si ottiene linearità ed è quindi possibile calcolare la concentrazione della proteina.

Una volta ottenuti i valori, questi possono essere interpolati in un'apposita retta di taratura che permette di determinare la concentrazione proteica dei campioni espressa in mg/ml.

2.11.7 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA SUCCINATO DEIDROGENASI (SDH)

L'attività dell'enzima succinato deidrogenasi (Kim I.C. et al., 1973) viene misurata attraverso il monitoraggio spettrofotometrico della riduzione di un accettore di elettroni artificiale, la fenazina metasolfato (PMS), in seguito al blocco del normale flusso elettronico nella catena di trasporto degli elettroni. Tale blocco viene ottenuto grazie all'aggiunta di Sodio Azide

(NaN_3) alla miscela di reazione. Gli ioni N_3^- che i formano inibiscono il trasferimento degli elettroni dal citocromo aa_3 all'ossigeno rendendo possibile la loro cattura da parte dell'accettore artificiale. L'aggiunta di 2,6-dicloroindofenolo alla miscela di reazione consente la riossidazione della fenazina.

La fenazina metasolfato, una volta ridotta, è in grado di assorbire la luce a 600nm quindi, monitorando spettrofotometricamente l'aumento della fenazina ridotta a seguito dell'aggiunta di succinato, viene ricavata l'attività della succinato deidrogenasi.

Il saggio viene condotto su mitocondri estratti seguendo il protocollo precedentemente descritto in questa sezione.

La miscela di reazione utilizzata contiene:

- Tampone potassio fosfato 0,1 M a pH 7,8 (30°C)
- Fenazina metasolfato (PMS) 2.5 mM
- Sodio Azide (NaN_3) 100 mM
- 2,6-dicloroindofenolo (DCPIP) 0,15 mM.

Inizialmente si mischiano direttamente nella cuvetta 1 ml di miscela di reazione e 10 μl di mitocondri. Successivamente si imposta lo strumento con gli opportuni parametri (carry = 600 nm; range = 1; period = 1; velocità = 20 sec/cm) e si registra la linea base in assenza di succinato per verificare che non ci siano reazioni aspecifiche. A questo punto si aggiunge direttamente nella cuvetta 100 μl di Sodio Succinato 0.2M, si mescola e si registra la curva prodotta dalla reazione. Si determina la concentrazione delle proteine per ogni campione e si calcola l'attività enzimatica con l'apposita formula, tenendo presente che Il coefficiente di estinzione molare di SDH è $\epsilon = 21 \text{ ml} / \text{mmol cm}$:

CAMPIONE	$\Delta\text{OD}/\text{min}$ (ricavato dal grafico)	CONC ESTRATTO (mg/ml)	QUANTITA' ESTRATTO (ml)	Mg/MR:	$\Delta\text{OD}/\text{min}$ <hr/> Mg/MR	ATTIVITA'(UAE):
				ml estratto x conc estratto / 1000 / vol tot cuvette		$\Delta\text{OD}/\text{min}$ <hr/> X 1000 Mg/MR <hr/> 21

I valori di attività vengono espressi in nmoli di substrato consumato per minuto per milligrammo di proteine.

2.12 MISURAZIONE DEI LIVELLI DI OSSIDAZIONE INTRACELLULARE

La Diidrorodammina 123 è stata utilizzata come sonda per misurare il livello di ossidazione intracellulare (Madeo *et al* 1999). Una coltura cellulare cresciuta in terreno YNB addizionato di glucosio al 1% è stata trattata con Diidrorodammina 123 e la fluorescenza visualizzata al microscopio a fluorescenza (λ di eccitazione 505nm filtro blu/eccitazione λ a 534nm, verde); ogni aliquota è stata trattata con Calcofluor White (M2R) (blue) per colorare la parete cellulare, per poter contare il numero di cellule totali. Per ogni campione sono state contate il numero delle cellule colorate sul numero di cellule totali in venti campi ottici per calcolare il valore percentuale di cellule colorate rispetto alle cellule totali (Marchi *et al.*, 2008).

2.13 COSTRUZIONE DEL DOPPIO MUTANTE BY4741 $\Delta sdh4 \Delta ylr164w$

Il mutante doppio delecto nei geni *SDH4* e *YLR164W* è stato ottenuto tramite la tecnica *One step gene disruption* (Rothstein, 1983). Tale tecnica prevede la realizzazione di un costrutto molecolare che contiene una regione di DNA codificante per un marcatore di selezione fiancheggiato da due regioni di lunghezza variabile, ma di almeno 40pb, omologhe al gene d'interesse, in grado di mediare, in seguito alla trasformazione di un ceppo selvatico, la ricombinazione omologa al locus desiderato con conseguente integrazione della cassetta ed eliminazione dell'allele selvatico residente.

In questo lavoro è stato utilizzato, come marcatore per la selezione, il gene *Hph* (hygromycin B fosfotransferasi) di *Klebsiella pneumoniae* posto sotto il controllo del promotore TEF di *Aschbya gossypii*, in grado di esprimersi in *S. cerevisiae* conferendo la resistenza all'antibiotico igromicina.

La cassetta di delezione relativa al gene *YLR164W* è stata prodotta tramite amplificazione PCR utilizzando come template il plasmide pAG32 (vedi Materiali e Metodi) e i primer YLR164HYGF e YLR164HYGR la cui sequenza è riportata in Materiali e Metodi. Tali primer sono costituiti da 40 bp omologhe al gene *YLR164W* e da 18-20 bp omologhe alla cassetta *hph*.

Il costrutto ottenuto in seguito all'amplificazione presenta la struttura sotto riportata:



Il frammento, contenente la cassetta di distruzione, è stato purificato e il DNA è stato poi utilizzato per trasformare il ceppo BY4741 $\Delta sdh4$. Una volta all'interno del nucleo, si può verificare un appaiamento tra la sequenza genomica contenente il gene *YLR164W* e la cassetta di distruzione, quindi la ricombinazione omologa in seguito alla quale il gene viene sostituito dal

marcatore di selezione che conferisce resistenza all'igromicina. I trasformanti sono stati selezionati su piastre contenenti igromicina ad una concentrazione 250 μ g/ml. Le colonie cresciute sono state poi riprese e strisciate di nuovo su tale terreno al fine di verificare che non fossero fenocopie. Nei 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 Δ *sdh4*, dove il gene *SDH4* è stato precedentemente deleto con la cassetta di resistenza per la geneticina che possiede le medesime sequenze regolatrici della cassetta di resistenza per l'igromicina, e anche possibile che l'integrazione avvenga al locus Δ *sdh4*::Kan^R, con conseguente perdita della cassetta Kan^R che verrebbe sostituita dalla cassetta Hyg^R. Per escludere dall'analisi questi cloni, è sufficiente controllare la resistenza alla geneticina, infatti, se l'integrazione è avvenuta al locus Δ *sdh4*::Kan^R, i cloni saranno Hyg^R e Kan^S.

Per dimostrare che l'integrazione della cassetta fosse avvenuta al locus desiderato è stata eseguita un'analisi PCR. Come template è stato utilizzato il DNA genomico, estratto da otto cloni igromicina/geneticina resistenti. In parallelo, come controllo, è stata eseguita la stessa analisi sul DNA genomico estratto dal ceppo wild-type. Sono stati utilizzati il primer Forward 164WB e il primer Reverse k2; il primo ha una sequenza complementare ad una regione esterna rispetto alla ORF *YLR164W* mentre il primer K2 è complementare ad una regione interna alla cassetta. Solo nel caso che la distruzione sia avvenuta al locus corretto si avrà un amplificato la cui taglia è di circa 600 pb. Sul DNA genomico del ceppo wild-type utilizzato come controllo positivo sono stati utilizzati i primers Forward 164 e Reverse 164 che si appaiano all'interno del gene *YLR164W*. Tutti gli otto cloni risultano distrutti al locus d'interesse (dati non mostrati).

3. Risultati (I parte)

3.1 ANALISI BIOCOMPUTAZIONALI

L'enzima succinato deidrogenasi è un eterotetramero, ciascuna sub-unità del quale viene formata da una proteina precursore composta da una sequenza N-terminale di *targeting* per il mitocondrio, che viene proteoliticamente rimossa in seguito al trasporto all'interno dell'organello. Le sub-unità Sdh1p e Sdh2p (corrispondenti a SdhAp e SdhBp, rispettivamente, nell'uomo) costituiscono il dominio idrofilico del complesso SDH e formano il dimero catalitico che contiene il sito attivo, il FAD e i tre differenti cluster ferro-zolfo, $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ e $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ per il trasferimento di elettroni tra il FAD e l'ubichinone. La sequenza primaria della sub-unità ferro zolfo è altamente conservata tra le specie, devono quindi esserci geni ancestrali comuni. Le sub-unità ferro-zolfo di lievito e di uomo Sdh2p e SdhBp, codificate dai geni *SDH2* e *SDHB* rispettivamente, hanno un'identità di sequenza del 64%. Nella figura 3.1 è riportato l'allineamento delle due sequenze proteiche. Come si può osservare Sdh2p è un polipeptide di 266 aminoacidi con una sequenza di *targeting* mitocondriale di 20 aminoacidi, mentre la proteina SdhBp umana è di 280 aminoacidi con una sequenza *targeting* di 28 aminoacidi, entrambe evidenziate in giallo in figura.

```

Sdh2p      ---MLNVLLRRKAFCLVTKKGMATATT---AAATHTPRLKTFKVYRWNPEPSAKPHLQS 54
SdhBp      MAAVVALSLRRRLPATTLLGGACLQASRGAQTAAATAPRIK KFAIYRWDPDKAGDKPHMQT 60
           :: : ***: . . . * : ** : ***:* : ***:***:.. **:*:

Sdh2p      YQVDLNDCGPMVLDALLKIKDEQDSTLTFRRSREGICGSCAMNIGGRNTLACICKIDQN 114
SdhBp      YEVDLNKCGPMVLDALIKIKNEVDSTLTFRRSREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTN 120
           *:***.*****:***:* *****:*****.* ***** :** *

Sdh2p      ESKQLKIYPLPHMFIVKDLVLDLTFYQYKSIQPYLQRSSFPKDG-TEVLQSIEDRKKL 173
SdhBp      LNKVSKIYPLPHMYVIKDLVLDLTFYQYKSIQPYLQRSSFPKDG-TEVLQSIEDRKKL 180
           . * *****:*****:*** *****:***:.. .:* : *****:***

Sdh2p      DGLYECILCACSTSCPSYWINGEQYLGPAVLMQAYRWLIDSRDQATKTRKAMLNNSMSL 233
SdhBp      DGLYECILCACSTSCPSYWINGDKYLGPAVLMQAYRWLIDSRDQATKTRKAMLNNSMSL 240
           *****:*****:*****: * : * * * : : :**

Sdh2p      YRCHTIMNCTRTRCPKGLNPGKAIKSLAFA----- 266
SdhBp      YRCHTIMNCTRTRCPKGLNPGKAIKMMATYKEKASV 280
           *****:***** :*

```

Fig. 3.1: Allineamento della sequenza proteica Sdh2p di lievito e SdhBp di uomo, ottenuto con Clustalw, con evidenziate in giallo le sequenze di import nel mitocondrio, in verde i domini ferredossina. In rosso sono scritti i residui di cisteina che coordinano i centri Fe-S, il residuo di triptofano che interviene nel legame con l'ubichinone e i residui di lisina che formano i dimeri Lys-Lys necessari per l'assemblaggio.

In figura 3.1 sono scritti in rosso:

- i residui di cisteina che coordinano i centri ferro-zolfo. Si può notare che tutti questi residui sono conservati tra le due proteine e fanno parte di due domini la cui sequenza è molto conservata tra le due proteine, sono i domini ferredossina (evidenziati in verde),

dove sono localizzati gli atomi di ferro all'interno della proteina. Un altro residuo conservato è il Trp194 di lievito, che corrisponde a Trp201 nell'uomo, residuo che interagisce con la sub-unità Sdh4/SdhD per il legame con l'ubichinone;

- dimeri Lys-Lys, che si trovano all'estremità C-terminale di entrambe le proteine, sono essenziali per l'assemblaggio e per l'attività dell'enzima. Nella proteina di lievito, in particolare, è presente un solo dimero Lys-Lys, conservato nella proteina umana dove i dimeri sono due.

La sub-unità Sdh3p di lievito ha un'identità di sequenza con SdhCp del 24%. La proteina di lievito è di 198 aminoacidi, mentre quella umana è di 169 aminoacidi, entrambe hanno una sequenza di *targeting* nel mitocondrio all'N-terminale, 50 aminoacidi per la proteina di lievito e 29 aminoacidi per la proteina umana, evidenziati in giallo in figura 3.2. Il residuo aminoacidico che coordina il legame del gruppo *eme* è conservato ed è nel lievito il residuo di istidina 156 corrispondente all'istidina 127 nell'uomo (Fig 3.2 residuo segnato in rosso).

```

Sdh3p      MSAMMVKLGLENKSAALLKPSAFSRAAALSSSRLLFNTARTNFLSTSPKKNVASEMNTKA 60
SdhCp      -----MAALLLRHVGR-----HCLRAHFSPQLCIRNAVPLGTTAK 35
           :****: . : *:* . :*:... .*

Sdh3p      AIAAEQILNKQRAKRPI SPHLTIYQPQLTWYLSLHRISLVLMGLGFYLFITILFGVSGLL 120
SdhCp      EEMERFWNKNI GSNRPLSPHITIIYSWSLPMAMSI CHRGTGIALSAG---VSLFGMSALL 91
           * . : : :*:*:*:*. * . : * ** : : : . * . **:*.***

Sdh3p      GLGLTTEKVSNWYHQKFSKITEWSIKGSFAYLFAIHYGGAIRHLIWDTAKELTLKGVYRT 180
SdhCp      LIPGNFESYLELVKSLCCLGPALIHAKFALVFPLMYHTWNGIRHLMWDLGKGLKIPQLYQS 151
           * . : . : . : * : : : * . :*:*:* * . * . : : :

Sdh3p      GYALIGFTA VLGTYLLTL 198
SdhCp      GVVVLVLT VLSMGLAAM 169
           * . : : :* . : . * : :

```

Fig. 3.2: Allineamento della sequenza proteica Sdh3p di lievito e SdhCp di uomo, ottenuto con Clustalw, con evidenziate le sequenze di import nel mitocondrio e in verde le regioni idrofobiche che formano le eliche trans membrana. Scritto in rosso il residuo di istidina che coordina il legame con il gruppo *eme*.

Per quanto riguarda la sub-unità Sdh4p di lievito e la sub-unità SdhDp nell'uomo la loro identità di sequenza è del 16%. In figura 3.3, evidenziate in giallo, le due sequenze per l'import nel mitocondrio: la sequenza *targeting* della proteina di lievito è di 31 aminoacidi, mentre di 56 per la proteina umana. Tra le due proteine c'è una regione di tre aminoacidi conservati, il residuo di tirosina che ne fa parte (scritto in rosso), Y120 in Sdh4p e Y114 in SdhDp, è necessario per il legame dell'ubichinone.

```

Sdh4p      MMLPRSMKFMTGRRIFHTATVRAFQSTAKKSLTIPFLPVLPPQKPGGVRGTPNDAYVPPPE 60
SdhDp      MAVLWRLSAVCG-----ALGGRALLLRTPVVRPAHISAFLODRPIPEWCGVQHIHLSPSH 55
           * : : : * : ** : : . : .* : : * : : : * : :
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Sdh4p      NK--LEGSYHWYMEKIFALSVVPLATTAMLTGPLSTAADSFFSVMLLGICYMEFNSCIT 118
SdhDp      HSGSKAASLHWTSERVVSVLLGLLPAAYLNP---CSAMDYSLAAALTLHGHWGLGQVVT 112
           : . * * * * : : : : : : * : * * . . . : * * : : : * : : : : : *

Sdh4p      DYISERVYGVVHKYAMYMLGLGSAVSLFGTYKLETENDGVVGLVKSLWDSSEKDNSQKIE 178
SdhDp      DYVHGDALEKAAKAGLLAL---SALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL----- 159
           ** : . * : : * * : : : * : : : : * * * : : * : : * : :

Sdh4p      AKK 181
SdhDp      ---

```

Fig. 3.3: Allineamento della sequenza proteica Sdh4p di lievito e SdhDp di uomo, ottenuto con Clustalw, con evidenziate le sequenze di import nel mitocondrio e in verde le regioni idrofobiche che formano le eliche transmembrana. Scritto in rosso il residuo di tirosina necessario per il legame con l'ubichinone.

Grazie ad analisi di idrofobicità si è potuto predire che ciascuna sub-unità di membrana contiene tre regioni idrofobiche (evidenziate nelle figure 3.2 e 3.3 in verde) in grado di formare eliche transmembrana. Le sequenze aminoacidiche delle tre eliche transmembrana di Sdh3p, così come quelle di Sdh4p, non sono conservate nelle rispettive proteine umane.

3.2 ANALISI FENOTIPICA DEI CEPPI BY4741 Δ *sdh2* e BY4741 Δ *sdh4*

Sono state effettuate, per prima cosa, alcune analisi fenotipiche sui ceppi Δ *sdh2*, e Δ *sdh4* della collezione dei deletanti del ceppo BY4741.

3.2.1 CRESCITA OSSIDATIVA

L'analisi fenotipica è stata condotta su diverse fonti di carbonio ossidabili quali etanolo e glicerolo, addizionate al terreno a una concentrazione del 2%, sia in terreno ricco (YP) che in terreno minimo minerale addizionato di DropOut (YNB+DO). I ceppi sono fatti crescere alla temperatura di 28°C e la crescita è stata seguita per 5/6 giorni. La crescita su fonti di carbonio respirabili è confrontata con la crescita su glucosio al 2% (Fig 3.4).

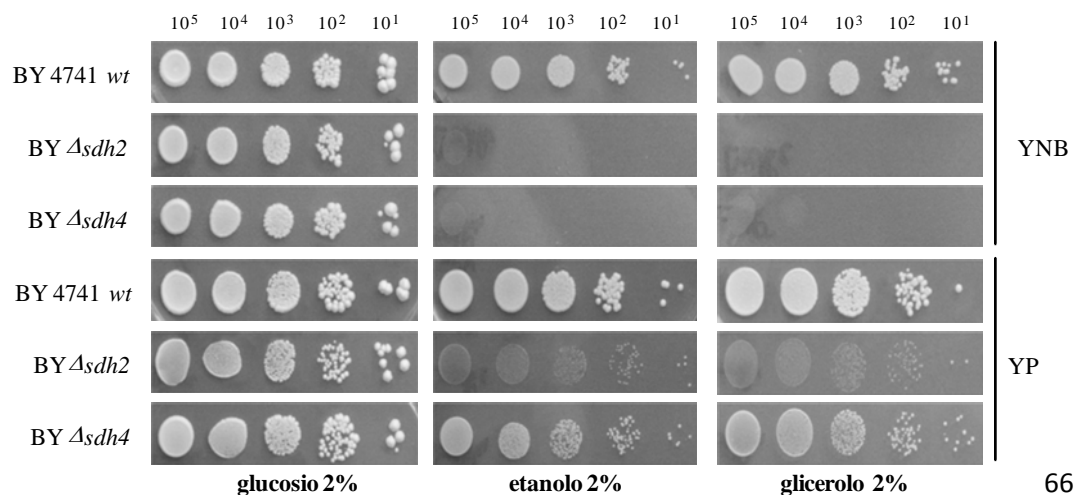


Fig. 3.4: Crescita ossidativa. Sono state seminate diluizioni seriali (10⁵, 10⁴, 10³, 10² e 10¹ cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB) e terreno massimo (YP) addizionate con glucosio al 2% o etanolo al 2% o glicerolo 2%. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla

Dalla figura 3.4 si può vedere che i ceppi $\Delta sdb2$ e $\Delta sdb4$ sono, in accordo a quanto descritto in letteratura e riportato nel sito SGD (*Saccharomyces Genome Database*), incapaci di crescere sia in etanolo che in glicerolo, in terreno minimo minerale; mentre mantengono una crescita residua in terreno massimo (YP).

3.2.2 ATTIVITÀ DELL'ENZIMA SDH

L'attività enzimatica della succinato deidrogenasi è stata misurata in mitocondri isolati dai ceppi BY4741 wild-type, $\Delta sdb2$ e $\Delta sdb4$ cresciuti a 28°C, per 36 ore in agitazione, in terreno liquido YNB+DO addizionato di glucosio allo 0,6%, evitando così l'effetto di repressione che il glucosio esercita sull'attività mitocondriale, (protocollo descritto nel capitolo “Materiali e metodi”). Dopo aver quantificato, con il metodo Bradford, le proteine mitocondriali estratte è stata valutata l'attività enzimatica a 30°C; in particolare è stata misurata la prima parte dell'attività SDH, succinato-PMS/DCPIP dipendente, cioè la capacità di ossidare il succinato a fumarato. Nella seguente tabella 3.1 sono riportati i risultati dell'analisi.

Ceppo	% Attività SDH ^a
BY4741	100
BY 4741 $\Delta sdb2$	2,7 ± 0,6
BY4741 $\Delta sdb4$	7,2 ± 2,7

Tab. 3.1: Misurazione dell'attività dell'enzima SDH nei mutanti nulli $\Delta sdb2$ e $\Delta sdb4$

^a attività enzimatica espressa in nmoli di sub-strato utilizzato per minuto per milligrammo di proteine

Come atteso, la delezione dei geni *SDH2* e *SDH4* comporta una drastica diminuzione dell'attività succinato deidrogenasica che spiega l'incapacità delle cellule a crescere su terreni contenenti substrati respirabili.

3.2.3 FUNZIONALITÀ E STRUTTURA DELLA CATENA RESPIRATORIA

Per studiare l'effetto delle mutazioni sulla funzionalità mitocondriale è stata analizzata l'attività respiratoria misurando il consumo di ossigeno. Le cellule sono fatte crescere a 28°C in terreno YNB+ DO con glucosio allo 0,6%, fino a esaurimento del glucosio (protocollo descritto nel capitolo “Material e metodi”).

Come si può osservare in tabella 3.2, i ceppi BY4741 $\Delta sdb2$ e $\Delta sdb4$ mostrano un consumo di ossigeno corrispondente a circa la metà rispetto al selvatico, rimanendo quindi respiratorio competenti.

Ceppo	Respirazione ^b
BY4741	19,6 ± 4,7
BY 4741 $\Delta sdb2$	9,8 ± 2,2
BY4741 $\Delta sdb4$	11,9 ± 3,5

Tab. 3.2: Valori dell'attività dell'attività respiratoria nei mutanti nulli
^b respirazione espressa in $\text{nmolO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg cellule in peso secco})^{-1}$

La capacità dei mutanti di rimanere respiratorio competenti indica che la loro incapacità di crescere su fonti ossidabili non è dovuta a una mancanza di respirazione e che l'incapacità di derivare energia dalla respirazione non ha effetti drastici sulla sintesi degli altri enzimi della catena respiratoria. Tranne il complesso II, quindi, gli altri componenti della catena sono presenti e almeno parzialmente funzionanti. L'incapacità di crescere su fonti di carbonio ossidabili non è ascrivibile a una mancanza di attività respiratoria ma piuttosto alla mancata funzionalità della succinato deidrogenasi che blocca il ciclo degli acidi tricarbossilici, non ossidando più il succinato a fumarato.

Sugli stessi ceppi, fatti crescere nelle stesse condizioni, è stata analizzato il profilo dei citocromi respiratori, al fine di valutare l'integrità strutturale dei complessi della catena respiratoria. I citocromi respiratori *aa3*, *b* e *c* presentano dei picchi di assorbimento rispettivamente a 602 nm, 560 nm e 550 nm. Come si può osservare in figura 3.5, i mutanti nulli $\Delta sdb2$ e $\Delta sdb4$ mostrano un significativo abbattimento del picco del citocromo *aa3*. Questo indica che i mutanti nulli potrebbero avere un problema nella struttura a livello del complesso IV. Una possibile spiegazione dell'abbattimento del picco del citocromo *aa3* sta nel possibile ruolo strutturale della succinato deidrogenasi. Il complesso, infatti, si trova all'interno della membrana mitocondriale, e potrebbe contribuire al mantenimento dell'integrità dei complessi respiratori nella membrana mitocondriale interna, dove sono incorporati.

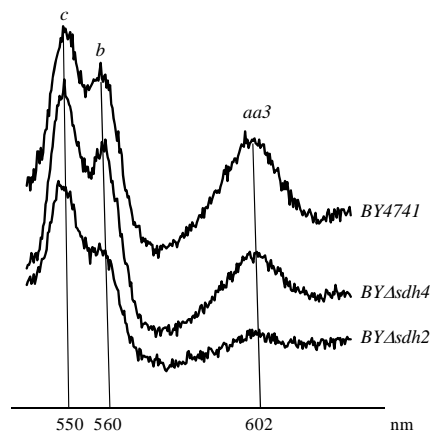


Fig. 3.5: Spettri di assorbimento dei citocromi respiratori, ridotti contro ossidati dei ceppi BY4741*wt*, $\Delta sdh2$, $\Delta sdh4$. I picchi di assorbimento a 550, 560 e 602nm (barre verticali) corrispondono ai citocromi *c*, *b* e *aa3*. L'altezza di ogni picco rispetto alla linea di base di ciascuno spettro è indice del contenuto di citocromi.

