

INDICE

	Pag.
ABBREVIAZIONI.....	5
ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	9
1.1 Sintesi del DNA mitocondriale e dei suoi precursori	9
1.2 Origine dei precursori del DNA mitocondriale	11
1.3 Scambi dinamici tra pool citosolici e mitocondriali rilevati con precursori radioattivi	12
1.4 Trasportatori mitocondriali per lo scambio di nucleotidi tra citoplasma e mitocondrio	15
1.5 Il trasportatore DNC o SLC25A19	17
1.6 Identificazione del trasportatore di nucleotidi pirimidinici Rim2p in lievito ed omologie con trasportatori proteici umani mitocondriali	18
1.7 Silenziamento mediante <i>RNA interference</i> dei geni <i>slc25a33</i> e <i>slc25a36</i>	20
SCOPO DELLA TESI.....	23
MATERIALI E METODI.....	25
2.1 Colture cellulari e condizioni di crescita	25
2.2 Congelamento e scongelamento delle colture cellulari	25
2.3 Preparazione di campioni cellulari per l'analisi al citofluorimetro	26

2.4 Trasfezione di cellule HeLa mediante coprecipitazione con calcio fosfato	26
2.5 Silenziamento stabile mediato da plasmidi esprimenti uno shRNA	27
2.5.1 Preparazione del DNA plasmidico	28
2.5.2 Curva di dosaggio della puromicina	29
2.5.3 Trasfezione di cellule HeLa TK1 ⁻ con diversi costrutti tramite Lipofectamine 2000	30
2.5.4 Diluizioni clonali di HeLa TK1 ⁻ trasfettate con i plasmidi OriGene	30
2.6 Silenziamento genico transiente di <i>slc25a33</i> per mezzo di siRNA.....	31
2.7 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e Real Time PCR	31
2.8 Estratti proteici totali.....	34
2.9 Quantificazione proteica in estratti proteici totali con il metodo colorimetrico di Bradford.....	34
2.10 Saggio dell'attività timidino chinasi (TK1).....	35

RISULTATI E DISCUSSIONE.....37

3.1 Analisi dell'espressione del trasportatore SLC25A33 in linee cellulari trasformate	38
3.2 Caratterizzazione delle linee cellulari HeLa ed HeLa TK1 ⁻	39
3.3