3.3 COSTRUZIONE E ANALISI FENOTIPICHE DEL MUTANTE $\Delta sdh3$

Il mutante nullo $\Delta sdh3$ nel ceppo BY4741 non è vitale. Quindi per poter utilizzare il lievito come modello per cercare di stabilire il significato clinico delle mutazioni missenso nel gene umano *SDHC* è stato necessario distruggere il gene *SDH3* nel ceppo W303-1B.

3.3.1 COSTRUZIONE DEL CEPPO W303-1B $\Delta sdh3$

Il gene *SDH3* è stato distrutto nel ceppo aploide W303-1B mediante la tecnica *One step gene disruption* (Rothstein, 1983), che prevede la realizzazione di un costrutto molecolare in cui il gene d'interesse viene inattivato per inserimento al suo interno di una regione di DNA codificante per un marcatore selezionabile. Il costrutto linearizzato viene utilizzato per trasformare un ceppo wild-type; l'integrazione del costrutto, mediante ricombinazione omologa, consente di ottenere il "mutante nullo".

Nel caso specifico è stata utilizzata, come marcatore per la selezione, la cassetta *kanMX4*, contenente il gene per la kanamicina resistenza (*Kan^R*) del trasposone 903 di *E. coli*, che in *S. cerevisiae* conferisce resistenza all'antibiotico geneticina (G418), posto sotto il controllo del promotore TEF di *Aschbya gossypii*, in grado di esprimersi in *S. cerevisiae*.

La cassetta di distruzione relativa al gene *SDH3* è stata ottenuta mediante amplificazione PCR utilizzando come template il plasmide pFA6a-kan MX4 (Wach et al., 1994) e i primers FSDH3kan e RSDH3kan, la cui sequenza è riportata in Materiali e metodi. Tali primer sono costituiti da 40 bp omologhe al gene *SDH3* e da 18-20 bp omologhe alla cassetta *kanMX4*. Il

prodotto, ottenuto come risultato dell'amplificazione, è un frammento di circa 1500 bp che possiede il gene marcatore *Kan^R* fiancheggiato da due regioni omologhe al gene *SDH3* in grado di mediare la ricombinazione omologa al locus.

La selezione dei trasformanti è avvenuta su terreno YP + glucosio 2% addizionato di geneticina (G418) alla concentrazione di 200 µg/ml. Le colonie cresciute sono state poi riprese e seminate di nuovo su tale terreno al fine di eliminare le eventuali fenocopie. Per dimostrare che l'integrazione della cassetta fosse avvenuta al locus desiderato è stata fatta una PCR su colonia, i primer utilizzati (BSDH3F-K2) permettono di ottenere una banda di circa 600bp, solo nel caso in cui la distruzione sia avvenuta, in quanto il primer forward annila nella regione promotrice del gene e il primer K2 è complementare ad una regione interna alla cassetta di distruzione (dati non mostrati).

3.3.2 CRESCITA OSSIDATIVA

L'analisi fenotipica è stata condotta su diverse fonti di carbonio ossidabili quali etanolo e glicerolo, addizionate al terreno a una concentrazione del 2%, sia in terreno ricco (YP) che in terreno minimo minerale addizionato di DropOut (YNB+DO). I ceppi sono fatti crescere alla temperatura di 28°C e osservati dopo 5/6 giorni. La crescita su fonti di carbonio respirabili è confrontata con la crescita in glucosio al 2% (Fig 3.6).

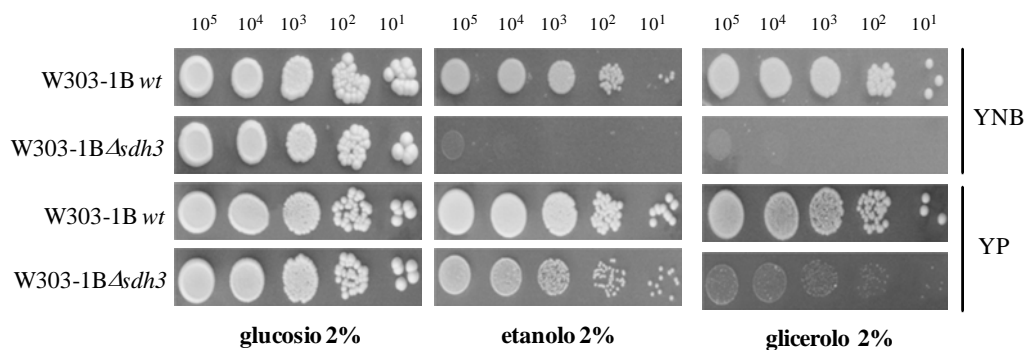


Fig. 3.6: Crescita ossidativa. Sono state seminate diluizioni seriali (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB) e terreno massimo (YP) addizionate con glucosio al 2% o etanolo al 2% o glicerolo 2%. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C.

3.3.3 ATTIVITÀ DELL'ENZIMA SDH

L'attività enzimatica della succinato deidrogenasi è stata misurata in mitocondri isolati dai ceppi W303-1B wild-type e Δ sdh3 cresciuti a 28°C, per 36 ore in agitazione, in terreno liquido YNB+DO addizionato di glucosio allo 0,6%, evitando così l'effetto di repressione che il glucosio

esercita sull'attività mitocondriale. Le proteine estratte e quantificate sono state utilizzate per misurare l'attività enzimatica a 30°C. Si misura la prima parte dell'attività SDH, succinato-PMS/DCPIP dipendente, cioè la capacità di ossidare il succinato a fumarato. Come si può osservare dalla tabella 3.3 la delezione del gene *SDH3*, come atteso comporta una drastica diminuzione dell'attività della succinato deidrogenasi che spiega l'incapacità di crescita delle cellule su terreni contenenti substrati respirabili.

Ceppo	% Attività SDH ^a
W303-1B wt	100
W303-1B Δ <i>sdh3</i>	3,0 \pm 0,5

Tab. 3.3: Misurazione dell'attività dell'enzima SDH nei mutanti nulli

^a attività enzimatica espressa in nmoli di sub-strato utilizzato per minuto per milligrammo di proteine

3.3.4 FUNZIONALITÀ E STRUTTURA DELLA CATENA RESPIRATORIA

Nel mutante ottenuto è stata valutata la funzionalità e la struttura della catena respiratoria. Le cellule sono fatte crescere a 28°C in terreno YNB+ DO con glucosio allo 0,6%, fino a quando il glucosio non era completamente esaurito (protocollo descritto nel capitolo “Material e metodi”). Su queste colture cellulari è stato inizialmente misurato il consumo di ossigeno e, come si può vedere in tabella 3.4, il mutante Δ *sdh3* ha un valore di respirazione di poco inferiore rispetto a quello del ceppo selvatico, suggerendo che anche questo mutante rimane respiratorio competente.

Ceppo	Respirazione ^b
W303-1B wt	36,4 \pm 1,1
W303-1B Δ <i>sdh3</i>	32,5 \pm 1,5

Tab. 3.4: Valori dell'attività dell'attività respiratoria nei mutanti nulli

^b respirazione espressa in nmolO₂*min⁻¹*(mg cellule in peso secco)⁻¹

Per quanto riguarda il profilo dei citocromi il mutante nullo Δ *sdh3* è indistinguibile dal selvatico (Fig.3.7), risultato coerente con l'elevato consumo di ossigeno osservato.

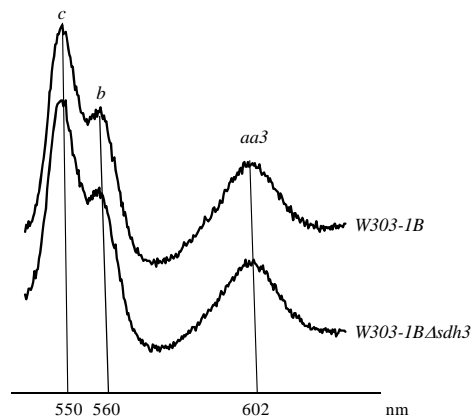


Fig. 3.7: Spettri di assorbimento dei citocromi respiratori, ridotti contro ossidati dei ceppi W303-1B *wt* e $\Delta sdh3$. I picchi di assorbimento a 550, 560 e 602nm (barre verticali) corrispondono ai citocromi *c*, *b* e *aa3*. L'altezza di ogni picco rispetto alla linea di base di ciascuno spettro è indice del contenuto di citocromi.

3.4 CLONAGGIO DEI GENI *SDH2* *SDH3* E *SDH4* E TRASFORMAZIONE DEI CEPPI MUTANTI

I geni di lievito *SDH2* *SDH3* e *SDH4* sono stati ottenuti tramite amplificazione con PCR a partire dal DNA genomico del ceppo BY4741 e W303-1B wild-type utilizzato come template. I primers specifici utilizzati generano alle estremità del frammento clonato siti di restrizione riconosciuti dagli enzimi *Hind*III e *Sal*I per *SDH2*, *Bam*HI e *Pst*I per *SDH3*, *Eco*RI e *Xba*I per *SDH4* (riportati nel capitolo Materiali e Metodi). Questi primer permettono di amplificare la regione codificante 500 bp a monte e 300bp a valle del gene *SDH2*, 545bp a monte e 357bp a valle del gene *SDH3* e 500 bp a monte e 200 bp a valle di *SDH4*.

I geni *SDH2* *SDH3* e *SDH4* si sono clonati nel vettore monocopia per lievito pFL38 (Fig. 3.8); in tale vettore i geni sono inseriti assieme alle sue sequenze regolative.

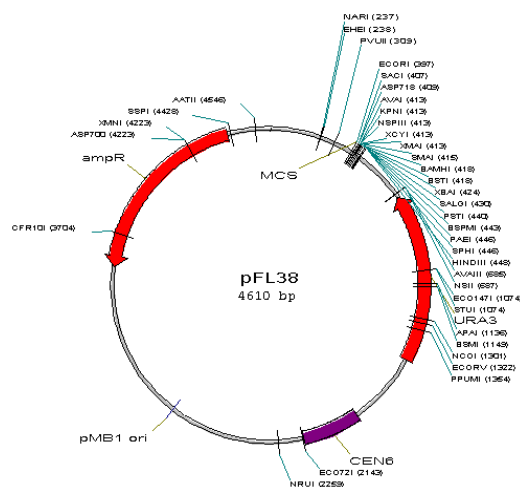


Fig. 3.8: Vettore monocopia per lievito pFL38

Il plasmide pFL38 è un vettore shuttle *E. coli/S. cerevisiae* in quanto contiene sia un'origine di replicazione batterica, quella del plasmide pMB1, che una sequenza ARS-CEN che permette la replicazione in lievito. Contiene, inoltre, il gene per la resistenza all'ampicillina come marcatore di selezione batterico e il gene *URA3* come marcatore di selezione per lievito.

Con i costrutti così ottenuti (pFL38-*SDH2*, pFL38-*SDH3* e pFL38-*SDH4*) sono stati trasformati i rispettivi mutanti nulli, utilizzando come controllo il vettore vuoto. I trasformanti, selezionati su terreno minimo privo di uracile (YNB+DO-Ura) e glucosio come fonte di carbonio sono stati poi strisciati in terreno minimo privo di uracile addizionato di etanolo, al fine di valutare la capacità di complementazione dei costrutti ottenuti. Successivamente è stata condotta un'analisi di spot assay per confermare che i diversi ceppi trasformati fossero in grado di utilizzare tutte le diverse fonti di carbonio respirabili (dati non mostrati).

3.5 CLONAGGIO DEI GENI UMANI *SDHB* E *SDHD* IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE PER LIEVITO E ANALISI DI COMPLEMENTAZIONE

La condizione ideale, per utilizzare *S. cerevisiae* come modello per “validare” le mutazioni associate ai geni *SDH*, sarebbe quella di poter introdurre in lievito direttamente il gene umano recante le mutazioni patologiche. Al fine di valutare se i geni umani *SDHB* e *SDHD* fossero in grado di complementare le mutazioni nulle Δ *sdh2* e Δ *sdh4* in lievito è stato necessario clonarli in un vettore di espressione per lievito. Il vettore di espressione per lievito che è stato utilizzato è il pYEX-BX (Fig. 3.9); tale vettore permette l'espressione di geni eterologhi sotto il controllo del promotore del gene *CUP1*, inducibile da rame.

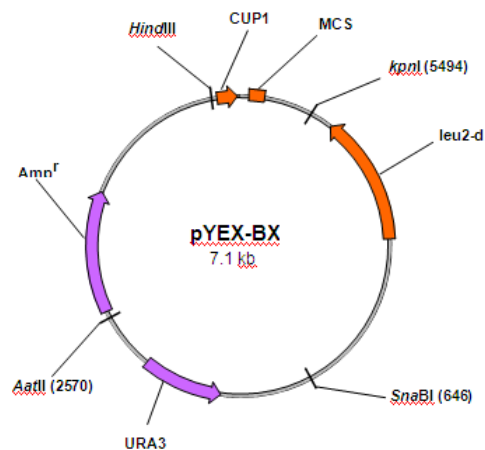


Fig 3.9. Plasmide pYEX-BX

Il plasmide pYEX-BX non contiene un codone di inizio per la traduzione di geni esogeni, ma tali geni vengono tradotti partendo dal loro sito di inizio ATG ed inoltre il sito multiplo di clonaggio (MCS) contiene un codone di stop per ogni ORF (*open reading frame*). Il vettore pYEX-BX è un

una proteina funzionante, e un'altra che avrebbe portato alla produzione di una proteina completamente diversa e probabilmente non funzionante rispetto a quella normalmente codificata dal gene. Per controllare l'orientamento sono state condotte due digestioni con enzimi di restrizione differenti su due aliquote separate di DNA plasmidico estratto dalla colonia. Un'aliquota è stata digerita con l'enzima *Pst*I, che riconosce e taglia in corrispondenza di un sito presente sia nel MCS che all'interno del gene *SDHD*, mentre sull'altra è stata condotta una doppia digestione con *Bam*HI e *Sac*I; quest'ultimo riconosce un sito presente solo all'interno del gene umano. A seconda dell'orientazione di *SDHD* si ottengono frammenti di diverse dimensioni. Se la direzionalità è corretta (5'→3' rispetto al promotore) ottengo:

- Dalla digestione con *Pst*I, un frammento di circa 300bp e uno di circa 7300bp;
- Dalla digestione con *Bam*HI e *Sac*I un frammento di circa 70bp e uno di circa 7530bp.

Nel caso, invece, il gene non fosse inserito con direzionalità corretta (3'→5' rispetto al promotore) le dimensioni dei frammenti attese erano le seguenti:

- Dalla digestione con *Pst*I un frammento di circa 200bp e uno di circa 7400bp
- Dalla digestione con *Bam*HI e *Sac*I un frammento di circa 430bp e uno di circa 7170bp

Come si può osservare in figura n. l'orientazione del gene *SDHD* nel vettore è corretta.

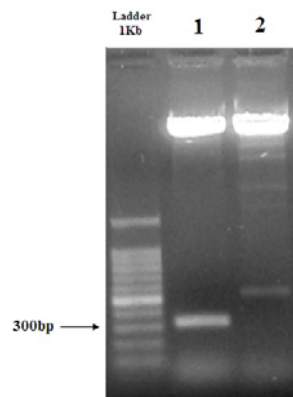


Fig 3.11: Digestioni per controllo orientamento *SDHD*

- 1) Campione digerito con *Pst*I;
- 2) Campione digerito con *Bam*HI e *Sac*I

Per valutare se il gene umano fosse in grado di complementare la rispettiva mutazione di lievito con i costrutti ottenuti sono stati trasformati i ceppi $\Delta sdb2$ e $\Delta sdb4$ venti cloni trasformanti sono stati strisciati sia su terreno minimo addizionato con glucosio al 2% sia su terreno minimo addizionato con etanolo al 2%; le piastre sono state incubate a 28°C per 5/6 giorni. Nessuno dei cloni era in grado di crescere in presenza di etanolo. In figura 3.12 si può vedere l'esperimento di

spot assay esemplificativo dell'incapacità dei trasformanti di crescere su terreno minimo addizionato di fonti di carbonio ossidabili.

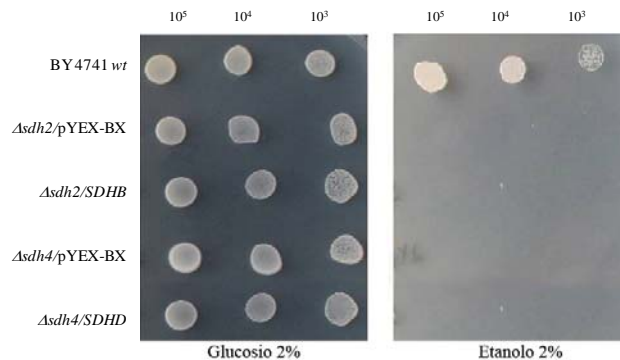


Fig. 3.12: Crescita ossidativa. Sono state seminate diluizioni seriali (10^5 , 10^4 e 10^3 cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB) addizionate con glucosio al 2% o etanolo al 2%. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C.

Si può pertanto concludere che i cDNA umani *SDHB* e *SDHD* non sono in grado di complementare le rispettive mutazioni di lievito $\Delta sdh2$ e $\Delta sdh4$. È possibile ipotizzare che il prodotto del gene *SDHB*, nonostante un'identità di sequenza del 64%, non complementi la mutazione $\Delta sdh2$, perché il suo prodotto genico non viene riconosciuto dal sistema di import della cellula di lievito. Stessa considerazione può essere fatta per la proteina SdhD che la cui identità di sequenza con l'equivalente proteina umana è solo del 16%, tra le due proteine. In entrambi i casi bisogna considerare che essendo due sub-unità di un tetramero, le proteine umane potrebbero non essere in grado di assemblarsi con quelle di lievito.

Pertanto non è possibile utilizzare i geni umani per studiare le mutazioni riscontrate nei pazienti affetti da paragangliomi.

4. Risultati (II parte)

STUDIO FUNZIONALE IN LIEVITO DI UNA NUOVA MUTAZIONE GERMINALE MISSENSO (C191Y) NEL GENE *SDHB* DIAGNOSTICATA IN UN PAZIENTE AFFETTO DA TUMORE GLOMICO

* I risultati discussi in questa sezione sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

Paola Goffrini, Tonino Ercolino, Elena Panizza, Valentino Giachè, Leonardo Cavone, Alberto Chiarugi, Veronica Dima, Iliana Ferrero and Massimo Mannelli (2009).

Functional study in a yeast model of a novel *SDHB* germline missense mutation (C191Y) diagnosed in a patient affected by a glomus tumor.

Hum Mol Genet. **18**, 1860-1868.

Il lievito *S. cerevisiae* è stato utilizzato da noi, per la prima volta, nello studio funzionale di una mutazione germinale nel gene *SDHB* diagnosticata in un paziente affetto da tumore glomico apparentemente sporadico.

Il paziente, una donna di 36 anni, presentava una massa cervicale poi rimossa con un intervento chirurgico che l'esame istologico ha confermato essere un tumore glomico. Dall'analisi genetica dei geni di suscettibilità delle sindromi PGL si è visto che i geni *RET*, *VHL*, *SDHC* e *SDHD* erano wild-type, mentre era presente una mutazione nel gene *SDHB*. Si tratta di una nuova mutazione missenso eterozigote che consiste in una sostituzione di una guanina con un'adenina, che causa una sostituzione del residuo aminoacidico 191 della proteina, una cisteina è sostituita con una tirosina nell'esone 6 (C191Y). Questa variante non è stata trovata in alcuno tra 125 soggetti sani di controllo. Dal momento che questa mutazione in *SDHB* non era stata ancora descritta, che nella famiglia della paziente non vi erano altri casi di paraganglioma o feocromocitoma e che il quadro clinico presentato era piuttosto insolito, ci si è chiesti se questa nuova mutazione potesse essere considerata patogena per la sindrome PGL4. La mutazione missenso trovata nella paziente cade in un residuo altamente conservato negli eucarioti, da lievito all'uomo (Fig. 4.1).

H. sapiens	KDESQE--GKQQYLQSIEREKLDGLYECILCA CC STSCPSYWWNGDKYLGPAVLMQAYR	217
M. musculus	KDESQE--GKQQYLQSIEDREKLDGLYECILCA CC STSCPSYWWNGDKYLGPAVLMQAYR	219
D. melanogaster	KNEAGEKKGKAQYLQSVEDRSKLDGLYECILCA CC STSCPSYWWNAEKYLGPAVLMQAYR	226
C. elegans	SSFPKD---GTEVLQSIEDRKKLDGLYECILCA CC STSCPSYWWNQEQYLGPAVLMQAYR	210
S. cerevisiae	KTPLTL--GEKQMHQSVARERDLGLYECILCA CC STSCPSYWWNADKYLGPAVLMQAYR	231

Fig. 4.1: Allineamento delle sequenze delle diverse specie, ottenuto con Clustalw, della regione *SDHB* contenente l'aminoacido mutato nel paziente

4.1 EFFETTO DELL'ALLELE MUTATO *sdh2*^{C184Y}, EQUIVALENTE ALLA MUTAZIONE *hsdhb*^{C191Y}

4.1.1 CRESCITA OSSIDATIVA

Al fine di validare il ruolo patogeno della mutazione missenso nel gene umano *SDHB* e per capire meglio gli effetti causati da questa mutazione sulla funzionalità del complesso II, in primo luogo sono stati condotti studi di complementazione in un ceppo di *S. cerevisiae* che manca del gene *SDH2* (l'ortologo lievito di *SDHB*).

Un ceppo di *S. cerevisiae* con la delezione del gene *SDH2* ha, come già descritto nel capitolo precedente un fenotipo OXPHOS negativo, ovvero è quindi incapace di crescere in presenza di etanolo o altri substrati respirabili, come unica fonte di carbonio. Il ceppo Δ *sdh2* è stato pertanto

trasformato con un plasmide monocopia contenente l'allele wild-type e con lo stesso vettore contenente l'allele mutato *sdh2*^{C184Y} equivalente dell'umano *sdh2*^{C191Y}. Per ottenere l'allele mutato, mutagenizzando il gene di lievito *SDH2*, è stato applicato il protocollo di mutagenesi QuickChange® XL Site Directed Mutagenesis kit riportato nella sezione “Materiali e metodi” utilizzando come template il plasmide pFL38/*SDH2* e i primer S2MF e S2MR la cui sequenza è riportata nella tabella al paragrafo 2.6.1 nella sezione “Materiali e metodi”.

Come si può osservare in figura 4.2 il ceppo Δ *sdh2*/*sdh2*^{C184Y} non è in grado di complementare il fenotipo negativo di crescita del ceppo delecto, dimostrando che la sostituzione C184Y ha un effetto “patogeno” in lievito.

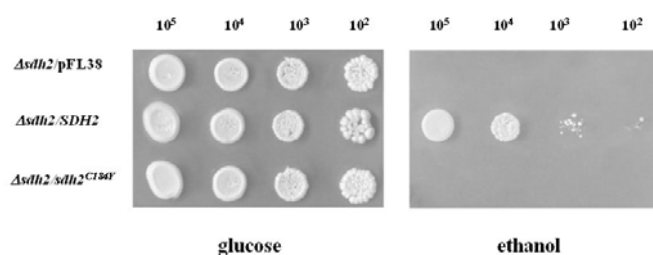


Fig. 4.2: Crescita ossidativa. Sono state seminate diluizioni seriali (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB) addizionate con glucosio al 2% o etanolo al 2%. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C.

4.1.2 ANALISI TRASCRIZIONALE

Per escludere che l'assenza di complementazione fosse dovuta a una ridotta espressione dell'allele mutato, è stata condotta un'analisi *Northern blot* sul ceppo trasformato con l'allele mutato e sul ceppo trasformato con l'allele wild-type come controllo. I ceppi Δ *sdh2*/*SDH2* e Δ *sdh2*/*sdh2*^{C184Y} sono stati fatti crescere in terreno minimo privo di uracile addizionato di glucosio allo 0.6% fino a una concentrazione di $1 \cdot 10^7$ cells/ml; da tali colture sono stati successivamente estratti gli RNA totali. La sonda relativa al gene *SDH2* è stata costruita mediante amplificazione PCR utilizzando come template il costrutto pFL38/*SDH2* e come primer la coppia FinS2/SSDH2R come riportato nella sezione “Materiali e metodi”. In figura 4.3 sono mostrati i segnali di ibridazione relativi al filtro con gli RNA estratti dai due ceppi e ibridati con la sonda *SDH2*.

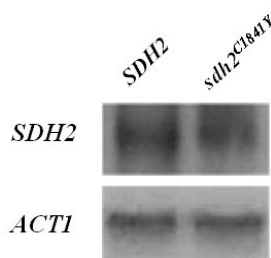


Fig. 4.3: Analisi *Northern* del gene *SDH2* nel ceppo Δ *sdh2* trasformato con il gene wt e l'allele mutato *sdh2*^{C184Y}. 20 μ g di RNA di ogni campione è stato caricato in ciascuna *lane*. L'RNA è stato ibridato con sonde

E' possibile osservare che entrambi i campioni mostrano bande di uguale intensità a indicare che essi sono ugualmente espressi. Questi risultati permettono di affermare che l'assenza di crescita sulla fonte di carbonio ossidabile è dovuta alla presenza della mutazione e non a una ridotta espressione del gene.

4.1.3 ATTIVITÀ DELL'ENZIMA SDH, RESPIRAZIONE E CONTENUTO DEI CITOCROMI RESPIRATORI NEL MUTANTE *sdh2^{C184Y}*

Il fenotipo di crescita OXPHOS negativo del mutante *sdh2^{C184Y}* ci ha indotto a valutare l'attività dell'enzima SDH e la sua capacità respiratoria. Per quanto riguarda l'attività SDH è stata misurata la prima parte della reazione ovvero la succinato-PMS/DCPIP dipendente; tale attività è stata misurata in mitocondri isolati da cellule cresciute per 36 ore, a 28°C, in terreno minimo privo di uracile, contenente glucosio allo 0,6%. Non inaspettatamente sulla base del fenotipo OXPHOS negativo, nel ceppo trasformato con l'allele *sdh2^{C184Y}*, l'attività dell'enzima SDH è completamente abbattuta (Tab 4.1). Questo indica che la mutazione *sdh2^{C184Y}* impedisce l'attività succinato deidrogenasi DCPIP dipendente.

Allele	Attività SDH ^a
<i>SDH2</i>	121,6 ± 8,8
pFL38	3,6 ± 0,7
<i>sdh2^{C184Y}</i>	3,8 ± 1,1

Tab. 4.1: Attività dell'enzima SDH del mutante *sdh2^{C184Y}* del mutante nullo *Δsdh2* e del ceppo wt.
^a attività enzimatica espressa in nmoli di sub-strato utilizzato per minuto per milligrammo di proteine

E' stato poi valutato il consumo d'ossigeno. Tale misura, così come quella relativa all'analisi dei citocromi, è stata eseguita su cellule cresciute in terreno minimo privo di uracile contenente glucosio allo 0,6%. Anche in questo caso tutte le analisi sono state condotte parallelamente anche su ceppi di controllo: il ceppo *Δsdh2* trasformato con il plasmide recante l'allele wild-type come controllo positivo e lo stesso ceppo trasformato col plasmide privo di inserto.

Allele	Attività respiratoria ^b
<i>SDH2</i>	25,5 ± 1,7
pFL38	12,0 ± 0,7
<i>sdh2^{C184Y}</i>	11,9 ± 1,1

Tab.4.2: Attività respiratoria del mutante *sdh2^{C184Y}* del mutante nullo *Δsdh2* e del ceppo wt.
^b respirazione espressa in nmolO₂*min⁻¹*(mg cellule in peso secco)⁻¹

I risultati ottenuti (Tab 4.2) indicano che, in presenza di glucosio, il mutante mostra un consumo di ossigeno pari al 50% rispetto al ceppo parentale, infatti né la mutazione C184Y né la mutazione nulla impediscono completamente il flusso di elettroni lungo la catena respiratoria. Questo indica che il ceppo rimane respiratorio competente in accordo con quanto precedentemente osservato con un mutante della sub-unità Sdh1 (Robinson *et al.*,1991)

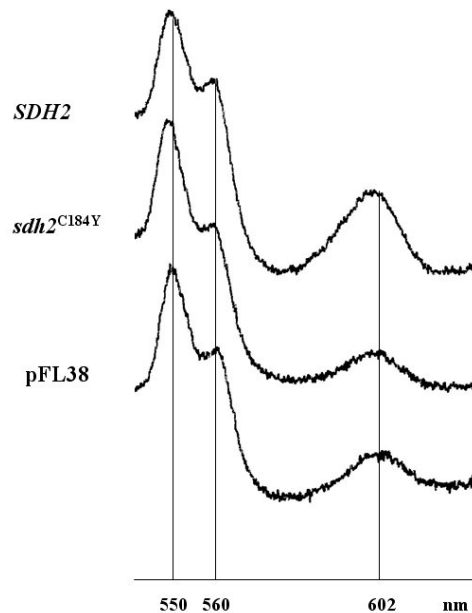


Fig. 4.4: Spettri di assorbimento dei citocromi respiratori, ridotti contro ossidati, del ceppo $\Delta sdh2$ trasformato con l'allele *SDH2* wild-type, l'allele mutato *sdh2*^{C184Y} e il plasmide vuoto pFL38. I picchi di assorbimento a 550, 560 e 602nm (barre verticali) corrispondono ai citocromi *c,b* e *aa3*. L'altezza di ogni picco rispetto alla linea di base di ciascuno spettro è indice del contenuto di citocromi.

Per quanto riguarda l'analisi del profilo dei citocromi mitocondriali, come si può osservare in figura 4.4 il ceppo trasformato con l'allele *sdh2*^{C184Y} mostra un significativo abbattimento del picco del citocromo *aa3* simile a quello del ceppo trasformato con il solo plasmide vuoto. Questo risultato suggerisce che un'alterata funzione/struttura del complessoII compromette il corretto assemblaggio del complessoIV oppure lo destabilizza. E' possibile ipotizzare che il complesso SDH, che risiede nella membrana mitocondriale interna, svolga un ruolo strutturale che contribuisce al mantenimento dell'integrità dei complessi respiratori anch'essi inseriti nella membrana mitocondriale interna.

4.1.4 SENSIBILITÀ ALLO STRESS OSSIDATIVO

È stato recentemente dimostrato che un mutante $\Delta sdh2$ mostra un aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Smith *et al.*2007). I ceppi che producono

elevati livelli di ROS mostrano una aumentata sensibilità a sostanze che inducono stress ossidativo in quanto l'imposizione di un ulteriore stress esogeno, quale ad esempio la presenza di menadione nel terreno di crescita, sovrappone i meccanismi di detossificazione della cellula.

Pertanto al fine di valutare se la mutazione *sdh2*^{C184Y} determinasse un aumento della produzione di ROS rispetto al wild-type è stata analizzata sia la sensibilità al menadione, un chinone che produce radicali superossido (Klohn, P.C. and Neumann, H.G. 1997), che l'accumulo di ROS intracellulari attraverso colorazione con Di-idrorodammina 123, valutando quindi la sensibilità allo stress ossidativo sia in modo indiretto che diretto.

Per entrambe le analisi i ceppi sono fatti crescere a 28°C in terreno minimo privo di uracile e addizionato di glucosio all'1%, fino alla tarda fase esponenziale. Per valutare la sensibilità al menadione si è condotto un esperimento di spot assay, su piastre di terreno minimo addizionato di glucosio al 2% in assenza e in presenza di menadione 30µM. La crescita è stata controllata dopo 3, 5 e 7 giorni di incubazione a 28°C. Per la misurazione diretta dei ROS intracellulari le cellule, dopo lavaggi con un opportuno tampone, sono state incubate per un'ora con Di-idrorodammina123 e Calcofluor white come descritto in materiali e metodi. La Di-idrorodammina entra nella cellula dove reagendo con le specie reattive dell'ossigeno si riduce a rodammina, cromoforo che viene eccitato a un lunghezza d'onda di 505nm, blu, e emette a 534 nm, verde. Il Calcofluor white colora tutte le cellule ed emette nel blu. La percentuale di cellule che hanno accumulato ROS viene determinata contando al microscopio a fluorescenza il numero di cellule verdi rispetto al numero totale di cellule presenti nella popolazione cellulare. I risultati ottenuti e mostrati in figura 4.5a indicano che il mutante *sdh2*^{C184Y} ha una maggiore sensibilità al menadione, pari a quella del mutante nullo, suggerendo che la mutazione patologica aumenta la produzione di ROS intracellulari (Fig 4.5a).

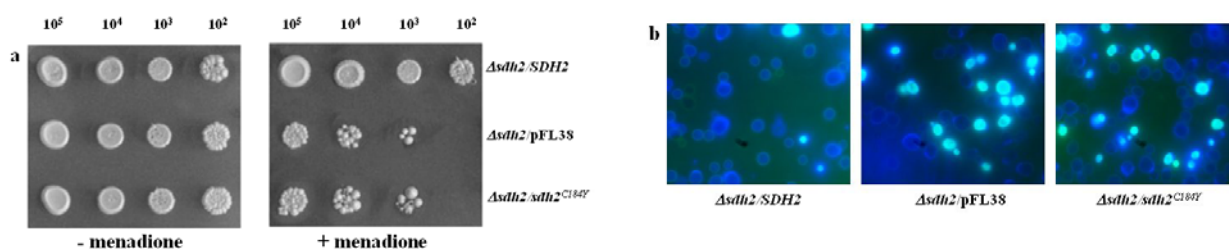


Fig. 4.5: a. Sensibilità al menadione Sono state seminate diluizioni seriali (10⁵, 10⁴, 10³, 10² cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB+DO) addizionate con glucosio al 2% e menadione 30µM (immagine di sinistra e di destra rispettivamente). La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C. **b.** Accumulo di Ros, valutato confrontando il ceppo *Δsdh2* trasformato con il gene *SDH2*, il plasmide vuoto e l'allele mutato C184Y, dopo colorazione con Diidrorodammina 123

L'analisi diretta dell'accumulo di ROS intracellulari, , mostra che il 30% delle cellule con la mutazione *sdh2*^{C184Y}, così come quelle che hanno l'allele nullo *sdh2*, risulta positivo alla colorazione con la Di-idroradamina, mentre solo meno del 10% delle cellule con il gene wild-type (Fig 4.5b).

4.1.5 STABILITÀ DEL DNA MITOCONDRIALE

Alti livelli di ROS generalmente sono associati ad un aumento dei riarrangiamenti del mtDNA (Elledge SJ *et. al.*,1990; Wei YH *et al.*, 2002), che in *S.cerevisiae* causano un aumento della frequenza di mutanti *petite*.

Al fine di valutare l'effetto di mutazioni *sdh2* sulla stabilità del mtDNA, abbiamo misurato la frequenza di mutanti *petites* citoplasmatici del ceppo Δ *sdh2* che porta sia l'allele *sdh2*^{C184Y}, il plasmide vuoto o l'allele wild-type *SDH2*. Come è stato riportato nel capitolo precedente mutanti privi di attività SDH sono incapaci di crescere su fonti di carbonio non fermentabili solamente o in terreno minimo ma mostrano una crescita residua in terreno massimo. Tuttavia, in presenza i mutazioni a carico del DNA mitocondriale, siano esse rho⁻ (delezioni di mtDNA) che rho⁰ (assenza di mtDNA) , i ceppi mutanti Sdh⁻ diventano incapaci di crescere anche su YP-etanolo. Tenendo conto di questa diversità fenotipica, ciascuno dei 3 ceppi è stato fatto crescere a 28°C per 72h su terreno massimo addizionato di etanolo al 2% al fine di controselezionare eventuali mutanti *petite* presenti nella popolazione cellulare. Successivamente i ceppi sono stati replicati su terreno minimo in assenza di uracile e dopo 15 generazioni di crescita a 37°C le cellule sono state piastrate su terreno minimo con etanolo al 2% e glucosio allo 0,2% ad una diluizione che consenta di avere approssimativamente 250 colonie per piastra. La frequenza di mutazione viene definita come la percentuale di colonie *petite* sul totale delle cellule contate dopo 5 giorni di incubazione a 28°C. Per ogni ceppo sono stati analizzati almeno 4000 cloni e per ciascun ceppo sono stati condotti cinque esperimenti indipendenti

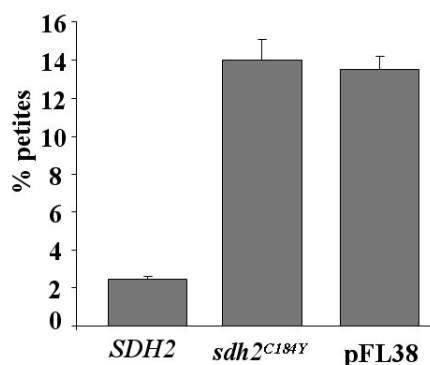


Fig. 4.6: Determinazione della frequenza di *petite* nel ceppo Δ *sdh2* trasformato con l'allele wild-type *SDH2*, l'allele mutato *sdh2*^{C184Y} e il plasmide vuoto pFL38. Per ogni ceppo è riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno minimo (YNB+DO) addizionato di glucosio 0,2% e etanolo 2%. Per ogni ceppo sono stati condotti cinque esperimenti indipendenti.

I risultati ottenuti e riportati in figura 4.6 indicano che la frequenza di comparsa di mutanti *petite* nel mutante *sdh2^{C184Y}*, così come nel mutante nullo, è di sette volte superiore rispetto a quella del ceppo wild-type .

4.1.6 ANALISI *in silico* DEGLI EFFETTI DELLA MUTAZIONE SULLA CONFORMAZIONE DELL'ENZIMA

In banca dati è depositato il modello della struttura della succinato deidrogenasi di lievito ottenuto per omologia di sequenza con quella di *Escherichia coli*, che è stata cristallizzata (Yankovskaya 2003). Il residuo mutato di cisteina in posizione 184 in lievito corrisponde al residuo C154 della proteina di *E. coli*, che è stato descritto come necessario per la stabilizzazione del centro [4Fe-4S] (Fig. 4.7), il cluster ferro zolfo centrale nel sistema di trasporto degli elettroni del complesso SDH.

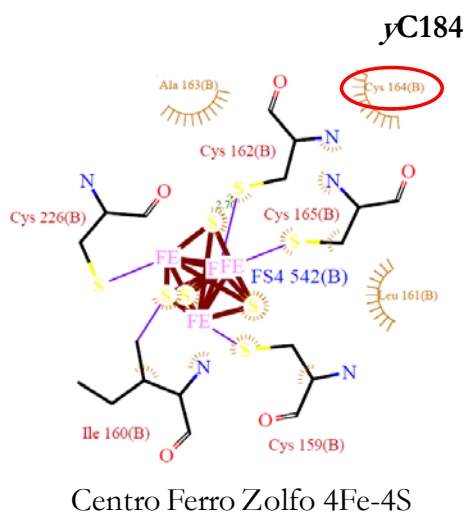


Fig. 4.7: Localizzazione del residuo C184, si osserva che coordina il centro ferro zolfo [4Fe-4S], centrale nel sistema di trasporto degli elettroni.

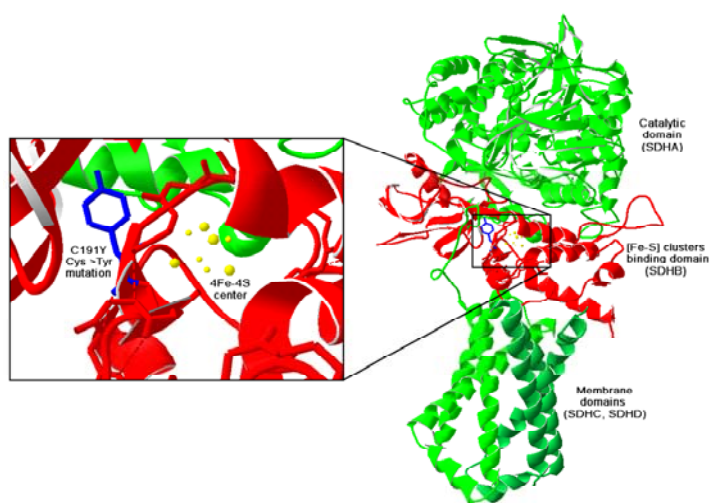


Fig. 4.8: Struttura tridimensionale della succinato deidrogenasi dove si osserva dove si posizione il residuo C184 nella proteina e quali interazioni possono essere destabilizzate con il cambiamento in tirosina.

Sulla base dell'analisi strutturale effettuata sulla proteina SDHB di *E. coli*, la sostituzione della cisteina in tirosina potrebbe avere effetti drammatici sulla funzione di SdhB (Fig. 4.8) per almeno due ragioni: i) l'impedimento sterico del nuovo aminoacido non è compatibile con la forma della proteina, con conseguenti "scontri" tra la catena laterale della tirosina e altre regioni della proteina, ii) la geometria e le proprietà fisico-chimiche della catena laterale della tirosina non consentono le interazioni con i cluster FeS o con altri residui coinvolti nella stabilizzazione del centro stesso.

4.1.7 DISCUSSIONE

I risultati sperimentali ottenuti utilizzando il lievito come modello supportano gli effetti deleteri della mutazione *sdh2*^{C184Y}. Infatti, gli studi di complementazione effettuati in un ceppo di lievito privo di Sdh2p hanno dimostrato che l'allele mutato *sdh2*^{C184Y}, introdotto mediante trasformazione nel mutante nullo *sdh2*, non ripristina la crescita OXPHOS. Inoltre, la misura dell'attività SDH ha indicato che la mutazione puntiforme *sdh2*^{C184Y} da sola comporta una completa perdita di funzione nel complesso della succinato deidrogenasi.

Che il residuo C191 svolga un ruolo cruciale per l'attività enzimatica del complesso catalitico Sdha/SdhB, così come nel complesso Sdh1/Sdh, è confermato dalle evidenze sperimentali ottenute sui tessuti tumorali della paziente mediante tecniche immunoistochimiche. Inoltre questi risultati sono in accordo con i cambiamenti strutturali che la mutazione C191Y induce a livello del cluster FeS [4Fe-4S], di SdhB.

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno dimostrato per la prima volta che il fenotipo OXPHOS del ceppo Δ *sdh2* e del ceppo *sdh2*^{C184Y} è associato ad una instabilità del mtDNA. In *S. cerevisiae* è noto che le condizioni che aumentano la produzione di ROS aumentano anche la mutabilità del mtDNA (Elledge *et al.* 1990; Wei *et al.*, 2002). Negli stessi mutanti è stato infatti osservato un significativo aumento della sensibilità al menadione e un incremento della produzione endogena di ROS. Se l'aumento della mutabilità mitocondriale osservata in lievito si possa verificare anche nelle cellule umane ed avere un ruolo causale nello sviluppo del tumore non è ancora stato valutato e sicuramente merita di essere indagato mediante esperimenti in tessuti tumorali umani che hanno mutazioni nei geni *SDH*.

In conclusione il lievito utilizzato in questo studio come sistema modello per la validazione di una mutazione fino ad ora mai descritta si è dimostrato essere un importante strumento per studiare le conseguenze funzionali di mutazioni, perlomeno nella sub-unità SdhB, trovate in pazienti affetti da sindromi PGL. Questo modello potrebbe essere di rilevanza clinica per stabilire il significato patogeno di nuove mutazioni o polimorfismi rari.

5. Risultati (III parte)

**IL LIEVITO COME MODELLO PER VALUTARE LA PATOGENICITÀ DI
MUTAZIONI NEI GENI *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* NELLE SINDROMI PGL**

Negli ultimi anni presso i Dipartimenti Clinici delle Università di Firenze, Padova, Brescia e Friburgo, con i quali è in atto una collaborazione, sono stati diagnosticati e trattati molti pazienti affetti da FEO/PGL sporadici e familiari; parte di questi pazienti è risultata portatrice di mutazioni nei geni *SDHB*, *SDHC* o *SDHD*, alcune delle quali non ancora descritte e per le quali non sempre è chiara la relazione causa-effetto tra la mutazione e la patologia.

I risultati ottenuti e descritti nel precedente capitolo, relativi allo studio in lievito della mutazione C191Y nel gene umano *SDHB* associato a tumore glomico, hanno validato il lievito come modello per analisi funzionali volte a valutare la patogenicità di mutazioni, almeno per quanto concerne questo gene. Pertanto, per studiare le conseguenze biochimiche e cellulari di mutazioni in questi geni di suscettibilità per le sindromi PGL, queste verranno inserite nei corrispondenti geni di *S. cerevisiae* *SDH2*, *SDH3*, *SDH4* e verranno analizzati i loro effetti sulla crescita ossidativa, sull'attività della succinato deidrogenasi, sulla stabilità dei complessi respiratori, sulla sensibilità allo stress ossidativo e sulla mutabilità del DNA mitocondriale.

5.1 STUDI DI COMPLEMENTAZIONE IN LIEVITO DI VARIANTI ALLELICHE NEL GENE UMANO *SDHB*

5.1.1 ANALISI *in silico* DELLE MUTAZIONI NEL GENE *SDH2*

Prima di procedere con la costruzione degli alleli mutati è stata condotta un'analisi per vedere se le mutazioni oggetto dello studio riguardassero residui aminoacidici conservati tra la proteina umana e quella di lievito e se tali residui cadessero in uno *stretch* conservato. Come è possibile osservare dall'allineamento tra ySdh2 e hSdhB, mostrato in figura 5.1 tutte le mutazioni tranne una riguardavano residui conservati e cadevano in *stretch* conservati. Pertanto era possibile costruire alleli mutati del gene *SDH2*, apportando sostituzioni in posizioni equivalenti a mutazioni nel gene umano *SDHB*.

```

SDH2      ---MLNVYLRKAFCLVTKKGMATATT---AAATHTPRLKTFKVVYWNPDDEPSAKPHLQS 54
SDHB      MAAVVALSLRRRLPATTLGGACLQASRGAQTAAATAPRIKKFAIYVNDPDKAGDKPHMQT 60
          :: : ***: . . . * : ***: **:*. * :***:***:.. ***:**

SDH2      YQVDYNDCGPMVLDALLKIYDEQDSTLTFYRSCREGICGSYAMNIGGRNTLACICKIDQN 114
SDHB      YEVDYLNKCGPMVLDALIKIYNEVDSTLTFYRSCREGICGSYAMNINGGNTLACTRRIDTN 120
          *:***.*****:***:* *****:*****.* ***** :** *

SDH2      ESKQLKLYPLPHMFIVKDLVDPDLTNFYQQYKSIQPYLQRSSFPKDG-TEVLQSIEDYKKL 173
SDHB      LNKVSKLYPLPHMYVIKDLVDPDLNLFYAQYKSIQPYLKKKDESQEGKQQYLOSIIEYKEL 180
          . * *****:*****:*** *****:***:.. :.* : *****:***

SDH2      DGLYECILCAECSTSPSYWVNQEQYLGPAVLMQAYVNLIDSRDQATKTKAMLNNSMSL 233
SDHB      DGLYECILCAECSTSPSYWVNGDKYLGPAVLMQAYVNMIDSRDDFTEELAKLQDPFSL 240
          *****:*****:*****: * * * * * :.***

SDH2      YCHTIMNCTRTPKGLNPLAIAEIKKSLAFA----- 266
SDHB      YCHTIMNCTRTPKGLNPKATAEIKMMATYKEKKASV 280
          *****:***** ***** :*

```

Fig. 5.1: Allineamento tra la sequenza della proteina di lievito Sdh2 e la proteina umana SdhB, ottenuto con Clustalw. Evidenziati sono i residui mutati

In tabella sono riportate le mutazioni missenso nel gene *SDHB* con le rispettive sostituzioni aminoacidiche che queste causano nella proteina umana e la sostituzione del residuo corrispondente nella proteina di lievito.

Base cambiata in <i>hSDHB</i>	Aminoacido sostituito in <i>hSdhB</i>	Aminoacido sostituito in <i>ySdh2</i>
c.23 C>T	S8F	S5F
c.137 G>T	R46L	R40L
c.137 G>A	R46Q	R40Q
c.194 T>G	L65R	L59R
c.237 A>G	K80E	K72E
c.269 G>A	R90Q	R84Q
c.302 G>A	C101Y	C95Y
c.379 A>G	I127V	I121V
c.530 G>A	R177H	R170H
c.588 C>G	C196W	C184W
c.650 G>T	R217L	R210L
c.724 C>T	R242S	R235S
c.724 C>A	R242C	R235C
c.778 G>C	G260R	G253R

Tab. 5.1: In tabella sono elencate le mutazioni missenso nel gene umano *SDHB* dei pazienti con le rispettive sostituzioni aminoacidi che causano nella proteina *hSdhB* e la sostituzione nel residuo di lievito corrispondente *ySdh2*

5.1.2 COSTRUZIONE DEGLI ALLELI MUTATI *sdh2E* E LORO INTRODUZIONE IN *S. cerevisiae*

Le diverse mutazioni sono state introdotte nel gene *SDH2* applicando il protocollo di mutagenesi QuickChange® *XL Site Directed Mutagenesis kit* riportato in dettaglio nella sezione “Materiali e metodi”. Come template è stato utilizzato il plasmide pFL38/*SDH2* precedentemente costruito. Questo ha permesso di ottenere una batteria di plasmidi in cui sono clonate le diverse varianti alleliche.

Il ceppo *Δsdh2* è stato trasformato con i costrutti recanti le diverse mutazioni e sui trasformanti ottenuti sono state effettuate diverse analisi fenotipiche e funzionali al fine di valutare se le mutazioni introdotte nel gene di lievito equivalenti a quelle trovate nei pazienti avessero un

effetto “patologico” in questo sistema modello. Tali analisi sono state condotte parallelamente anche sui ceppi $\Delta sdb2/SDH2$ e $\Delta sdb2/pFL38$, che vengono utilizzati, rispettivamente, come controllo positivo e negativo.

Tutte le mutazioni da studiare riguardavano residui conservati tranne una hS8F. La proteina Sdh2 di lievito ha in posizione equivalente (5) una leucina. In questi casi è comunque possibile studiare la mutazione “umanizzando” il gene di lievito ossia inserendo dapprima il codone per l'aminoacido umano wild-type e poi verificandone il fenotipo. Se questo è wild-type si può procedere con la mutagenesi per inserire la mutazione d'interesse. Nel caso specifico la leucina 5 è stata sostituita con una serina. L'allele umanizzato è stato introdotto nel mutante *sdb2* nullo e i trasformanti sono stati analizzati per la crescita su fonti di carbonio ossidabili e per l'attività SDH. Come è possibile vedere in figura 5.2c l'allele *sdb2*^{L5S} complementa perfettamente il fenotipo OXPHOS negativo e ripristina completamente l'attività succinato deidrogenasica. Si è quindi proceduto con la costruzione dell'allele mutato *sdb2*^{S5F} che corrisponde alla mutazione trovata nel gene umano *SDHB*.

5.1.3 CRESCITA OSSIDATIVA E ATTIVITÀ SDH

Per prima cosa è stato valutato il fenotipo di crescita ossidativa ovvero la capacità dei diversi alleli di complementare il fenotipo negativo di crescita su fonti non fermentabili del mutante nullo. A tale scopo sono state seminate diluizioni seriali (10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 cellule/spot) di cellule in crescita esponenziale su terreno contenente glucosio 2% e su terreno contenente etanolo o glicerolo al 2%. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione a 28°C.

In terreno minimo addizionato con fonti di carbonio fermentabili i mutanti non mostrano alcuna differenza nella velocità di crescita rispetto al ceppo wild-type, mentre mostrano evidenti differenze nella crescita ossidativa. Infatti, come si può osservare dalla figura 5.2 i mutanti mostrano fenotipi OXPHOS diversi: i mutanti yR40L, yC95Y, yC189W, YR210L, yR223G e yR235S non sono in grado di crescere su fonti di carbonio ossidabili così come l'allele nullo $\Delta sdb2$ (Fig. 5.2a); i mutanti yR40Q, yL59R, yK72E, R84Q, yR170H e yR235C sono in grado di complementare solo parzialmente il difetto di crescita ossidativa del mutante nullo $\Delta sdb2$ (Fig. 5.2b); i mutanti yS5F, yI121V e yG253R mostrano un fenotipo di crescita ossidativa simile a quello del ceppo selvatico (Fig. 5.2c).

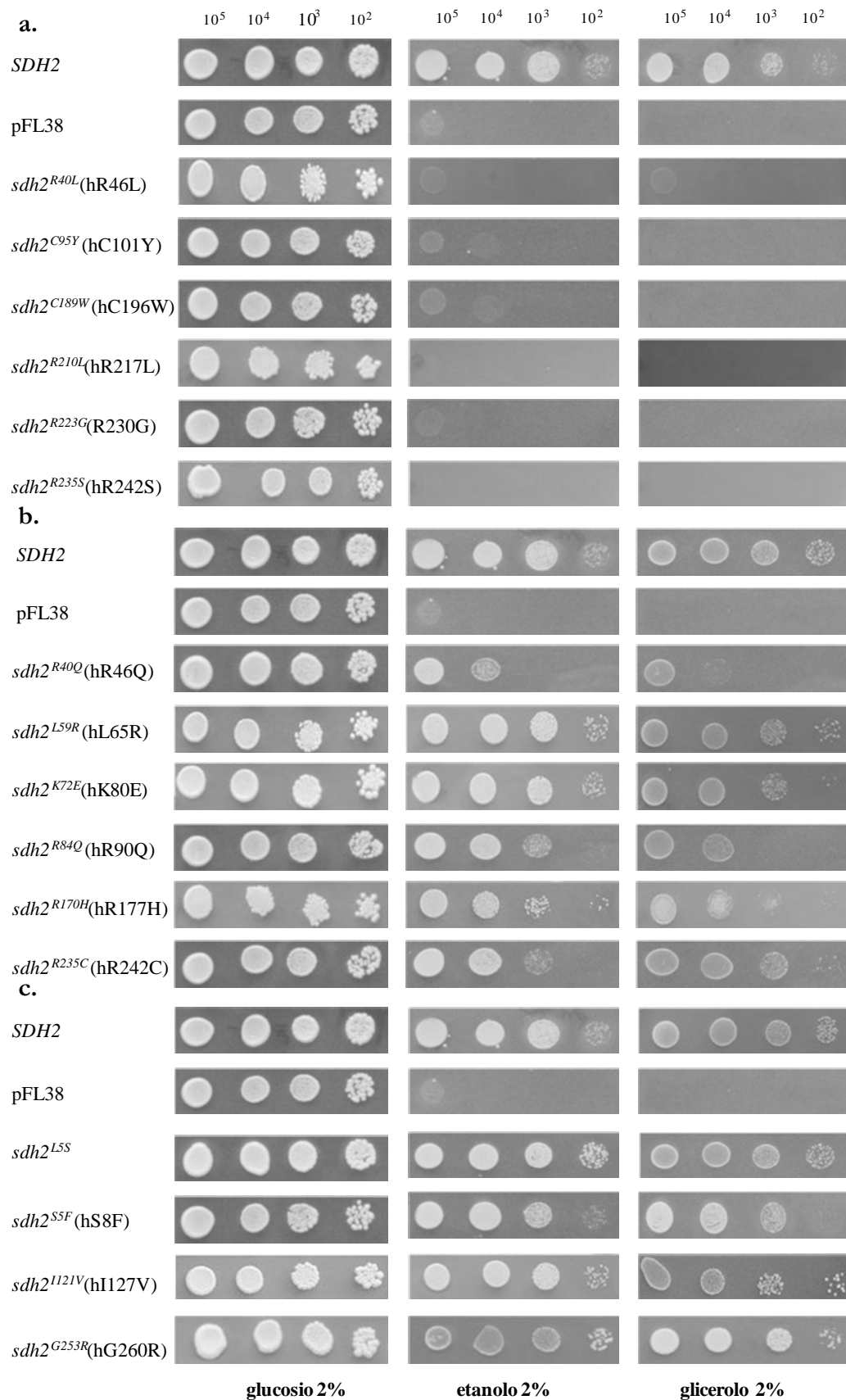


Fig. 5.2: Crescita ossidativa dei mutanti *SDH2* **a)** Mutanti che non sono in grado di crescere su fonti di carbonio ossidabili così come l'allele nulla Δ *sdh2* **b)** Mutanti che sono in grado di complementare solo parzialmente il difetto di crescita ossidativa del mutante nullo Δ *sdh2* **c)** Mutanti con un fenotipo di crescita simile a quello del ceppo wild-type. Della mutazione *sdh2*^{S5F} è mostrata anche la crescita dell'allele umanizzato *sdh2*^{L5S}

Successivamente è stata valutata l'influenza delle mutazioni sull'attività della succinato deidrogenasi. Il saggio dell'attività succinato PMS/DCPIP dipendente è stato eseguito in mitocondri isolati dai diversi ceppi mutanti cresciuti a 28°C per 36 ore in terreno selettivo per il mantenimento del plasmide, addizionato di glucosio allo 0,6%. Come si può osservare dai grafici riportati in figura 5.3 a, b e c i livelli di attività della succinato deidrogenasi differiscono significativamente tra i diversi mutanti. I mutanti yR40L, yC95Y, yC189W, yR210L, yR223G e yR235S mostrano un'attività enzimatica completamente abbattuta (Fig. 5.3a), i mutanti yR40Q, yL59R, yK72E, R84Q, yR170H e yR235C, mostrano una significativa riduzione dell'attività SDH, rimane infatti un'attività residua del 30/60% rispetto a quella del ceppo wild-type (Fig. 5.3b) mentre nei mutanti yS5F, yI121V e yG253R l'attività enzimatica non differisce significativamente a quella del ceppo selvatico (Fig. 5.3c).

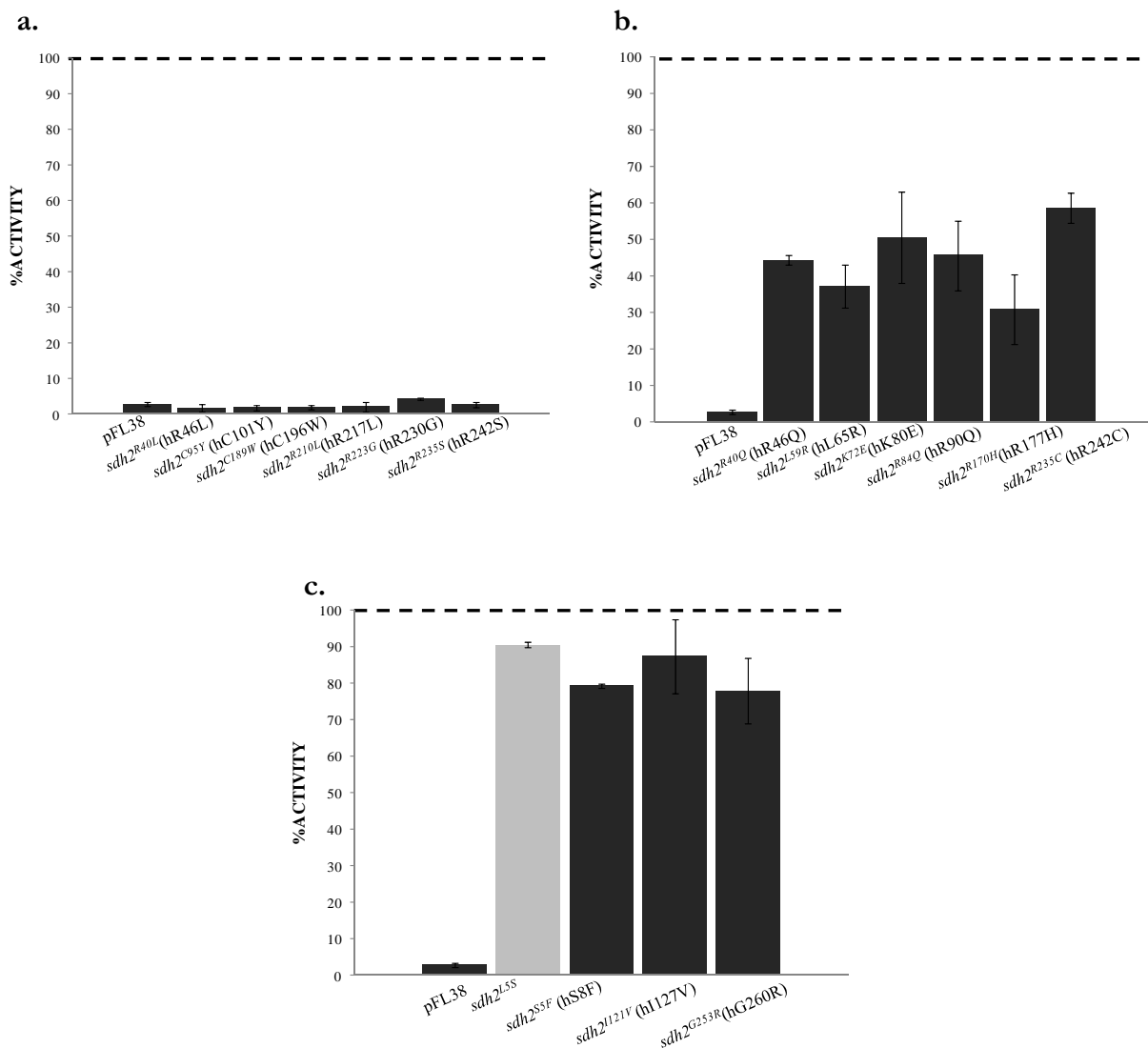


Fig.5.3: Attività dell'enzima SDH dei mutanti *sdh2*. **a)** Mutanti con attività enzimatica completamente abbattuta; **b)** Mutanti con attività enzimatica ridotta, 30/60% rispetto a quella del wild-type; **c)** Mutanti con attività enzimatica non significativamente ridotta rispetto a quella del wild type. Della mutazione *sdh2*^{S5F} è mostrata anche l'attività SDH, istogramma grigio, dell'allele umanizzato *sdh2*^{L55}, che è all'incirca il 98%

L'attività enzimatica è espressa micromoli di sub-strato utilizzato per minuto per milligrammo di proteine. Gli istogrammi rappresentano la percentuale di attività rispetto al ceppo wt

Sulla base dei risultati ottenuti, relativi alla crescita ossidativa e all'attività succinato deidrogenasica, le mutazioni nel gene di lievito *SDH2* si possono classificare in tre gruppi:

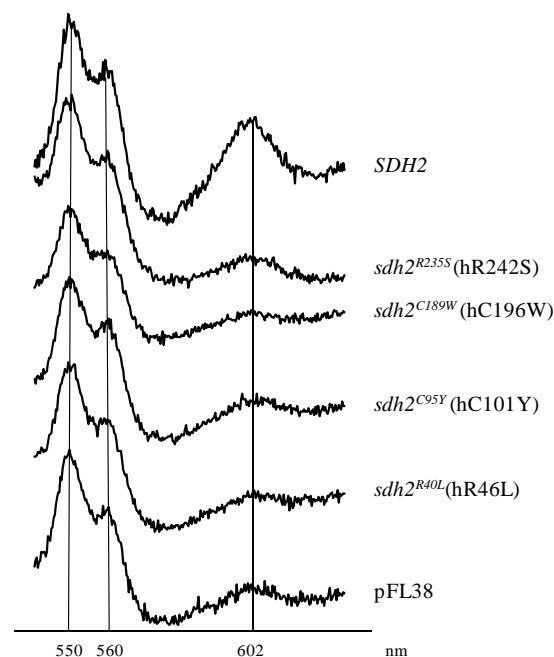
- 1) mutazioni che causano un fenotipo grave: R40L (hR46L), C95Y (hC101), C189W (hC196W), R210L (hR217L), R223G (hR230G) e R235S (hR242S) sono varianti alleliche del gene *SDH2* incapaci di complementare il fenotipo OXPHOS e di ripristinare l'attività enzimatica del mutante nullo Δ *sdb2*, hanno quindi lo stesso fenotipo dell'allele nullo, mostrando una totale perdita di funzione;
- 2) mutazioni che hanno un effetto parziale, mutazioni "leaky": le mutazioni R40Q (hR46L), L59R (hL65R), K72E (hK80E), R84Q (hR90Q), R170H (hR177H) e R235C (hR242C) causano un significativo abbattimento dell'attività della succinato deidrogenasi che mediamente risulta abbattuta del 50%. Questa attività residua è comunque fisiologicamente significativa, in quanto in grado di sostenere, seppur parzialmente, la crescita ossidativa;
- 3) mutazioni che non hanno alcun effetto sul fenotipo: le varianti alleliche S5F (hS8F), I121V (hI127V), G253R (hG260R) conferiscono un fenotipo indistinguibile da quello del ceppo selvatico.

5.1.4 FUNZIONALITÀ E STRUTTURA DELLA CATENA RESPIRATORIA

Abbiamo poi voluto analizzare gli effetti delle mutazioni in esame sulla funzionalità della catena respiratoria e, per alcuni di questi, sulla struttura dei citocromi respiratori per valutare se mutazioni con fenotipo OXPHOS di diversa gravità, potessero influenzare in modo diverso la funzionalità mitocondriale. Entrambe le misure sono state eseguite su cellule intere cresciute a 28°C in terreno minimo selettivo addizionato di glucosio allo 0,6%, fino all'esaurimento della fonte di carbonio (vedi "Materiali e metodi"). Anche in questo caso l'analisi è stata condotta parallelamente sui ceppi di controllo: il ceppo Δ *sdb2* trasformato con il plasmide recante l'allele wild-type come controllo positivo e lo stesso ceppo trasformato col plasmide privo di inserto.

Come mostrato in tabella 5.2 gli alleli mutati incapaci di complementare la mutazione nulla *sdb2* e privi di attività SDH hanno mostrato un consumo di ossigeno significativamente ridotto (50% di quello del ceppo parentale) in accordo con quanto precedentemente osservato (Goffrini *et al.*, 2009). Il profilo dei citocromi respiratori, mostrato in figura 5.4 per alcuni di questi mutanti: *sdb2*^{C95Y}, *sdb2*^{C189W}, *sdb2*^{R40L} e *sdb2*^{R242S}, mostrava una riduzione significativa del picco del citocromo *aa3*, mentre i picchi corrispondenti al citocromo *b* e *c* sono del tutto paragonabili a quelli del ceppo selvatico; nel complesso mostrano un comportamento del tutto analogo a quello del mutante nullo Δ *sdb2*.

Allele	Attività respiratoria ^a
<i>SDH2</i>	20,0 ± 3,7
<i>pFL38</i>	9,3 ± 3,0
<i>sdh2^{R40L}</i> (hR46L)	11,2 ± 1,2
<i>sdh2^{C95Y}</i> (hC101Y)	10,4 ± 2,3
<i>sdh2^{C184W}</i> (hC196W)	12,4 ± 0,3
<i>sdh2^{R210L}</i> (hR217L)	10,0 ± 0,3
<i>sdh2^{R223G}</i> (hR230G)	11,6 ± 1,6
<i>sdh2^{R235S}</i> (hR242S)	6,0 ± 0,5



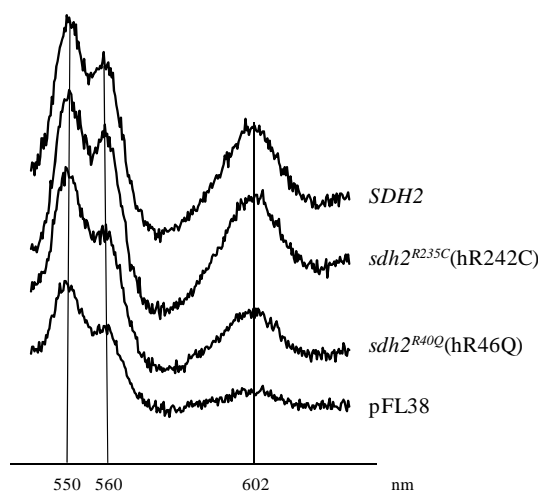
Tab.5.2: Attività respiratoria dei mutanti con fenotipo nullo, come allele *Δsdh2*.

^a respirazione espressa in $\text{nmolO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg cellule in peso secco})^{-1}$

Fig.5.4: Spettri di assorbimento dei citocromi respiratori, ridotti contro ossidati, del ceppo *Δsdh2* trasformato con l'allele *SDH2* wild-type, gli alleli mutati *sdh2^{R40L}*, *sdh2^{C95Y}*, *sdh2^{C189W}* e *sdh2^{R235S}*, il plasmide vuoto pFL38. I picchi di assorbimento a 550, 560 e 602nm (barre verticali) corrispondono ai citocromi *c*, *b* e *aa3*. L'altezza di ogni picco rispetto alla linea di base di ciascuno spettro è indice del contenuto di citocromi

I mutanti in cui la crescita ossidativa e l'attività enzimatica non era influenzata, o lo era solo parzialmente, mostravano invece un consumo di ossigeno uguale a quello del ceppo wild-type (Tab 5.3), suggerendo che un'attività SDH solo parzialmente ridotta non compromette il flusso di elettroni lungo la catena respiratoria. Le varianti *sdh2^{R40Q}* e *sdh2^{R242C}*, da noi definite *leaky* presentavano un profilo dei citocromi uguale a quello del ceppo selvatico, che rende conto dell'elevato livello di attività respiratoria posseduta da questi mutanti (Fig.5.5).

Allele	Attività respiratoria ^a
<i>SDH2</i>	20,0 ± 3,7
<i>pFL38</i>	9,3 ± 3,0
<i>sdh2^{R40Q}</i> (hR46Q)	16,5 ± 1,3
<i>sdh2^{L59R}</i> (hL65R)	20,4 ± 5,4
<i>sdh2^{K72E}</i> (hK80E)	21,9 ± 2,1
<i>sdh2^{R84Q}</i> (hR90Q)	20,3 ± 3,7
<i>sdh2^{I121V}</i> (hI127V)	16,2 ± 1,1
<i>sdh2^{R235C}</i> (hR242C)	14,7 ± 1,2
<i>sdh2^{S5F}</i>	16,3 ± 2,4
<i>sdh2^{S5F}</i> (hS8F)	15,7 ± 2,9
<i>sdh2^{I121V}</i> (hI127V)	16,2 ± 1,1
<i>sdh2^{R170H}</i> (hR177H)	20,4 ± 1,0
<i>sdh2^{G253R}</i> (hG260R)	22,4 ± 4,5



Tab.5.3: Attività respiratoria dei mutanti con fenotipo "leaky" e con fenotipo wild-type.

^a respirazione espressa in $\text{nmolO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg cellule in peso secco})^{-1}$

Fig.5.5: Spettri di assorbimento dei citocromi respiratori, ridotti contro ossidati, del ceppo *Δsdh2* trasformato con l'allele *SDH2* wild-type, gli alleli mutati *sdh2^{R40Q}* e *sdh2^{R235C}*, il plasmide vuoto pFL38.

In figura 5.8 si può osservare la crescita su menadione dei mutanti con fenotipo “leaky” e wild-type; nessuno di questi risulta ipersensibile al menadione.

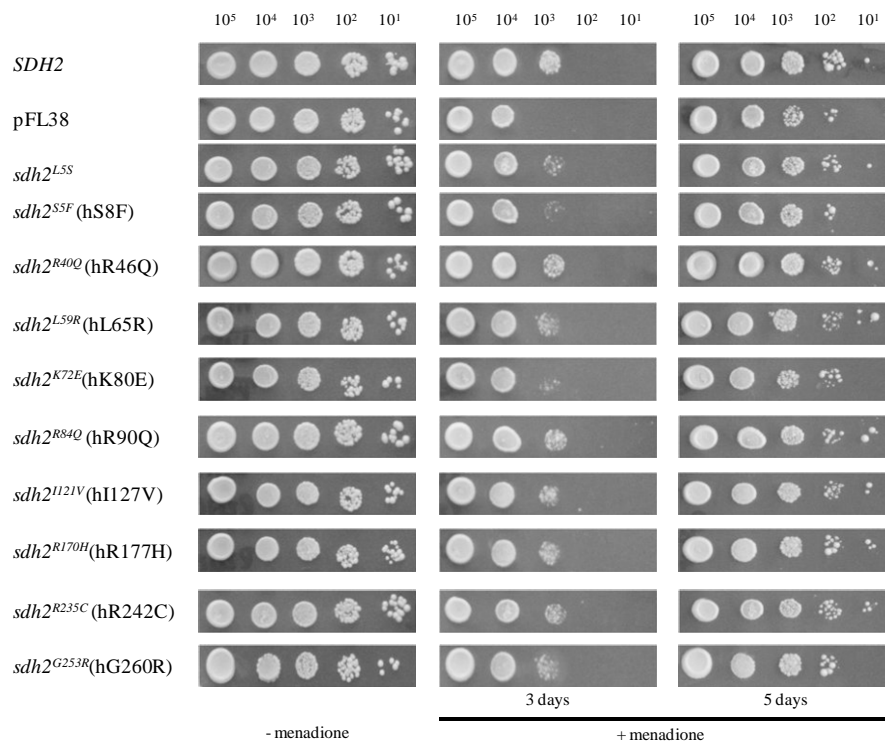


Fig.5.8: Sensibilità al menadione dei mutanti con fenotipo “leaky” e simile al wild type. Sono state seminate diluizioni seriali (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB+DO) addizionate con glucosio al 2% e menadione $30\mu\text{M}$. La crescita è stata osservata dopo 3 e 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C .

5.1.6 STABILITÀ DEL DNA MITOCONDRIALE

Come già osservato per la mutazione *sdh2*^{C184Y} il fenotipo OXPHOS e l'accumulo di ROS sono associati a instabilità del mtDNA, che in lievito determina un aumento della frequenza di mutanti *petite* citoplasmatici. Ci siamo quindi chiesti se i due fenotipi, aumento dei ROS e mutabilità del mtDNA, fossero associati anche negli alleli mutati *sdh2* considerati in questo studio. A questo scopo abbiamo misurato la frequenza di mutanti *petite* citoplasmatici dei diversi mutanti *sdh2*. L'esperimento è stato condotto come descritto nel capitolo 4 (paragrafo 4.1.6), la frequenza di mutazione definita come la percentuale di colonie *petite* sul totale delle cellule contate dopo 5 giorni di incubazione a 28°C , calcolata come media di cinque esperimenti indipendenti.

Come si può osservare dal grafico (Fig 5.9), la percentuale di colonie *petite* è di circa tre volte superiore a quella del ceppo wild-type nei mutanti yR40L, yC95Y, yC189W, yR210L, yR223G e yR235S, quelli cioè che si comportano come il mutante nullo.

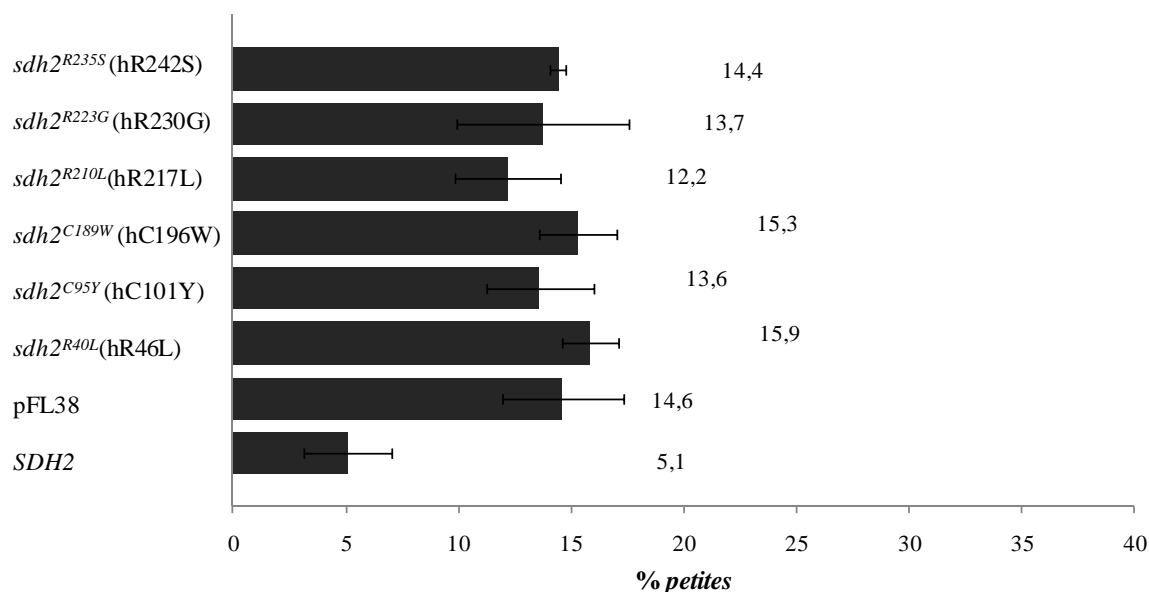


Fig.5.9 : Determinazione della frequenza di mutanti *petite* dei mutanti a fenotipo nullo. Per ogni ceppo è riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno minimo (YNB+DO) addizionato di glucosio 0,2% e etanolo2%. Per ogni ceppo sono stati condotti cinque esperimenti indipendenti.

Al contrario la frequenza di comparsa di mutanti *petite* i nei ceppi yS5F, yR40Q, yL59R, yK72E, yR84Q, yI121V, yR170H, yR235C e yG253R non è statisticamente differente rispetto a quella del ceppo selvatico. Un abbattimento dell'attività succinato deidrogenasica di circa il 50% sembrerebbe non avere conseguenze significative sulla stabilità del mtDNA (Fig. 5.10).

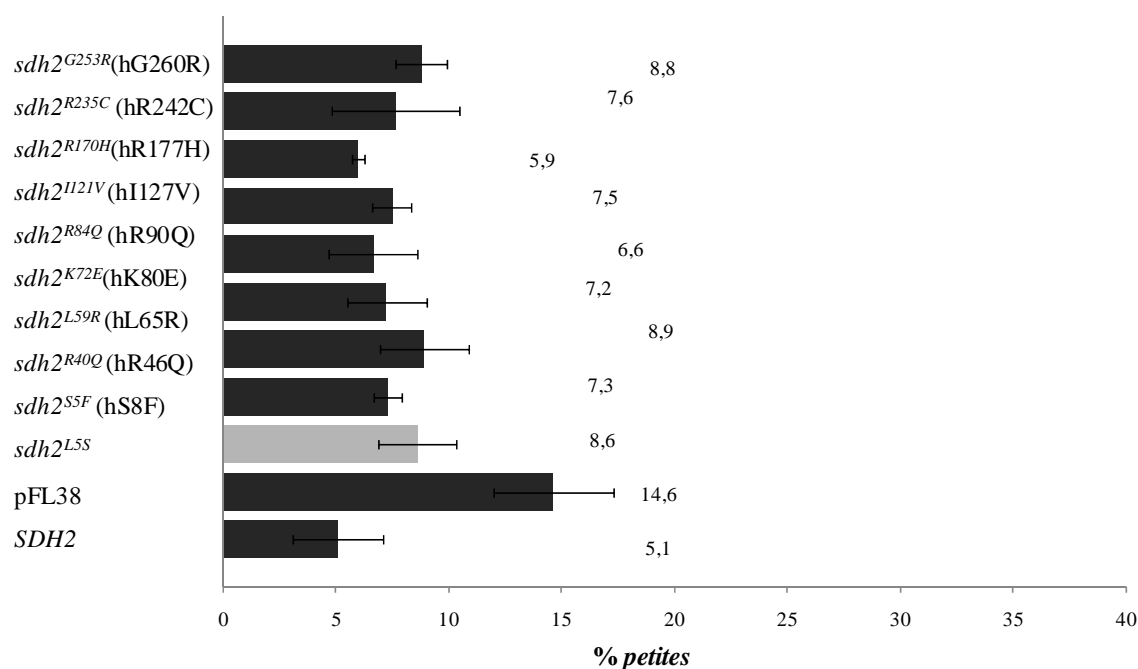


Fig.5.10: Determinazione della frequenza di mutanti *petite* dei mutanti a fenotipo “leaky” e simile al wild type. Per ogni ceppo è riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno minimo (YNB+DO) addizionato di glucosio 0,2% e etanolo2%. Per ogni ceppo sono stati condotti cinque esperimenti indipendenti.

5.1.7 DISCUSSIONE

I risultati ottenuti indicano che solo le varianti alleliche R40L (hR46L), C95Y (hC101Y), C189W (hC196W), R210L (hR217L), R223G (hR230G) e R235S (hR242S), associate a forme tumorali nell'uomo sono patologiche anche per il lievito. Le mutazioni definite “*leaky*” o *mild* per il lievito R40Q (hR46Q), L59R (hL65R), K72E (hK80E), R84Q (hR90Q), R170H (hR177H) e R235C(hR242C) pur mostrando una riduzione significativa dell'attività SDH non determinano né un aumento della frequenza di mutanti *petite*, né una maggior sensibilità allo stress ossidativo, suggerendo che tali mutazioni potrebbero non essere l'unica causa della formazione di tumori PGL.

L'effetto nullo delle mutazioni S5F (hS8F), I12IV (hI127V) e G253R (hG260R) può avere una spiegazione strutturale. Sulla base degli studi effettuati in lievito le varianti S5F (hS8F), I12IV (hI127V) e G253R (hG260R), potrebbero essere considerate SNPs neutrali

L'osservazione che in numerosi mutanti, presi in considerazione in questo studio, all'abbattimento dell'attività succinato deidrogenasica sia associato un maggior accumulo di ROS intracellulari e un aumento della mutabilità del DNA mitocondriale, suggerisce che l'instabilità del mtDNA possa avere un ruolo causale nello sviluppo del tumore.

5.2 STUDI DI COMPLEMENTAZIONE IN LIEVITO DI VARIANTI ALLELICHE NEI GENI UMANI *SDHC* e *SDHD*

Come è stato già detto il gene *SDHB* non è il solo gene di suscettibilità legato alle sindromi PGL; infatti associate a queste forme tumorali sono state identificate anche mutazioni nei due geni *SDHC* (PGL3) e *SDHD* (PGL1) che codificano per le due sub-unità costituenti il dimero di membrana deputato all'ancoraggio del complesso SDH alla membrana mitocondriale interna.

5.2.1 ANALISI *in silico* DELLE MUTAZIONI NEI GENI *SDH3* e *SDH4*

Anche in questo caso, prima di procedere con la costruzione degli alleli mutati, è stata condotta un'analisi per valutare se le mutazioni in *SDHC* e *SDHD* oggetto dello studio riguardassero residui aminoacidici conservati tra le proteine umane e quelle di lievito e se tali residui cadessero in uno *stretch* conservato. Contrariamente alla sub-unità ferro zolfo, per la quale c'è un'alta identità di sequenza tra l'umana e quella di lievito, le due proteine SdhC e SdhD, che formano il dimero di membrana del complesso II, non sono molto conservate; 24% e 16% sono rispettivamente le percentuali di identità di sequenza tra la proteina di uomo e quella di lievito. Ciò nonostante, come è possibile osservare dall'allineamento tra ySdh3 e hSdhC (Fig 5.11), due

(R50C e I58T) su tre delle varianti di interesse riguardano residui conservati e cadono in *stretch* conservati

```

SDH3      MSAMMVKLGLENKSALLLKPSAFSRAAALSSSRLLFNFTARTNFLTSTPLKNVASEMNTKA 60
SDHC      -----MAALLLRHVGR-----HCLRAHFSPQLCIRNAVPLGTTAK 35
          :****: . : **:* . :*:... .*

SDH3      AIAEEQILNKQRAKRPDISPHLTYQPQLTWYLSLHRISLVLMLGFGFYLFITILFGVSGLL 120
SDHC      EEMERFWNKNIGSNKPLSPHITYSWSLPMAMSICHRGTGIALSAG----VSLFGMSALL 91
          * . :. :****:***:***. *. :* ** : : :. * . ****:***

SDH3      GLGLTTEKVSNNWYHQKFSKITEWSIKGSFAYLFAIHYGGAIRHLIWDTAKELTLKGVYRT 180
SDHC      LPGNFESYLELVKSLCLGPALIHAKFALVFPMLYHTWNGIRHLMWDLGKGLKIPQLYQS 151
          * . :. :. : : * : : : : * ..****:*** .* *.: :*:

SDH3      GYALIGFTAVALGTYLLTL 198
SDHC      GVVVLVLTVLSSMGLAAM 169
          * .: :*: . * :

```

Fig. 5.11: Allineamento di sequenza, ottenuto con Clustalw, tra la sequenza della proteina di lievito Sdh3 e la proteina umana SdhC. Evidenziati sono i residui sostituiti nella proteina, in rosso i residui conservati e in giallo quelli non conservati

Riguardo alle sette mutazioni in *SDHD* (Fig. 5.12) in esame solo quattro (G12S, P53L, T112I e Y114C) coinvolgono residui conservati tra le due proteine anche se lo *stretch* non lo è. Gli altri tre residui (H50R, P81L e G106D) non sono conservati ed inoltre cadono in domini non conservati.

```

SDH4      MMLPRSMKFMTRRIFHTATVRAFQSTAKKSLTIPFLPVLVLPQKPGGVRGTPNDAYVFPPE 60
SDHD      MAVLWRLSAVCR-----ALGGRALLLRTPVVRPAHISAFQLDRPIPEWCQVQHIHLSPSH 55
          * : .: : * : **: : . : .* :*: .: :*:..

SDH4      NK--LEGSYHWYMEKIFALSVVPLATTAMLTGPLSTAADSFFSVMLGICYMEFNSCI 118
SDHD      HSGSKAASLHWTSERVVSLLLGLLPAAYLNE---CSAMDYSLAAALTLHGHWGLGQVVT 112
          :. . * ** *::: : : * .:* *.. .:* * :. * : : :.. :*

SDH4      DYISERVYGVVHKYAMYMLGLGSAVSLFGIYKLETENDGVVGLVKLSLWDSSEKDNSQKIE 178
SDHD      DYVHGDALQKAAGLAL---SALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL----- 159
          **: . * .: * **::: * : : : : * **

SDH4      AKK 181
SDHD      ---

```

Fig. 5.12: Allineamento di sequenza, ottenuto con Clustalw, tra la sequenza della proteina di lievito Sdh4 e la proteina umana SdhD. Evidenziati sono i residui sostituiti nella proteina, in rosso i residui conservati e in giallo quelli non conservati

Pur sapendo che questa condizione non rappresenta la condizione ottimale per lo studio in lievito di mutazioni umane, abbiamo comunque deciso di valutare gli effetti anche delle mutazioni non conservate costruendo le varianti umanizzate.

Nelle tabelle (Tab 5.4a e b), sono riportate le mutazioni missenso nei geni umani *SDHC* e *SDHD* dei pazienti con le rispettive sostituzioni aminoacidi che queste causano nelle proteine umane SdhCp e SdhDp, e la sostituzione del residuo corrispondente nelle proteine di lievito Sdh3 e 4.

Base cambiata in <i>hSDHC</i>	Amminoacido sostituito in <i>hSdhC</i>	Aminoacido sostituito in <i>ySdh3</i>
c.148 C>T	R50C	R75C
c.173 T>C	I58T	I58T
c.490 A>T	M164L	M193L

Tab. 5.4a: In tabella sono elencate alcune mutazioni missenso nel gene umano *SDHC* dei pazienti, con le rispettive sostituzioni aminoacidiche che causano nella proteina *hSdhC* e la sostituzione nel residuo di lievito

Base cambiata in <i>hSDHD</i>	Amminoacido sostituito in <i>hSdhD</i>	Aminoacido sostituito in <i>ySdh4</i>
c.34 G>A	G12S	G12S
c.149 A>G	H50R	H55R
c.158 C>T	P53L	P58L
c.242 C>T	P81L	P84L
c.335 C>T	G106D	G112D
c.341 A>G	T112I	T118I
c.34 G>A	Y114C	Y120C

Tab. 5.4b: In tabella sono elencate alcune mutazioni missenso nel gene umano *SDHD* dei pazienti, con le rispettive sostituzioni aminoacidiche che causano nella proteina *hSdhD* e la sostituzione nel residuo di lievito

5.2.2 COSTRUZIONE DEGLI ALLELI MUTATI *sdh3* E *sdh4* E LORO INTRODUZIONE IN *S. cerevisiae*

Le diverse mutazioni sono state introdotte nei geni *SDH3* e *SDH4* applicando il protocollo di mutagenesi QuickChange® *XL Site Directed Mutagenesis kit* riportato in dettaglio nella sezione “Materiali e metodi”. Come template sono stati utilizzati i plasmidi pFL38/*SDH3* e pFL38/*SDH4* costruiti come descritto nel capitolo 3 (paragrafo 3.3). Questo ha permesso di ottenere una batteria di plasmidi in cui sono clonate le diverse varianti alleliche di questi due geni. Per le mutazioni che coinvolgono residui non conservati è stato necessario costruire per ognuna la “variante umanizzata” e verificare che i ceppi trasformati con questi costrutti fossero indistinguibili dal ceppo wild-type per quanto riguarda sia la crescita ossidativa che l’attività enzimatica. Sulla base dei risultati ottenuti è stato deciso se procedere con la costruzione dell’allele mutato.

I plasmidi recanti le diverse mutazioni sono stati introdotti mediante trasformazione nei mutanti nulli *Δsdh3* e *Δsdh4* rispettivamente e sui trasformanti ottenuti sono state effettuate diverse analisi

fenotipiche e funzionali al fine di valutare se le mutazioni introdotte nel gene di lievito ed equivalenti a quelle trovate nei pazienti avessero un effetto “patologico” in questo sistema modello. Tali analisi sono state condotte parallelamente sui ceppi $\Delta sdh3/SDH3$ e $\Delta sdh3/pFL38$, $\Delta sdh4/SDH4$ e $\Delta sdh4/pFL38$ come controlli positivi e negativi rispettivamente.

Per la mutazione yM193L, che coinvolge un residuo non conservato tra ySdh3 e hSdhC è stato necessario prima costruire la variante umanizzata $sdh3^{T193L}$. Una volta verificata la complementazione del fenotipo OXPHOS e il recupero dell’attività SDH è stata costruita e poi studiata la variante allelica hM164L.

Anche le varianti umanizzate $sdh4^{Y55H}$, $sdh4^{T84P}$ e $sdh4^{E112G}$ crescono su terreno minimo contenente etanolo 2% o glicerolo 2%, al pari del ceppo selvatico e presentano un’attività succinato deidrogenasica simile a quella del ceppo parentale. Dal momento che le varianti umanizzate non compromettono la funzionalità della succinato deidrogenasi, sono stati costruiti e studiati gli alleli mutati $sdh4^{H150R}$, $sdh4^{P81L}$ e $sdh4^{G106D}$, corrispondenti alle mutazioni trovate nel gene umano *SDHD*.

5.2.3 CRESCITA OSSIDATIVA E ATTIVITÀ SDH DEI MUTANTI *sdh3* E *sdh4*

SDH3: Sui ceppi trasformanti ottenuti e contenenti gli alleli mutati è stato analizzato il fenotipo OXPHOS. Tutti i mutanti sono in grado di crescere su fonti di carbonio ossidabili (Fig. 5.13).

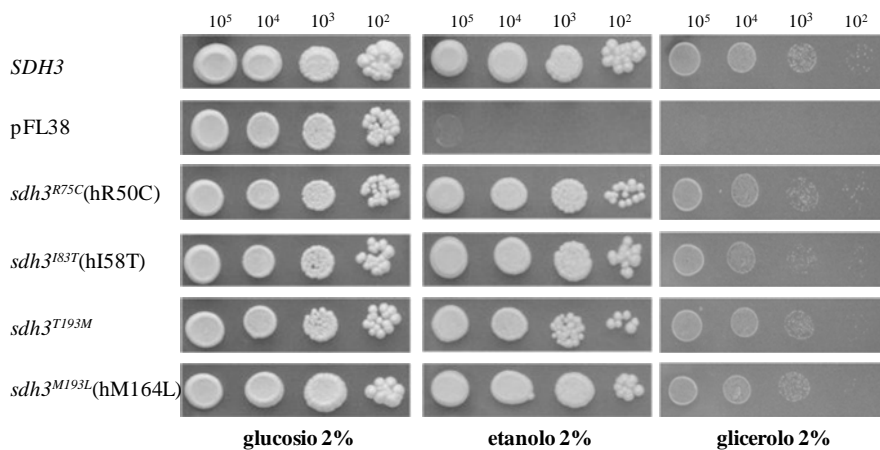


Fig. 5.13: Crescita ossidativa dei mutanti *SDH3* Sono state seminate diluizioni seriali (10⁵, 10⁴, 10³, 10² cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB) addizionate con glucosio al 2% o etanolo al 2% o glicerolo 2%. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C.

L’attività SDH risulta abbattuta del 50% nel mutante yR75C mentre nessuna differenza o differenze minime sono state osservate negli altri mutanti (Fig 5.14)

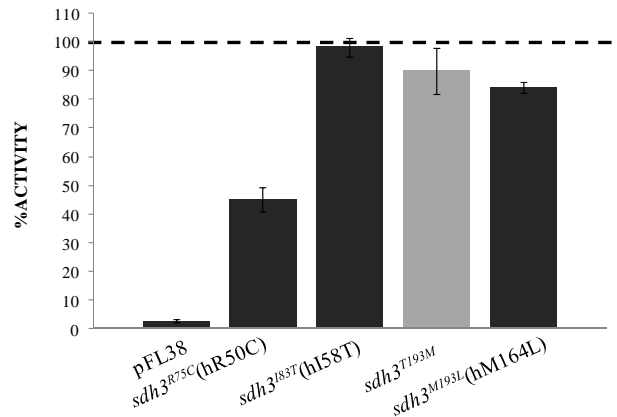


Fig. 5.14: Attività dell'enzima SDH dei mutanti *sdh3*. Della mutazione *sdh3^{M193L}* è mostrata anche l'attività SDH, istogramma grigio, dell'allele umanizzato *sdh3^{T193M}*, che è all'incirca il 90%. L'attività enzimatica è espressa nmoli di sub-strato utilizzato per minuto per milligrammo di proteine. Gli istogrammi rappresentano la percentuale di attività rispetto al ceppo wt

SDH4: Per prima cosa è stato valutato il fenotipo di crescita ossidativa; in particolare è stata saggiata la capacità degli alleli yG12S, y H55R, yP84L, yP58L, yT118I, yG112D e yY120C di complementare il fenotipo negativo di crescita su fonti non fermentabili del mutante nullo.

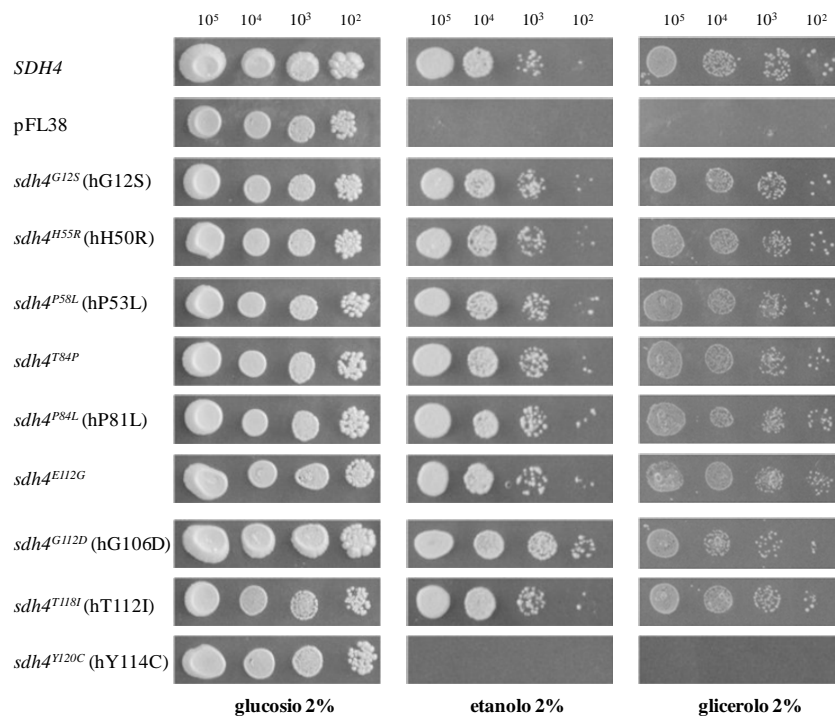


Fig. 5.15: Crescita ossidativa dei mutanti *SDH4* Sono state seminate diluizioni seriali (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB) addizionate con glucosio al 2% o etanolo al 2% o glicerolo 2%. La crescita è stata osservata dopo 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C.

Come si può osservare in figura 5.15, dopo 5 giorni di crescita a 28°C, ad eccezione del mutante *sdh4^{Y120C}*, nessuno dei mutanti mostra un significativo difetto di crescita OXPHOS. Questo risultato è coerente con il fatto che la mutazione Y114C è una mutazione ricorrente, ritrovata in una specifica area del Trentino, il cui effetto fondatore è stato dimostrato.

I risultati relativi all'attività enzimatica succinato-PMS/DCPIP dipendente (Fig.5.16) misurata nei mutanti *sdh4* mostrano come questa sia solo leggermente ridotta nei mutanti yY120C e yP58L. Il fatto che il mutante *sdh4*^{Y120C} non cresca su fonti di carbonio ossidabili pur presentando un'attività SDH normale non è sorprendente dal momento che è stato già dimostrato che la tirosina 114 è essenziale per l'attività ubiquinone reduttasi, ma non per l'attività succinato-PMS/DCPIP reduttasi (Silkin *et al.*, 2006). L'attività SDH risulta abbattuta del 50% nel mutante yT118I mentre nessuna differenza o differenze minime sono state osservate negli altri mutanti.

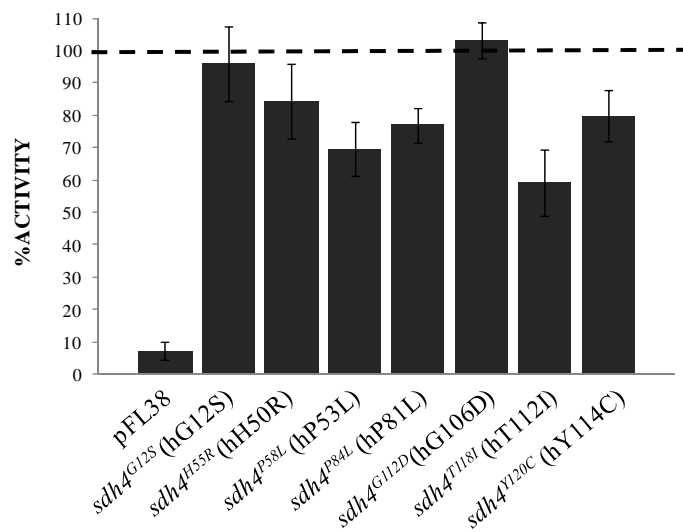


Fig. 5.16: Attività dell'enzima SDH dei mutanti *sdh4*. L'attività enzimatica è espressa nmoli di sub-strato utilizzato per minuto per milligrammo di proteine. Gli istogrammi rappresentano la percentuale di attività rispetto al ceppo wt

In tutti i mutanti analizzati, sia *sdh3* che *sdh4*, la respirazione non differiva da quella del ceppo selvatico (Tab.5.5).

Allele	Attività respiratoria ^a
<i>SDH3</i>	36,4±1,1
<i>pFL38</i>	32,5±1,5
<i>sdh3^{R75C}</i> (hR50C)	38,9±0,7
<i>sdh3^{R83T}</i> (hI58T)	37,0 ±2,5
<i>sdh3^{M193L}</i> (hM164L)	34,3 ±3,5
<i>SDH4</i>	23,2 ± 2,8
<i>pFL38</i>	11,9 ± 3,5
<i>sdh4^{G12S}</i> (hG12S)	21,4 ± 3,8
<i>sdh4^{H55R}</i> (hH50R)	18,7 ± 2,1
<i>sdh4^{P55L}</i> (hP53L)	16,9 ± 4,2
<i>sdh4^{P84L}</i> (hP81L)	16,4 ± 5,5
<i>sdh4^{G112D}</i> (hG106D)	21,6 ± 2,8
<i>sdh4^{T118I}</i> (hT112I)	15,0 ± 4,0
<i>sdh4^{Y110C}</i> (hY114C)	17,2 ± 4,0

Tab. 5.5: Attività respiratoria dei mutanti *SDH3* e *SDH4*
^a respirazione espressa in nmolO₂*min⁻¹*(mg cellule in peso secco)⁻¹

È noto che il fenotipo OXPHOS del mutante nullo Δ *sdh4* è compensato dall'over espressione del gene *YLR164w*, che è stato ritrovato, in precedenti studi svolti nel nostro dipartimento, come soppressore muticopia del gene *SDH4*. *YLR164w* è un gene a funzione sconosciuta che codifica per una proteina che studi di “*high throughput*” localizzano nella membrana mitocondriale interna e la cui sequenza aminoacidica mostra un'identità del 46% rispetto al prodotto del gene *SDH4*. Il livello di conservazione fra le sequenze aminoacidiche di Sdh4p e YLR164Wp suggerisce che il gene derivi da una duplicazione di un gene ancestrale comune. Gli studi fino ad ora condotti, inoltre, favoriscono l'ipotesi che la proteina Ylr164Wp overespressa sia capace di svolgere la stessa funzione di Sdh4p: infatti il gene *YLR164w* in multicopia è in grado di ristabilire, anche se non completamente, l'attività della succinato deidrogenasi nel mutante Δ *sdh4* (circa 50% rispetto all'attività del ceppo wild-type). Quando la

proteina è però espressa in monocopia non è sufficiente per consentire la crescita del mutante nullo $\Delta sdb4$ in presenza di substrati non fermentabili. La proteina Ylr164p potrebbe essere responsabile di quella minima crescita ossidativa del ceppo $\Delta sdb4$ in terreno massimo con fonti di carbonio respirabili. Su questa base, nell'ipotesi che la presenza del gene *YLR164w*, seppur in monocopia nel ceppo $\Delta sdb4$ potesse influenzare il fenotipo OXPHOS degli alleli mutati studiati e quindi non permettere di vedere fenotipi di poco compromessi rispetto al selvatico, si è deciso di costruire il doppio mutante $\Delta sdb4/\Delta ylr164w$ da poter utilizzare per l'analisi funzionale di queste varianti del gene SDH4 (la costruzione del doppio mutante è descritta nella sezione Materiali e Metodi). Quindi con i plasmidi contenenti gli alleli mutati del gene SDH4 yG12S, y H55R, yP84L, yP58L, yT118I, yG112D e yY120C è stato trasformato il doppio mutante $\Delta sdb4/\Delta ylr164w$ ed è stato studiato il loro fenotipo di crescita, in terreno minimo selettivo addizionato di etanolo 2% e glicerolo 2% come fonti di carbonio. Anche in questo caso è stato necessario verificare che le varianti umanizzate Y55H, T84P e E112G, permettano la crescita in terreno minimo addizionato di fonti di carbonio respirabili, del doppio mutante $\Delta sdb4/\Delta ylr164w$ (dati non mostrati).

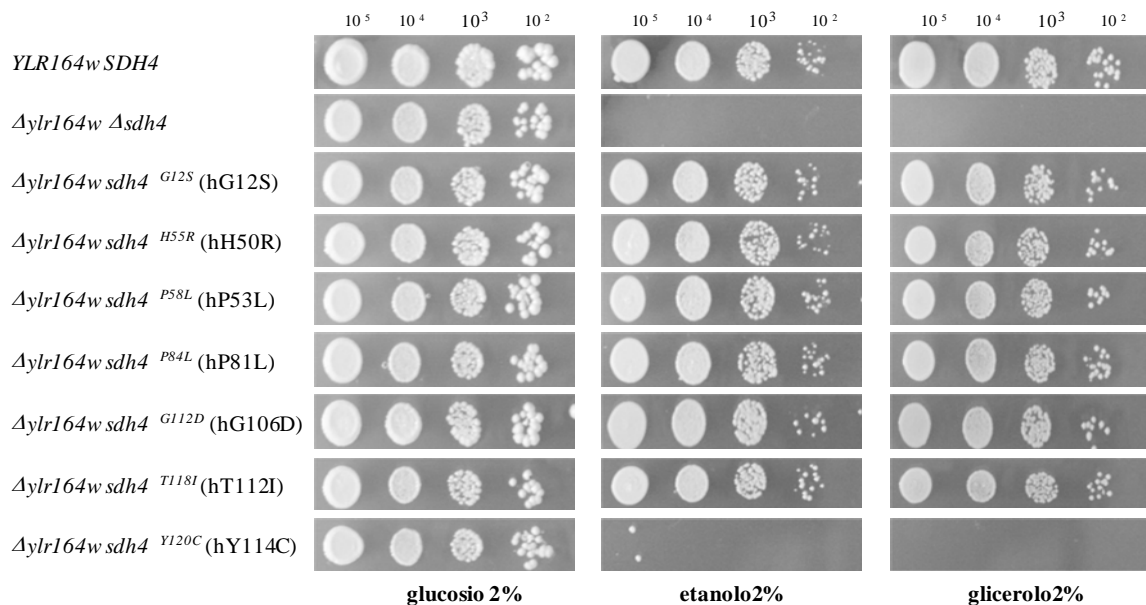


Fig. 5.17: Analisi del fenotipo di crescita degli alleli mutati del gene *SDH4* nel doppio mutante $\Delta sdb4/\Delta ylr164w$ dopo 5 giorni di crescita a 28°C in terreno YNB+DO-URA

Il fenotipo OXPHOS degli alleli mutati non è significativamente differente da quello osservato in precedenza dalla trasformazione del singolo mutante $\Delta sdb4$: soltanto il ceppo trasformato con l'allele Y120C conferma la sua incapacità di crescita su fonti di carbonio ossidabili (Fig. 5.17). L'insieme dei risultati ottenuti dimostra che il fenotipo OXPHOS degli alleli mutati non è

supportato dalla presenza del gene *YLR164w* ma è dovuto alla qualità dell'allele stesso, indicando quindi che questi mutanti non sono patologici in lievito.

5.2.4 SENSIBILITÀ ALLO STRESS OSSIDATIVO

In tutti i ceppi recanti gli alleli mutati *sdh3* o *sdh4* è stato valutato un eventuale aumento di ROS intracellulare, analizzandone la sensibilità al menadione. E' stata effettuata un'analisi spot assay valutando la capacità dei singoli mutanti di crescere a 28°C in presenza di menadione alla concentrazione di 30 µM con glucosio al 2% come fonte di carbonio. Come illustrato in figura 5.18 a e b, nessuna delle mutazioni analizzate, compresa quella che causava una grave compromissione della crescita ossidativa Y1114 e un abbattimento dell'attività ubiquinone reductasi, causano una ipersensibilità al menadione o aumentano la produzione di ROS (dati non mostrati).

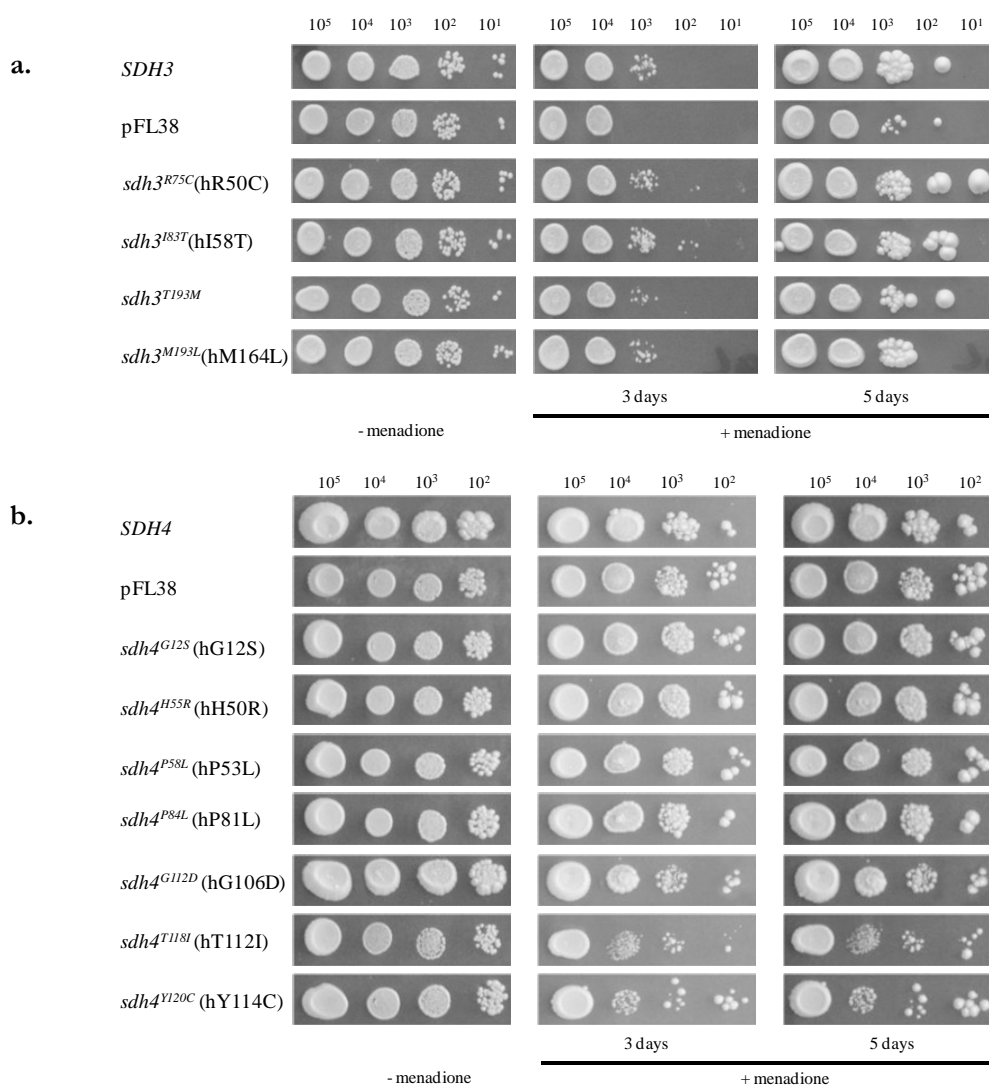
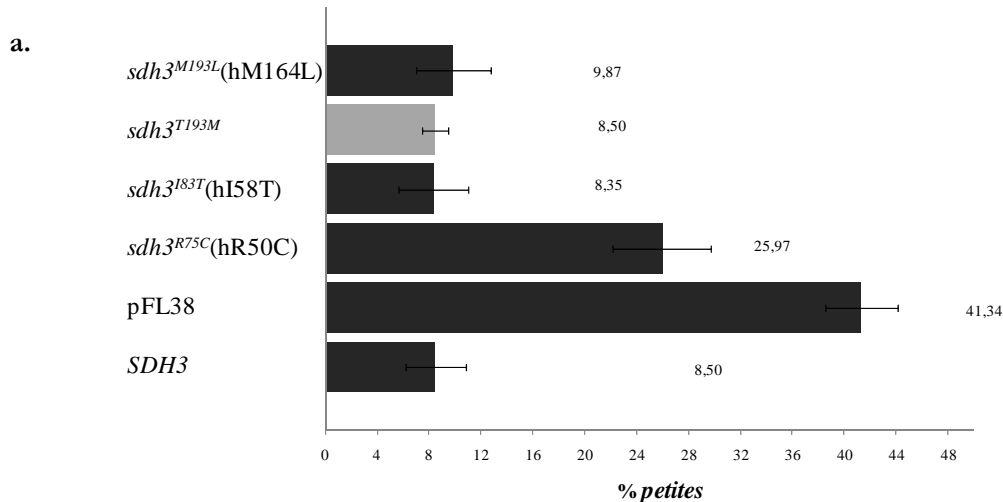


Fig. 5.18: Sensibilità al menadione dei mutanti *sdh3* e *sdh4*. Sono state seminate diluizioni seriali (10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ cellule) di colture in fase esponenziale, su piastre di terreno minimo (YNB+DO) addizionate con glucosio al 2% e menadione 30µM. La crescita è stata osservata dopo 3 e 5 giorni di incubazione alla temperatura di 28°C.

5.2.5 STABILITÀ DEL DNA MITOCONDRIALE

Per valutare se alcune mutazioni in *sdh3* e *sdh4* potessero compromettere la stabilità del mtDNA è stata misurata la frequenza di mutanti *petite*.

Per quanto riguarda le mutazioni nel gene *SDH3* il solo mutante *sdh3^{R75C}* mostra un aumento della frequenza di *petite* di circa tre volte rispetto a quella del ceppo selvatico, a differenza degli altri mutanti per i quali la frequenza di *petite* non è significativamente diversa da quella del ceppo selvatico (Fig. 5.19a).



Per quanto riguarda i mutanti nel gene *SDH4* le mutazioni *yY120C* e *yT118I* hanno una frequenza di mutanti *petite* di circa tre volte maggiore rispetto a quella del ceppo selvatico (Fig. 5.19b).

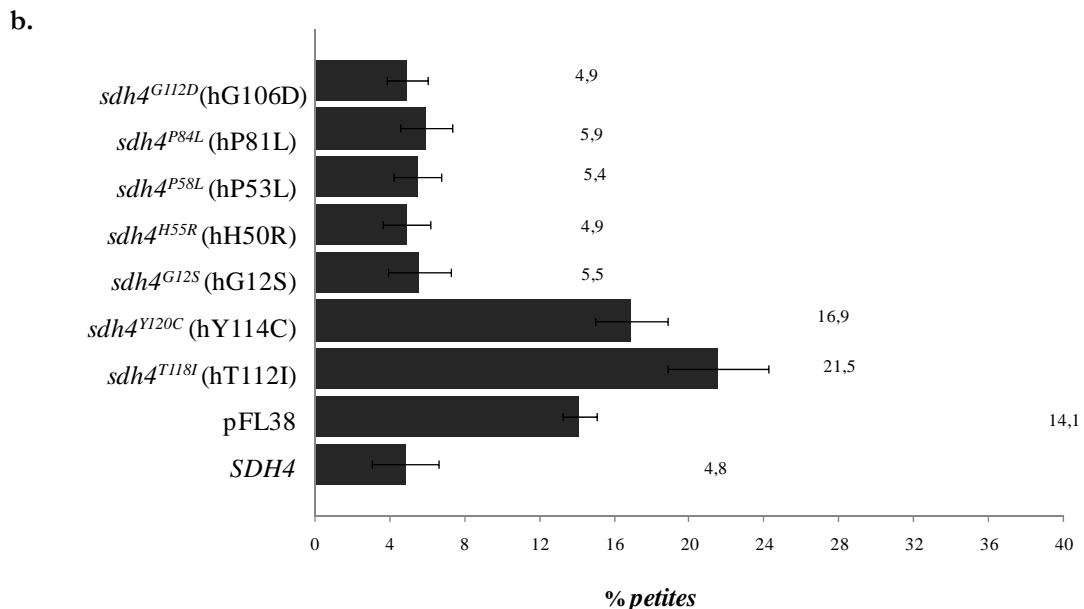


Fig. 5.19: Determinazione della frequenza di mutanti *petite* dei mutanti *sdh3* e *sdh4*. Per ogni ceppo è riportata la percentuale di colonie *petite* dopo 15 generazioni a 37°C in terreno minimo (YNB+DO) addizionato di glucosio 0,2% e etanolo 2%. Per ogni ceppo sono stati condotti cinque esperimenti indipendenti.

5.2.6 DISCUSSIONE

Lo studio in lievito degli effetti delle mutazioni umane nei due geni che codificano per le sub-unità che formano il dimero di membrana della succinato deidrogenasi si è rivelato complicato a causa della bassa identità di sequenza tra le proteine umane e quelle di lievito.

Per quanto riguarda le mutazioni nel gene *SDHC*, solo la R75C (hR50C), ma non la hI58T (yI83T) e la hM164L (yM193L), sembra avere un fenotipo in lievito. Infatti mostra una significativa riduzione dell'attività SDH sufficiente comunque per sostenere la crescita su fonti di carbonio non fermentabili; questa mutazione causa inoltre un aumento della frequenza di mutanti *petite*, senza un significativo aumento dello stress ossidativo. Se l'assenza di fenotipo, o la presenza di solo alcuni fenotipi come un parziale abbattimento dell'attività enzimatica e un aumento della mutabilità mitocondriale, di alcune delle studiate in lievito rifletta la loro neutralità anche nell'uomo, siano quindi polimorfismi non funzionali, o se dipenda dal basso livello di conservazione dei domini proteici o del residuo stesso rimane da stabilire.

Le varianti alleliche del gene *SDHD* H55R (hH50R), P84L (hP81L) e G112D (hG106D), che interessano residui non conservati che ricadono in domini non conservati tra la proteina di lievito e quella umana, non hanno alcun effetto sulla crescita ossidativa né su altri fenotipi mitocondriali studiati. Anche le varianti alleliche G12S (hG12S) e P58L (hP53L) che, al contrario, interessano residui conservati tra le due proteine, non mostrano alcuna differenza rispetto al selvatico nei fenotipi studiati in lievito. Da lavori condotti sull'uomo (Gimenez- Roqueplo *et al.*, 2003; Mannelli *et al.*, 2006) sembra altamente probabile che le mutazioni G12S e H50R siano dei polimorfismi presenti nella popolazione, perché si sono ritrovati, con una frequenza statisticamente significativa, sia in pazienti affetti da feocromocitoma sia in individui sani di controllo. I risultati da noi ottenuti nel modello lievito confermano tale ipotesi.

La mutazione P81L è stata trovata associata a diversi casi di tumori di derivazione della cresta neurale, come tumori glomici, paragangliomi addominali e feocromocitoma, inoltre è stata trovata associata a sindrome PGL1 in diverse famiglie americane, per le quali si può parlare di effetto fondatore (Mannelli *et al.*, 2006; Baysal *et al.*, 2000). Il mutante equivalente, *ysdb4*^{P84L} non ha alcun fenotipo patologico in lievito. Dal momento che il significato patologico di questa mutazione era fuori questione, possiamo ipotizzare che l'assenza di fenotipo dipenda dal fatto che tale sostituzione coinvolge un residuo non conservato che si trova in un dominio non conservato tra le due proteine.

Anche la mutazione missenso G106D è stata trovata associata a tumore (Mannelli *et al.*, 2006). Tale residuo è altamente conservato suggerendo che rappresenti un aminoacido importante per la funzionalità della proteina. Peraltro, non lo è in lievito e questa potrebbe essere la causa del mancato effetto della mutazione sul fenotipo di questo organismo.

La variante allelica T118I (hT112I) è stata associata a un unico caso di feocromocitoma, quindi si potrebbe trattare di una mutazione a bassa penetranza oppure di un polimorfismo, da definire raro perché la mutazione non si è trovata nei soggetti di controllo (Simi *et al.*, 2005; Mannelli *et al.*, 2006). I risultati da noi ottenuti in lievito suggeriscono che tale mutazione possa essere responsabile dell'insorgenza di tumori in quanto, pur non avendo effetto sulla crescita ossidativa, la presenza di questo allele mutato riduce in modo significativo l'attività della succinato deidrogenasi e aumenta la mutabilità mitocondriale, non causando un aumento significativo dei ROS intracellulari.

La mutazione conservata yY120C (hY114C) determina nel lievito un grave difetto funzionale; l'incapacità di crescere su fonti ossidabili associata ad una ridotta attività succinato deidrogenasica PMS/DCPIP dipendente ma alla perdita completa dell'attività ubiquinone reduttasi (Silkin *et al.*, 2006). Questo risultato è coerente con il fatto che Y114C è una mutazione fondatrice che provoca suscettibilità al cancro negli esseri umani (Neumann *et al.*, 2004; Schiavi *et al.*, 2006). Inoltre, questa mutazione è associata ad un significativo aumento della mutabilità del DNA mitocondriale, senza peraltro alcun incremento della produzione di ROS.

I dati ottenuti e riportati in questo lavoro indicano che diverse mutazioni in tutti e tre i geni di suscettibilità *SDH* causano un aumento della mutabilità del mtDNA. Tuttavia l'aumento della mutabilità del mtDNA causata da mutazioni nel gene *SDH2* è stata osservata solo quando l'attività della succinato deidrogenasi era completamente abbattuta, mentre l'aumento della mutabilità mitocondriale causata da mutazioni *SDHD* o *SDHC* veniva osservata anche quando l'attività dell'enzima SDH era solo parzialmente ridotta. Inoltre, la mutabilità del mtDNA causata da mutazioni nel gene *SDHB* è sempre stata associata ad un aumento di ROS, mentre mutazioni nelle sub-unità di ancoraggio SdhCp e SdhDp che comunque provocano un aumento della mutabilità del mtDNA, non sembrano essere associate ad una maggior produzione di ROS.

L'effetto sull'instabilità del mtDNA indotto da mutazioni nelle sub-unità di ancoraggio potrebbe derivare da un'alterazione della membrana mitocondriale interna dove SdhC e SdhD sono inserite suggerendo per queste sub-unità un ruolo importante per preservare l'integrità della membrana mitocondriale, che potrebbe a sua volta, controllare il mantenimento e la stabilità del mtDNA.

Infine, un aspetto prima d'ora non preso in considerazione per quanto riguarda l'associazione causativa tra mutazioni *SDH* e le sindromi associate a paraganglioma e feocromocitoma, se l'aumento della mutabilità del mtDNA possa avere un ruolo nello sviluppo di PGL/PHEO nell'uomo merita a nostro avviso una particolare attenzione e prevede una sperimentazione mirata da svolgere nei tessuti tumorali SDH deficienti.

6. Risultati (IV parte)

EFFETTI DI MUTAZIONI PUNTIFORMI SULLA CONFORMAZIONE DELL'ENZIMA SUCCINATO DEIDROGENASI DI LIEVITO*

*I risultati discussi in questa sezione sono stati oggetto di una collaborazione con la Prof.ssa Eugenia Polverini del Dipartimento di Fisica dell'Università degli studi di Parma. Le immagini sono state realizzate e sono oggetto della di tesi triennale in Biotecnologie di Ilaria Menozzi.

Alcune varianti alleliche con fenotipo grave, in lievito, della sub-unità Sdh2 sono state localizzate nella struttura della proteina per cercare di capire quali modificazioni potessero comportare la perdita di funzione dell'enzima. Nella banca dati PDB è depositato il modello della struttura della succinato deidrogenasi di lievito (Oyedotun K. et al., 2004) ottenuta per omologia di sequenza con quella di *E. coli*, che è stata cristallizzata (Yankovskaya 2003) (Fig.6.1).



Fig.6.1: Modello della struttura della succinato deidrogenasi di lievito da Oyedotun K e Lemire BD 2004. In giallo Sdh1, in verde Sdh2, in rosso Sdh3 e in blu Sdh4

Le mutazioni che coinvolgono i residui di cisteina, implicati nella coordinazione dei centri ferro-zolfo, sono particolarmente deleterie, sia per l'ingombro sterico non compatibile con la struttura proteica, sia per le diverse proprietà geometriche e fisiche diverse non adatte all'interazione con i centri ferro zolfo o con altri residui coinvolti nella stabilizzazione degli stessi. Nella succinato deidrogenasi compaiono tre centri ferro-zolfo che sono responsabili del trasporto degli elettroni, mediandone il trasferimento dalla flavina al coenzima Q. Nell'enzima sono presenti tre tipi differenti di cluster: $[2\text{Fe}:2\text{S}]$, $[4\text{Fe}:4\text{S}]$ e $[3\text{Fe}:4\text{S}]$. E' possibile notare (Fig.6.2) come i centri ferro zolfo vengano mantenuti in posizione all'interno della proteina da legami di coordinazione con 4 cisteine.

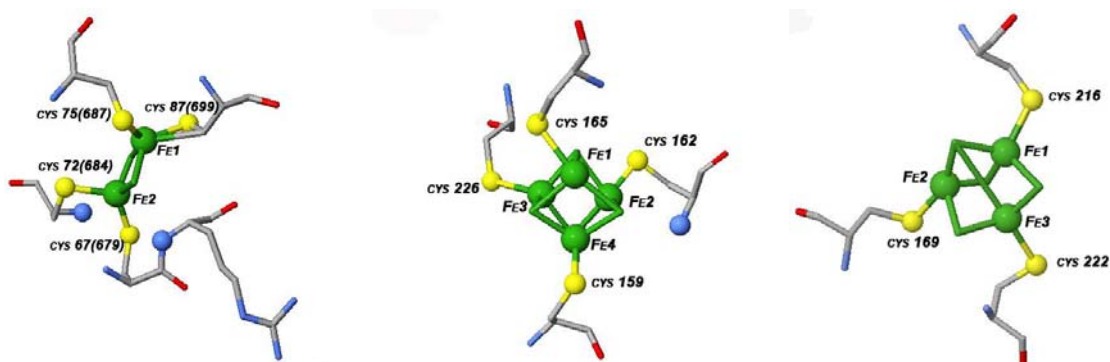


Fig.6.2: Centri ferro-zolfo, da sinistra verso destra $[2\text{Fe}:2\text{S}]$ $[4\text{Fe}:4\text{S}]$ $[3\text{Fe}:4\text{S}]$

Come già riportato la cisteina, in posizione 184, sostituita con una tirosina, prima mutazione studiata in lievito, è necessaria per la stabilità del centro ferro-zolfo, $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ (Fig.6.3). La tirosina

che sostituisce la cisteina causa un ingombro sterico non compatibile con la forma della proteina e le sue proprietà chimico fisiche non permettono le interazioni con gli altri cluster Fe-S o con i residui coinvolti nella stabilizzazione del centro.

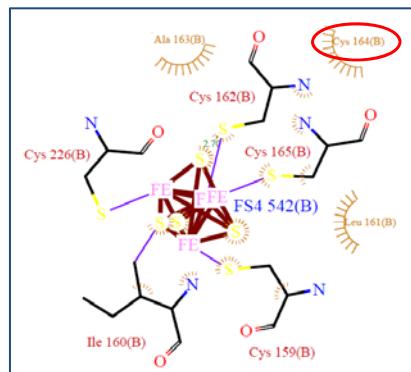


Fig.6.3: Centro ferro-zolfo [4Fe:4S] e cerchiata in rosso Cys184(Cys164)

Tra le mutazioni studiate che in lievito comportano l'abolizione dell'attività succinato deidrogenasi, altre due C95Y e la C189W coinvolgono residui di cisteina. Queste due mutazioni sono state facilmente localizzate nella struttura della proteina, la mutazione yC95Y coinvolge uno dei residui di cisteina che coordina il centro ferro-zolfo[2Fe:2S], mentre la yC189W coinvolge uno dei residui del centro [3Fe:4S] (Fig. 6.4a e b). Si può ipotizzare che la mancanza di funzionalità dell'enzima nei mutanti che portano queste due varianti alleliche sia causata da un mancato funzionamento dei centri ferro-zolfo.

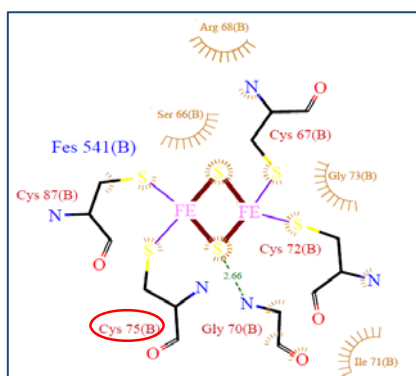


Fig.6.4a: Centro ferro-zolfo [2Fe:2S] e cerchiata in rosso Cys95(Cys75)

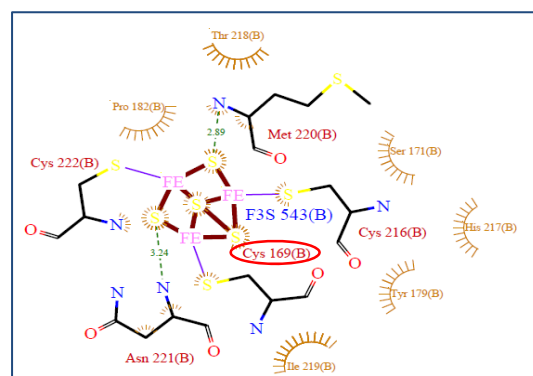


Fig.6.4b: Centro ferro-zolfo [3Fe:4S] e cerchiata in rosso Cys189(Cys169)

Per cercare di predire gli effetti delle mutazioni della succinato deidrogenasi sulla conformazione nativa dell'enzima in relazione al suo funzionamento in collaborazione con la Prof.ssa Eugenia Polverini, del Dipartimento di Fisica dell'Università di Parma, è stato intrapreso uno studio bioinformatico delle mutazioni trovate nella sub-unità SdhB. Tra le mutazioni missenso trovate nel gene *SDHB*, la sostituzione R46L è particolarmente interessante perché nonostante il residuo di arginina occupi una zona periferica della proteina, quindi la sua sostituzione non dovrebbe indurre effetti gravi nella proteina, il cambiamento con una leucina è stata associata a paraganglioma nell'uomo e provoca una totale perdita della funzionalità dell'enzima in lievito (la mutazione *sdh2^{R40L}* ha fenotipo grave in lievito). Al fine di individuare i cambiamenti conformazionali significativi sulla molecola mutata e di metterli in relazione con la sua funzione, è stato deciso di simulare la dinamica molecolare dell'enzima, dopo aver mutato *in silico* il residuo di arginina 20 in leucina, nella sub-unità Sdh2p (la numerazione esclude la presenza dei 20 aminoacidi del peptide segnale). Contemporaneamente è stata condotta una simulazione di controllo sulla sub-unità Sdh2p wild type. Come già sottolineato l'amminoacido mutato si trova in una regione periferica non facente parte del *core* proteico e lontano dai centri Fe-S possa avere un effetto così deleterio. Anche in questo caso, per lo studio computazionale è stata usata, come struttura di partenza, il modello della succinato deidrogenasi di lievito depositata nella banca data PDB (codice identificativo 1PB4), ottenuta con una modellizzazione comparativa, principalmente sulla stessa proteina di *E. coli*. (Yankovskaya et al., 2003; Oyedotun K. et al., 2004).

In figura 6.5 è mostrata la struttura dell'intera proteina e in arancione è evidenziato il residuo di arginina che è stato mutato, inoltre in giallo sono evidenziati i ligandi. La figura evidenzia alcune caratteristiche relative all'intorno proteico che comprende la mutazione. È possibile notare che la mutazione è posizionata in una porzione esterna della sub-unità Sdh2, e che nelle sue vicinanze non compaiono siti attivi o ligandi; questo è il motivo per il quale stupisce che una mutazione in un sito simile porti alla completa inattivazione dell'enzima.

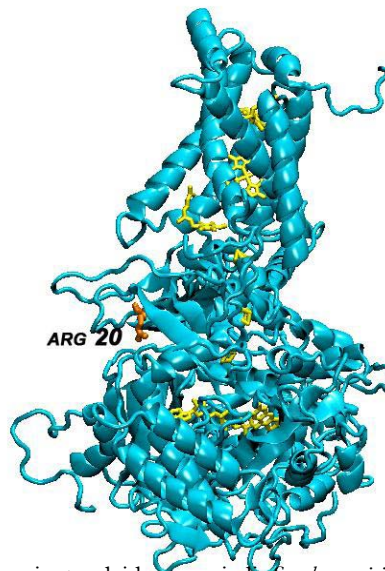


Fig.6.5: Modello della succinato deidrogenasi di *Saccharomyces cerevisiae* in azzurro, in 112
arancione l'arginina e in giallo compaiono i ligandi.

La sostituzione del residuo di arginina in posizione 20, in Sdh2p, con una leucina comporta il cambiamento di un aminoacido con una carica positiva, con uno non polare di dimensioni ridotte rispetto all'arginina. Le simulazioni di dinamica molecolare sono particolarmente utili perché, essendo in grado di investigare a livello atomico le interazioni tra i residui, possono fornire importanti informazioni su ciò che avviene e le conseguenze che la mutazione ha sulla funzione biologica dell'enzima.

Sono risultate notevolmente significative, per capire le possibili cause della perdita di funzione dell'enzima mutato, le analisi dei movimenti rispetto alla struttura iniziale. Si assiste, in particolare, ad uno slittamento, non una deformazione o un *unfolding*, dell'alfa elica costituita dai residui dal 45 al 57. Nella figura 6.6a si può osservare lo slittamento dell'alfa elica nella proteina mutata, dove le dimensioni inferiori e le caratteristiche chimiche differenti della leucina, provocano la perdita di molte interazioni con i residui dell'alfa elica che per questo risulta maggiormente inclinata verso il basso, rispetto alla sua posizione nella proteina wild-type (Fig. 6.9b)

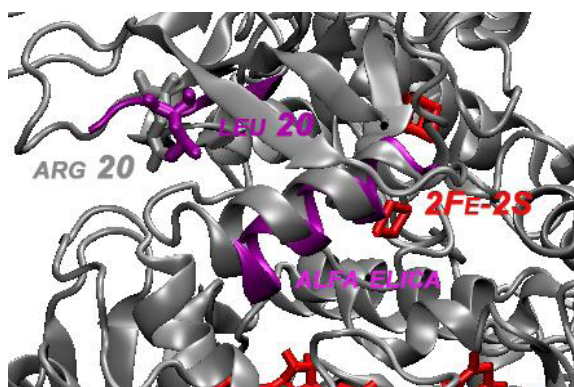


Fig. 6.6a: In viola l'alfa elica e la leucina della struttura mutata. Mentre in grigio la struttura iniziale.

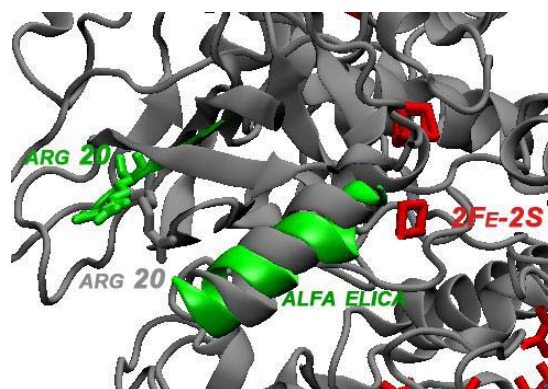


Fig. 6.6b: In verde l'alfa elica e l'arginina della struttura wild type dopo la simulazione. Mentre in grigio la struttura iniziale

L'osservazione, inoltre, dei movimenti di un'altra α -elica, l'elica 3_{10} dà la possibilità di formulare un'ipotesi sulla perdita di funzionalità dell'enzima. Lo spostamento dell'elica è importante perché questa si trova a ridosso del centro ferro-zolfo 2Fe-2S, che è coordinato da 4 cisteine, una delle quali, la Cys87, fa parte dell'elica stessa. Dall'osservazione della struttura della proteina mutata si

nota che l'elica 3_{10} risulta completamente *unfolded* e questo porta a un allontanamento della Cys87 dalla sua posizione iniziale, quindi dal centro ferro zolfo (Fig 6.10). Nella proteina wild type non avviene un movimento simile e la cisteina rimane quasi nella stessa posizione.

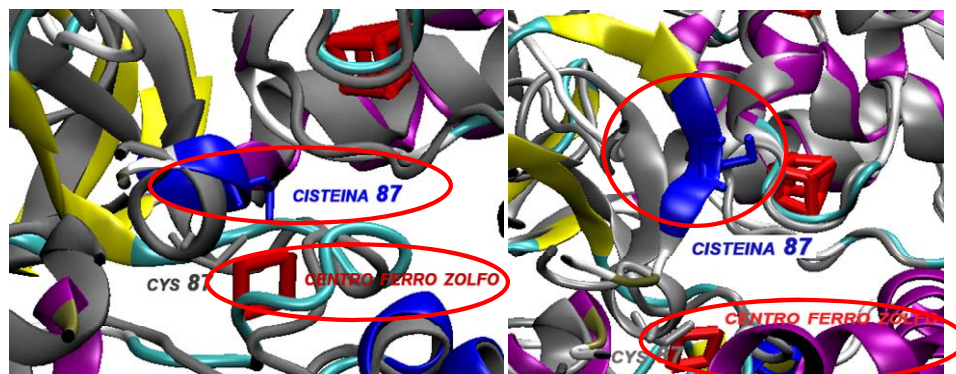


Fig. 6.10: L'immagine di sinistra rappresenta la proteina wild-type, cerchiata in rosso il residuo di Cys87 e il centro 2Fe-2S. L'immagine di destra si vede la proteina mutata e lo spostamento della Cys87.

Analizzando le interazioni non covalenti tra l'amminoacido mutato e gli atomi dei residui che lo circondano, per chiarire ciò che può provocare le variazioni conformazionali nella proteina mutata, si è notato che nella proteina wild-type si forma un ponte salino tra Arg20 e Asp58 (Fig. 6.11a), mentre nella proteina mutata si notano interazioni differenti, (Fig. 6.11b), dovute alla perdita della carica ed alla maggior idrofobicità del residuo. La perdita delle interazione con l'acido aspartico in posizione 58 potrebbe essere la causa principale delle modificazioni strutturali della proteina mutata.

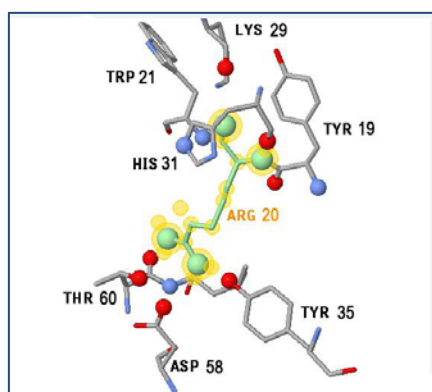


Fig. 6.11a: Interazioni tra la Arg20 e gli aminoacidi circostanti nella proteina wild type. Si nota il ponte salino con Asp58

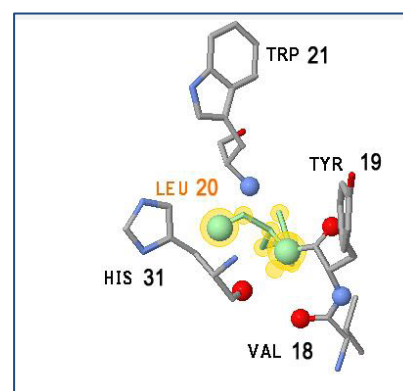


Fig. 6.11b: Interazioni tra la Leu20 e gli aminoacidi circostanti nella proteina mutata. Non si forma il ponte salino con Asp58

L'analisi dei contatti infatti mostra come la Cys87 nella proteina wild type rimanga pressochè in posizione, mentre la stessa cisteina nella proteina mutata si sposti in modo significativo da non poter più coordinare il ferro del centro Fe-S. Questo è probabilmente il motivo principale della perdita di funzionalità della proteina.

Bibliografia

- Ackrell Brian A.C. (2000)** “Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II” *FEBS Letters*. **466**: 1-5.
- Arias-Stella J. (1969)** “The carotid body at high altitudes” Meeting Am Assoc Pathol and Bact
- Astuti D., Latif F., Dallol A., Dahia LM., Douglas F., George E., et al.(2001)** “Gene Mutations in the Succinate Dehydrogenase Subunit SDHB Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and to Familial Paraganglioma” *Am. J. Huma. Genet.* **69**:49-54.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G.,Smith J.A. and Struhl, K. (1994)** “*Saccharomyces cerevisiae*” In Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Section 13. Wiley, New York.
- Bafunno V., Giancaspero TA., Brizio C., Bufano D., Passarella S., Boles E. and Barile M. (2004)** “Riboflavin Uptake and FAD Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria” *The journal of biological chemistry* **279**:96-102.
- 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**: 97-107.
- Baruffini E, Horvath R, Dallabona C, Czermin B, Lamantea E, Bindoff L, Invernizzi F, Ferrero I, Zeviani M, Lodi T (2011)** “Predicting the contribution of novel POLG mutations to human disease through analysis in yeast model”*Mitochondrion* **11**:182-190
- Basset D. E.; M.S. Boguski; P. Hieter. (1996.)** “Yeast genes and human diseases.” *Nature*, **379**: 589-90
- Bayley JP, Devilee P, Taschner PE (2005)** “The SDH mutation database: an online resource for succinate dehydrogenase sequence variants involved in pheochromocytoma, paraganglioma and mitochondrial complex II deficiency” *BMC Medical Genetics* **3**:39
- Bayley JP, van Minderhout I, Weiss MM, Jansen JC, Oomen PH, Menko FH, Pasini B, Ferrando B, Wong N, Alpert LC, Williams R, Blair E, Devilee P, Taschner PE (2006)** “Mutation analysis of SDHB and SDHC: novel germline mutations in sporadic head and neck paraganglioma and familial paraganglioma and/or pheochromocytoma” *BMC Medical Genetics* **7**:1
- Bayley J.P., Kunst H.P., et al. (2010)** “SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and phaeochromocytoma”. *Lancet Oncol.*
- Baysal B.E., Ferrell R.E. et al.(2000)** “Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene in hereditary paraganglioma” *Science* **287**:848-851.
- Baysal B.E., Willett-Brozick J.E., et al. (2002a)** “Prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD germline mutations in clinic patients with head and neck paragangliomas” *J.Med. Genet.* **39**:178-183.
- Baysal B.E.(2002b)** “Hereditary paraganglioma targets diverse paraganglia” *J Med Genet* **39**:617-622
- Baysal B.E (2004a)** “Genomic imprinting and environment in hereditary paraganglioma” *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **129C**:85–90.

- Baysal B.E. (2004b)** “Genomic Imprinting and Environment in Hereditary Paraganglioma” *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)* **129C**:85-90
- Benn D.E., Croxson M.S., Tucker K., Bambach C.P., Richardson A.L., Delbridge L., Pullan P.T., Hammond J., Marsh D.J., Robinson B.G. (2003)** “Novel succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) mutations in familial pheochromocytomas and paragangliomas, but an absence of somatic SDHB mutations in sporadic pheochromocytomas” *Oncogene* **22**:1358-1364.
- Benn DE, Gimenez-Roqueplo AP, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K, Croxson M, Dahia PL, Elston M, Gimm O, Henley D, Herman P, Murday V, Niccoli-Sire P, Pasiaka JL, Rohmer V, Tucker K, Jeunemaitre X, Marsh DJ, Plouin PF, Robinson BG (2006)** “Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes” *J. Clin. Endocrinol Metab.* **91**:827-36.
- Benn DE., Richardson AL., Marsh DJ. and Robinson BG. (2006)** “Genetic Testing in Pheochromocytoma and paraganglioma associated syndromes” *Ann. NY Acad Sci* **1073**:104-111
- 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**:198-219.
- Blandin G., P. Durrens, F. Tekaiia, 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**:31-6.
- Blattner FR., Plunkett 3rd G., Bloch CA., Perna T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner JD., Rode C K., Mayhew G F., et al. (1997)** “The Complete Genome Sequence of *Escherichia Coli* K-12” *Science* **277**:1453-62.
- Boedeker CC., Neumann HPH., Offergeld C., Maier W., Falcioni M., Berlis A., Schipper J. (2009)** “Clinical feature of paraganglioma syndromes” *Skull base* **19**:17-25.
- Bogenhagen D. F., Wang Y., Shen E. L. and Kobayashi R. (2003).** ”Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes.” *Mol Cell Proteomics.* **2**: 1205-1216.
- Bonneaud N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G.Y., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L. and Lacroute, F. (1991)** “A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors” *Yeast* **7**:609–615.
- Botstein D. (1991)** “Why yeast?” *Hosp. Pract.* **26**: 157-161.
- Bourgeron T., Rustin P. et al. (1995)** “Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency”. *Nat. Genet.* **11**:144–149.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. (1998)** “Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications” *Yeast.* **14**:115-32.

- Bradford M.M. (1976)** “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding” *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Braliou GG., Venieris E., Kalousi A., Simos G. (2006)** “Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple *in vivo* system to identify and characterize HIF-1 α effectors” *Biochemical and Biophysical Research Communications* **346**:1289-1296
- Brière JJ., Favier J., El Ghouzzi V., Djouadi F., Bénit P., Gimenez AP., Rustin P. (2005)** “succinate dehydrogenase deficiency in human” *Cellular and molecular life sciences* **62**:2317-2324.
- Burnichon N, Brière JJ, Libé R et al. (2010)** “SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma” *Hum Mol Genet* **19**: 3011–3020.
- Calvo, S., M. Jain, X. Xie, S. A. Sheth, B. Chang, O. A. Goldberger, A. Spinazzola, M. Zeviani, S. A. Carrand V. K. Mootha (2006)** “Systematic Identification of Human Mitochondrial Disease Genes through Integrative Genomics.” *Nat Genet*, **38**: 576-82.
- Calvo SE. and Mootha VK. (2010)** “The mitochondrial proteome and human disease” *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**:25–44
- Campbell I. and J. H. Duffus (1988)** “Yeast A Practical Approach.” *IRL Press, UK.*
- Castellano M., Mori L., Giacchè E., Agliozzo R., Tosini R., Panarotto A., Cappelli C., Mulatero P., Cumetti D., veglio F. and Agabiti-Rosei (2006)** “Genetic mutation screening in an italian color of nonsyndromic pheochromocytoma/paraganglioma patients” *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1073**:156-165.
- Cerecer-Gil N.Y., Figuera L.E., LlamasF.J., Lara M., Escamilla J.G., Ramos R., Estrada G., Hussain A.K., Gaal J., Korpershoek E., de Krijger R.R., Dinjens W.N.M., Devilee P., Bayley J.P.(2010)** “Mutation of SDHB is a Cause of Hypoxia-Related High-Altitude Paraganglioma” *Human Cancer Biolog* **16**:4148-4154
- Chandra D., Sigh K.K. (2010)** “Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer” *Bioenergetics* **10**:
- Chen XJ and Butow RA. (2005).** “The organization and inheritance of the mitochondrial genome.” *Nat Rev Genet.* **6**:815-25.
- Chen Y, Cairns R, Papandreou I, Koong A, Denko NC (2009)** “Oxygen consumption can regulate the growth of tumors a new perspective on the Warburg effect” *PLoS One* **4**: e7033.
- Chinnery P. F. (2003)** “Searching for Nuclear-Mitochondrial Genes” *Trends Genet* **19**:60-2.
- Ciriacy M. (1977)** “Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression” *Mol. Gen. Genet.* **154**: 213-220.
- Colby G., Y. Ishii and A. Tzagoloff (1998)** "Suppression of Sdh1 Mutations by the Sdh1b Gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**:1001-6.
- Collins F. S. (1995)** “Positional Cloning Moves from Perditional to Traditional.” *Nat Genet* **9**:347-50.
- 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**:281-315.

- Conway EM, Collen D, and Carmeliet P (2001)** “Molecular mechanisms of blood vessel growth” *Cardiovasc Res* **49**:507-521.
- Costanzo MC., Crawford ME., Hirschman JE., Kranz JE., Olsen P., Robertson L S., Skrzypek MS., Braun BR., Hopkins KL., Kondu P., et al. (2001)** “Ypd, Pombe and Worm: Model Organism Volumes of the BioKnowledge Library, an Integrated Resource for Protein Information.” *Nucleic Acids Res* **29**:75-9.
- Czarnecka A.M., Golik P., Bartnik E. (2006).**“Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia” *J Appl Genet*, **47**:67-78.
- Dang CV and Semenza GL (1999)** “Oncogenic alterations of metabolism” *Trends Biochem Sci* **24**:68-72.
- Dayan F., Roux D., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. and Mazure N.M. (2006)** “The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 α ” *Cancer Res.* **66**:3688-3698.
- De Lonlay, P., I. Valnot, A. Barrientos, M. Gorbatyuk, A. Tzagoloff, J.W. Taanman, E. Benayoun, D.Chretien, N. Kadhom, A. Lombes et al.(2001)** “Mutant Mitochondrial Respiratory Chain Assembly Protein Causes Complex III Deficiency in Patients with Tubulopathy, Encephalopathy and Liver Failure” *Nat Genet* **29**:57-60.
- Dibrov E., Fu S. and Lemire B. D. (1998)** “The *Saccharomyces cerevisiae* TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II)” *The journal of biological chemistry.* **273**: 32042-32048.
- DiMauro, S. and E. A. Schon (2003).**“Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases.” *N Engl J Med*, **348**: 2656-68.
- Dimmer K. S., Fritz S., Fuchs F., Messerschmitt M., Weinbach N., Neupert W. and Westermann B. (2002)** “Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*” *Molecular Biology of the Cell.* **13**: 847-853.
- Douwes Dekker P.B., Hogendoorn P.C., Kuipers-Dijkshoorn N., Prins F.A., Van Duinen S.G., Taschner P.E., Van der Mey A.G. and Cornelisse C.J. (2003)** “SDHD mutations in head and neck paragangliomas result in destabilization of complex II in the mitochondrial respiratory chain with loss of enzymatic activity and abnormal mitochondrial morphology” *J. Pathol.* **201**: 480-486.
- 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**:6127-45
- 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.*
- Elledge S.J. and Davis R.W. (1990)** “Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase” *Genes Dev.* **4**:740-751.

- Ephrussi B., H. Hottinguer and J. Tavlitzki. (1949)** “Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude genetique du mutant petite colonie” *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **76**:419-50.
- Erlic Z., Rybicki L., Peczkowska M., Golcher H., Kann MB., Mussig K., Schaffler NR., Schott M., Fassnacht M., Opocher G., Klose S., Fottner C., Forrer F., Plockinger U., Petersenn S., Zabolotny D., Kollukch O., Yaremchuk S., Januszewicz A., Walz MK., Eng C. and Neumann HPH. for the European-American Pheochromocytoma study Group (2009)** “Clinical predictor and algorithm for the genetic diagnosis of pheochromocytoma patients” *Clin. Cancer Res.* **15**:6378-6385.
- Ferrero I., Viola A.M. and Goffeau, A. (1981)** “Induction by glucose of an antimycin-insensitive, azide-sensitive respiration in the yeast *Kluyveromyces lactis*.” *Antonie Van Leeuwenhoek* **47**:11–24.
- Finsterer J (2008)** “Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults” *Pediatr Neurol.* **39**:223-35.
- Fontanesi F., Palmieri L., Scarcia P., Lodi T., Donnini C., Limongelli A., Tiranti V., Zeviani M., Ferrero I., Viola, A.M.(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**:923-34.
- Fontanesi F., Soto I.C. and Barrientos A. (2008).** “Cytochrome c Oxidase Biogenesis: New levels of Regulation.” *Life.* **60**:557-568
- Fontanesi F., F. Diaz and A. Barrientos (2009)** “Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using yeast models of OXPHOS deficiencies” *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Unit 19.5 63, 19.5.1–19.5.20.
- Foury F. (1997)** “Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast” *Gene* **195**: 1-10.
- Gambhir S.S. (2002).** “Molecular imaging of cancer with positron emission tomography”, *Nat Rev Cancer*, **2**: 683-693.
- Garrido N., Griparic L., Jokitalo E., Wartiovaara J., Van der Blik A. M. and Spelbrink J. N. (2003).** “Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids.” *Mol Biol Cell.* **14**: 1583-1596.
- Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, Lochmüller H, D'Adamo P, Gasparini P, Strom TM, Prokisch H, Invernizzi F, Ferrero I, Zeviani M. (2009)** “SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy” *Nat Genet.* **41**: 654-6.
- Gietz R.D. and Woods R.A. (2002)** “Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method” *Methods Enzymol.***350**: 87-96.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (2007)** Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.*, **2**:35-37.
- Gimenez-Roqueplo A.P., Favier J., Rustin P. (2001)** “The R22X mutation of the *SDHD* gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway.” *Am J Hum Genet* **69**: 1186–97.

- Gimenez-Roqueplo A.P., Favier J., Rustin P. (2002)** “Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma” *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 4771-4.
- Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rustin P., Rieubland C., Crespin M., Nau V., Van Kien PK., et al. for the COMETE Network (2003)** “Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant phaeochromocytomas” *Cancer Res* **63**: 5615–21
- Gimenez-Roqueplo AP., Favier J., Rustin P., Mourad JJ., Plouin PF., Corvol P. and Jeunemaitre X.(2001)** “The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complexII in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway” *Am. J. Hum. Genet* **69**:1186-1197.
- Goffeau A., Barrell BG., Bussey H., Davis R W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel JD., Jacq C.; Johnston M., (1996)** "Life with 6000 Genes." *Science*, 274: 546, 63-7.
- Goffrini P., Ercolino T., Panizza E., Giachè V., Cavone L., Chiarugi A., Dima V., Ferrero I. and Mannelli M. (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**, 1860-1868.
- Goldstein A. L. and J. H. McCusker. (1999)** "Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast* **15**:1541-53.
- Gottlieb E., Tomlinson I.P. (2005).** “Mitochondrial tumor suppressor: a genetic and biochemical update” *Nature review cancer* **5**:857-866
- Guo Jing and Lemire BD. (2003)** “The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide” *The journal of biological chemistry* **278**:47629-47636.
- 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.*
- Guzy RD., Sharma B., Bell E., Chandel NS. and Schumacker PT.(2008)** “Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis” *Molecular and cellular biology* **28**:718-731.
- Hagerhall C. (1997)** “Succinate:quinone oxidoreductase variations on a conserved theme” *Biochimica or biophysica Acta* **1320**:107-141
- Hao H.X., Khalimonchuk, O. (2009)** “SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma” *Science* **325**:1139–1142.
- Hagerhall C. and Hederstedt L. (1996)** “ A structural model for the membrane- integral domain of succinate: quinone oxidoreductase” *FEBS* **389**:25-31

- Hensen EF, Jordanova ES, van Minderhout IJ (2004)** “Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent-of-origin dependent inheritance in SDHD-linked paraganglioma and pheochromocytoma families” *Oncogene* **23**: 4076–83.
- Hensen EF. and Bayley JP. (2010)** “Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma” *Familial Cancer* DOI10.1007/s10689-010-9402-1
- Hensen EF., Bayley JP. (2010)** “Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma” *Familial cancer* DOI 10.1007/s 10689-010-9402-1.
- Hermann, G. J. and J. M. Shaw. (1998).** “Mitochondrial Dynamics in Yeast.” *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**: 265-303.
- Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, and Jones EY (2002)** “Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL” *Nature (Lond)* **417**: 975-978.
- Horvath R., Abicht A., et al. (2006)** “Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (Fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA)” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **77**:74-76.
- Hu C.J., Sataur A., Wang L., Chen H., Simon M.C. (2007)** “The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha” *Mol. Biol. Cell.* **18**:4528-4542.
- Huang L.E., Arany Z., Livingston D.M., Bunn H.F. (1996)** “Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit” *J. Biol. Chem.* **271**:32253-32259.
- Hughes TR., MJ. Marton, AR. Jones, CJ. Roberts, R. Stoughton, CD. Armour, H A. Bennett, E. Coffey, H. Dai, YD. He, et al. (2000)** “Functional Discovery Via a Compendium of Expression Profiles” *Cell* **102**:109-26.
- Ishii N., Fujii M., Hartman P.S., Tsuda M., Yasuda K., Senoo Matsuda N., Yanase S., Ayusawa D., Suzuki K.(1998)** “A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes” *Nature* **394**:694-697.
- Ishii N., Ishii T., Hartman PS (2006)** “The role of electron transport SDHC gene on lifespan and cancer” *Experimental Gerontology* **41**:952-956.
- Ishii N., Ishii T., Hartman PS (2007)** “The role of electron transport SDHC gene on lifespan and cancer” *Mitochondrion* **7**:24-28.
- Ishii T., Yasuda K., Akatsuka A., Hino O., Hartman P.S., Ishii N.(2005)** “A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress resulting in apoptosis and tumorigenesis” *Cancer Res.* **65**: 203-209.
- 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**:1143-7.

- Ivan M and Kaelin WG Jr (2001)** “The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein” *Curr Opin Genet Dev* **11**: 27-34.
- Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1998)** “Multiple sequence alignment with Clustal X” *Trends Biochem. Sci.* **23**: 403-405.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW (2002)** “Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation” *Cell* **111**:709-720.
- Johnston M. (2000)** “The Yeast Genome: On the Road to the Golden Age.” *Curr Opin Genet Dev*, **10**:617-23.
- Kaelin W.G., Jr. (2009).** “SDH5 mutations and familial paraganglioma: somewhere Warburg is Smiling” *Cancer Cell*, **16**: 180-182
- Kaiser C., Michaelis S. and Mitchell A. (1994)** “Methods in Yeast Genetics: a Laboratory Course Manual” *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, and Conaway JW (2000)** “Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex” *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10430-10435.
- Kaufman B. A., Newman S. M., Hallberg R. L., Slaughter C. A., Perlman P. S. and Butow R. A. (2000).** “In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins.” *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**: 7772-7777.
- Kerscher O., NB. Sepuri, RE. Jensen (2000)** " Tim18p Is a New Component of the Tim54p-Tim22p
- Kim In-C. and Beattie D.S. (1973)** “Formation of the Yeast Mitochondria1 Membrane 1. Effects of Inhibitors of Protein Synthesis on the Kinetics of Enzyme Appearance during Glucose Derepression” *Eur. J. Biochem.*,**36**:509-518.
- King A., Selak MA. And Gottlieb E (2006)** “Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer” *Oncogene* **25**:4675-4682.
- Kirches E. (2009)** “Mitochondrial and nuclear genes of mitochondrial components in cancer” *Current genomics* **10**:281-293
- Klöhn P.C. and Neumann H.G. (1997)** “Impairment of respiration and oxidative phosphorylation by redox cyclers 2-nitrosofluorene and menadione” *Chem. Biol. Interact.* **106**: 15-28.
- Klöhn P.C. and Neumann H.G. (1997)** “Impairment of respiration and oxidative phosphorylation by redox cyclers 2-nitrosofluorene and menadione” *Chem. Biol. Interact.* **106**:15-28.
- Knudson AG (1986)** “Genetics of human cancer” *Annu Rev Genet* **20**:231–251
- Koehler CM., MP. Murphy, NA Bally, D. Leuenberger, W. Oppliger, L. Dolfni, T. Junne, G. Schatz, E. Or (2000)** “Tim18p, a New Subunit of the TIM22 Complex That Mediates Insertion of Imported Proteins into the Yeast Mitochondrial Inner Membrane” *Molecular and cellular biology* **20**:1187-1193
- Kumar A. and M. Snyder. (2001)** “Emerging Technologies in Yeast Genomics” *Nat Rev Genet* **2**:302-12.

- 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**:483-91
- Lemire B. D. and Oyedotun K. S. (2002)** “The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase” *Biochimica et Biophysica Acta*. **1553**, 102-116.
- Lenaz G. and Genova ML. (2010)** “Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject” *Antioxid redox signal* **12**:961-1008
- Leonard, J. V. and A. H. Schapira (2000).** “Mitochondrial Respiratory Chain Disorders I: Mitochondrial DNA
- Loboda A., Jozkowicz A., and Dulak J. (2010)** “HIF-1 and HIF-2 transcription factors similar but not identical” *Molecules and Cells* DO/10.1007/s10059-010-0067-2
- Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S.J., Wolf D.H. and Fröhlich K.U. (1999)** “Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast” *J. Cell. Biol.*, **145**:757-767
- Manalo DJ, Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly BD., Ye SQ., Garcia JG., Semenza GL. (2005)** “Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1” *Blood* **105**: 659-669.
- Mannelli M, Simi L, Ercolino T et al.(2006)** “SDH mutations in patients affected by paraganglioma syndromes: a personal experience” *Ann N Y Acad Sci* **1073**: 183-189.
- Mannelli M, Ercolino T, Giache` V, Simi L, Cirami C, Parenti G. (2007)** “Genetic screening for pheochromocytoma: should SDHC gene analysis be included?” *J Med Genet* **44**: 586-7.
- Marchi E. and Cavalieri D. (2008)** “Yeast as a model to investigate the mitochondrial role in adaptation to dietary fat and calorie surplus” *Genes Nutr.* **3**:159–166.
- Mariman E.C., Van Beersum S.E. et al.(1993)** “Analysis of a second family with hereditary non-chromaffin paragangliomas locates the underlying gene at the proximal region of chromosome 11q” *Hum. Genet.* **91**:357-361.
- Mariman E.C., Van Beersum S.E. et al.(1995)** “Fine mapping of a putatively imprinted gene for familial non-chromaffin paragangliomas to chromosome 11q13.1: evidence for genetic heterogeneity” *Hum. Genet.* **95**:56-62.
- Martin T.P., Irving R.M.(2007)** “The genetics of paragangliomas: a review” *Clin. Otolaryngol.* **32**:7-11.
- 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**:1153-5.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001)** “Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation” *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **20**:5197-5206.
- Masson N and Ratcliffe PJ (2003)** “HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels” *J Cell Sci* **116**: 3041-3049.

- Maximo V., Sores P., Rocha A.S., Sobrinho-Simoes M. (1998).** “The common deletion of mitochondrial DNA is found in goiters and thyroid tumors with and without oxyphil cell change” *Ultrastruct Pathol*, **22**: 271-273.
- McKenzie, M., D. Liolitsa and M. G. Hanna (2003).** “Mitochondrial Disease: Mutations and Mechanisms.”
- Meeusen S., Tieu Q., Wong E., Weiss E., Schieltz D., Yates J. R. and Nunnari J. (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**, 291-304.
- Milosevic D., Lundquist P., Cradic K., Vidal-Folch N., Huynh T., Pacak K. and Grebe SKG. (2010)** “Development and validation of a comprehensive mutation and deletion detection assay for SDHB, SDHC and SDHD” *Clinical Biochemistry* **43**:700-704.
- Milunsky JM., Maher TA., Michels VV. And Milunsky A. (2001)**”Novel mutation and the emergence of a common mutation in the SDHD gene causing familial paraganglioma” *American Journal of Medical Genetics* **100**:311-314.
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr ,Pavletich NP (2002)**”Structure of an HIF-1alpha-pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling” *Science* (Wash DC) **296**: 1886-1889.
- Miyakawa I., Sando N., Kawano S., Nakamura S. and Kuroiwa T.(1987).** “Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.” *J Cell Sci*. **88**: 431-439.
- Modica**
- Napolitano J.S., Singh K.K. (2004).**“Mitochondrial dysfunction in cancer, Mitochondrion”**4**: 755-762.
- Modica-Napolitano J.S., Kulawiec M., Singh K.K(2007).** “Mitochondria and human cancer” *Curr Mol Med*, **7**: 121-131.
- Mounolou J.C., Jakob H.and Slonimski P.P. (1966)** “Mitochondrial DNA from yeast “petite” mutants: specific changes in buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**:218–224.
- 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**:404-26.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, and Poltorak Z (1999)** “Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors” *FASEB J* **13**:9-22.
- Neumann H.P.H. (2002)** “Imaging vs biochemical testing for pheochromocytoma” *JAMA* **288**:314-315
- Neumann H.P.H, Hoegerle S., Manz T., Brenner K., Illopoulos O. (2002)** “How many pathways to pheochromocytoma?” *Seminars in nephrology*, **22**: 89-99
- Neumann H.P.H., Pawlu C., et al. (2004)** “Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations” *JAMA* **292**:943–951.

- Neumann H.P.H., Erlic Z., Boedeker CC. et al (2009)** “Clinical Predictors for Germline Mutations in Head and Neck Paraganglioma Patients: Cost Reduction Strategy in Genetic diagnostic process as fall-out” *Cancer research* **69**:3650-3656.
- Neupert W. and Herrmann JM. (2007).** “Translocation of proteins into mitochondria.” *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 723-749.
- Niemann S., Muller U.(2000)** “Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3” *Nat. Genet.* **26**:268-270.
- Niemann S., Muller U., et al.(2003)** “Autosomal dominant malignant and catecholamine-producing paraganglioma caused by a splice donor site mutation in SDHC” *Hum. Genet.* **113**:92-94.
- Ochoa S. (1954).** “Enzymic mechanisms in the citric acid cycle.” *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* **15**: 183-270.
- Opocher G. and Schiavi F. (2010)** “Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma” *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism* **24**:943-956
- Oyedotun K. S. and Lemire B. D. (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**: 31382-8.
- Oyedotun K. S. and Lemire B. D. (2001)** “The Quinone-binding sites of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase” *J. Biol Chem.* **272**: 16936-43.
- Oyedotun K.S. and Lemire BD. (2004)** “The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase” *The journal of biological chemistry* **279**:9424-9431.
- Oyedotun KS and Lemire BD. (1999)** “The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase anchor subunit, Sdh4p: mutation at the C-terminal Lys-132 perturb the hydrophobic domain” *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**:170-179.
- Oyedotun KS., Sit CS., Lemire B. D. (2007)** “The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase does not require heme for ubiquinone reduction” *Biochimica et biophysica acta* **1767**: 1436-1445.
- 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**:3079-88.
- Parfait B., Chretien D., et al.(2000)** “Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome” *Hum. Genet.* **106** :236-243.
- Pasini B., Stratakis C.A. (2009)** “SDH mutations in tumorigenesis and inherited endocrine tumours: lesson from the pheochromocytoma–paraganglioma syndromes” *J. Intern. Med.* **266**:19-42.
- Peczowska M, Cascon A, Prejbisz A et al. (2008)** “Extra-adrenal and adrenal pheochromocytomas associated with a germline SDHC mutation” *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4**: 111–5.
- Perham R. N. (2000).** “Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions.” *Annu Rev Biochem.* **69**:961-1004.

- Pollard PJ., Brière JJ., Barwell J., Barclay E., Wortham NC., Mitchell M., Olpin S et al. (2005) "Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1a in tumor which result from germline FH and SDH mutations" *Human Molecular Genetics* **14**:2231-2239
- Qin Y., Li Yao, King EE, Buddavarapu K, LenciRE, Chocron ES, Lechleiter JD, Sass M, Aronin N, Schiavi F, Boaretto F, Opocher5 G, Toledo RA, Toledo SPA, Stiles C, AguiarRCT , Dahia PLM (2010) "Germline mutations in *TMEM127* confer susceptibility to pheochromocytoma" *Nature genetics* **42**:229-233
- Qingdong Ke and Max Costa (2006) "Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)" *Mol Pharmacol* **70**:1469-1480.
- Resnick MA, Cox BS (2000) "Yeast as an honorary mammal." *Mutat Res.* **451**:1-11.
- Ricketts C.J., Forman J.R.(2009) "Tumour risks and genotype–phenotype–proteotype analysis in 358 patients with germline mutations in *SDHB* and *SDHD*" *Hum. Mutation* **31**:41-51
- Rinaldi T, Dallabona C, Ferrero I, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M. (2010) "Mitochondrial diseases and the role of the yeast models" *FEMS Yeast Res.* 2010 Sep 13. doi: 10.1111/j.1567-1364.
- Robinson KM., Von Kieckebusch-Guck A. and Lemire BD. (1991) "Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant disrupted for the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit" *The journal of biological chemistry* **266**:21347-21350.
- Rothstein R.J. (1983) "One step gene disruption in yeast" *Methods Enzymol.* **101**: 202-211.
- Rustin P., Bourgeron T., et al.(1997) "Inborn errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human" *Biochim. Biophys. Acta* **1361**:185-197.
- Rustin P. and Rotig A. (2002) "Inborn errors of complex II Unusual human mitochondrial diseases" *Biochim. Biophys. Acta.* **1553**: 117-122.
- Rutter J. WingeDR., Schiffman JD. (2010) "Succinate dehydrogenase- assembly, regulation and role in human disease" *Mitochondrion* **10**:393-401
- Ryan MT. and Hoogenraad NJ. (2007). "Mitochondrial-nuclear communications." *Annu. Rev. Biochem.* **76**:701-722.
- Sambrook J. and Russel D.W. (2001) "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scheffler I. E. (1999). "Mitochondria." *Wiley-Liss*
- Scheffler I.E. (2000) "A century of mitochondrial research: achievements and perspectives" *Mitochondrion.* **1**: 3-31.
- Schiavi F., Boedeker C.C., Bausch B., Peczkowska M., Gomez C.F., Strassburg T., Pawlu C., Buchta M., Salzmann M., Hoffmann M.M. et al. (2005) "Predictors and prevalence of paraganglioma syndrome associated with mutations of the *SDHC* gene" *JAMA*, **294**:2057-2063.
- Schiavi F, Savvoukidis T, Trabalzini F, Grego F, Piazza M, Amistà P, Demattè S, Del Piano A, Cecchini ME, Erlic Z, De Lazzari P, Mantero F, Opocher G (2006) "Paraganglioma

- syndrome: SDHB, SDHC, and SDHD mutations in head and neck paragangliomas” *Ann. NY Acad Sci* **1073**:190-197.
- Schimke RN., Collins L. and Stolle CA. (2010)** “Paraganglioma, neuroblastoma and a SDHB mutation: resolution of a 30-year-old mystery” *American journal of medical genetics Part A* **152A**:1531-1535.
- Schon, E. A., E. Bonilla and S. DiMauro (1997).** “Mitochondrial DNA Mutations and Pathogenesis.” *J Bioenerg Biomembr*, **29**: 131-49.
- 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**:30751-9.
- Selak M.A. et al.(2005)** “Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase” *Cancer Cell*.**7**:77-85.
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991)** “Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene” *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5680-5684
- Semenza GL. and Wang GL. (1992)** “A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation” *Molecular and cellular biology* **12**:5447-5454
- Semenza, G.L., Jiang, B.H., and Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996).** “Hypoxia res-ponse elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydro- genase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1”. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529- 32537
- Sherman F., Fink G.R. and Hicks J.B. (1986)** “*Laboratory Course Manual For Methods in Yeast Genetics*” Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY
- 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**:13207-12.
- Silkin Y, Oyedotun KS, Lemire BD (2006)** “The role of Sdh4p Tyr-89 in ubiquinone reduction by the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase” *Biochim Biophys Acta* **1767**:143-50.
- Simi L., Sestini R., Ferruzzi P., Gaglianò M.S., Gensini F., Mascalchi M., Guerrini L., Pratesi C., Pinzani P., Nesi G. et al. (2005)** “Phenotype variability of neural crest-derived tumours in six Italian families segregating the same founder SDHD mutation Q109X” *J. Med. Genet.* **42**: e52.
- Singh K.K. and Costello L. C. (2009).**”Mitochondria and Cancer” *Springer*, New York, USA.
- Smith E.H., Janknecht R. and Maher J.III. (2007)** “Succinate inhibition of α -ketoglutarate-dependent enzymes in a yeast model of paraganglioma” *Hum. Mol. Genet.***16**: 3136-3148.
- Spinazzola A., Invernizzi F., Carrara F., Lamantea E., Donati A., Dirocco M., Giordano I., Meznaric-Petrusa M., Baruffini E., Ferrero I., Zeviani M. (2009)** “Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndrome” *J Inherit Metab Dis* **32** 143-158

- Srinivas V, Zhang LP, Zhu XH, Caro J (1999)** “Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins” *Biochem Biophys Res Commun* **260**: 557-56.
- Sun Fei, Xia Huo, Yujia Zhai, Aojin Wang, Jianxing Xu, Dan Su, Mark Bartlam, Zihe Rao (2005)** Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II *Cell* **121** :1043-1067.
- Szeto S.S.W., Reinke S.N., Sykes B.D. and Lemire B.D. (2007)** “Ubiquinone-binding site mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase generate superoxide and lead to the accumulation of succinate” *J. Biol. Chem.* **282**, 27518-27526.
- Szeto SSW., Reinke SN., sykes BD., Lemire BD (2010)** “Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate Dehydrogenase Result in Distinct Metabolic Phenotypes Revealed Through 1H NMR-Based Metabolic Footprinting” *Journal of proteome* 10.1021/pr100880y
- Takekoshi K., Isobe K., Suzuki H., Nissato S., Kawakami Y., Kawakami K. and Yamada N. (2008)** “R46Q mutation in the succinate dehydrogenase B gene (*SDHB*) in a Japanese family with both abdominal and thoracic paraganglioma following metastasis” *Endocrine journal* **55**:299-303.
- Tatusova T.A. and Madden T.L. (1999)** “BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences” *FEMS Microbiol. Lett.*, **177**:187-188.
- Thomas B.J. and Rothstein R. (1989)** “Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA” *Cell*. **56**:619–630.
- Timmers H.J., Gimenez-Roqueplo A.P., et al.(2009)** “Clinical aspects of SDHx-related pheochromocytoma and paraganglioma” *Endocr. Relat. Cancer* **16**:391-400
- Tomlinson IP , Multiple Leiomyoma Consortium et al. (2002)** “Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer.” *Nat Genet.* Apr;**30**:406-10
- Tomitsuka E, Kita K, Esumi H (2009)** “Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit” *Proc.Jpn.Acad.* **85**:258-265. Translocon in the Mitochondrial Inner Membrane” *Mol. Biol. Cell* **11**:103-116.
- Tzagoloff A. and Dieckmann CL. (1990)** “PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*” *Micorbiol Rev.* **54**(3): 211-25.
- Uetz P. and R. E. Hughes (2000)** “Systematic and Large-Scale Two-Hybrid Screens” *Curr Opin Microbiol* **3**:303-8.
- 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**:1245-9.
- Van Baars F., Cremers C., et al.(1982)** “Genetic aspects of nonchromaffin paraganglioma” *Hum. Genet.* **60**:305–309.

- Van Coster R., Seneca S., et al.(2003)** “Homozygous Gly555Glu mutation in the nuclear-encoded 70 kDa flavoprotein gene causes instability of the respiratory chain complex II” *Am. J. Med. Genet.* **120A**:13-18.
- Van der Mey A.G., Maaswinkel-Mooy P.D., Cornelisse C.J.,Schmidt P.H., Van de Kamp J.J. (1989)** “Genomic imprinting in hereditary glomus tumours: evidence for new genetic theory” *Lancet* **2**: 1291.
- Van Uden N. (1984)** “Temperature profiles of yeasts” *Adv Microb Physiol.* **25**:195-251.
- Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. (2009).** “Understanding the Warburg effect:the metabolic requirements of cell proliferation” *Science*, **324**: 1029-1033.
- Venter JC., Adams MD., Myers EW., Li PW., Mural RJ., Sutton GG.; Smith HO., Yandell M., Evans CA.; Holt RA., et al. 2001** “The Sequence of the Human Genome” *Science* **291**:1304-51.
- Wach A., Brachat A., Pohlmann R. and Philippsen, P. (1994)** “New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*” *Yeast* **10**:1793–1808.
- Wang GL., Jiang BH., Rue EA., Semenza GL. (1995)** “Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension” *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **92**: 5510-5514.
- Warburg (1956).**” On the origin of cancer cells”. *Science*, **123**: 309-314.
- Warren, G. and W. Wickner. (1996).** “Organelle Inheritance.” *Cell*, **84**:395-400.
- Wei Y.H. and Lee H.C. (2002)** “Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging” *Exp. Biol. Med.*, **227**:671-682.
- Wiesener MS., Jurgensen JS., Rosenberger C., Scholze C.K., Horstrup J.H., Warnecke C., Mandriota S., Bechmann I., Frei UA., Pugh CW.(2003)** “Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs” *FASEB J.* **17**:271-273.
- Winzeler 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**:901-6
- Yaffe M. P. (1999a).** “Dynamic Mitochondria.” *Nat Cell Biol*, **1**: E149-50.
- Yaffe M. P. (1999b).** “The Machinery of Mitochondrial Inheritance and Behavior.” *Science*, **283**:1493-7.
- Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., Friedman H., Friedman A., Reardon D., Herndon J., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B., Bigner D.D. (2009).** “IDH1 and IDH2 mutations in Gliomas” *N Engl J Med*, **360**: 765-773.
- Yankovskaya V., Horsefield R., Törnroth S., Luna-Chavez C., Miyoshi H., Léger C., Byrne B., Cecchini G. and Iwata S. (2003)** “Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation” *Science* **299**: 671-682.
- Zeviani M., and Carelli V. (2003).** “Mitochondrial Disorders.” *Curr Opin Neurol*, **16**: 585-94.
- Zeviani M. and Carelli V. (2007).** “Mitochondrial Disorders” *Curr. Opin. Neurol.* **20**: 564-71.

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* 293:2101-5.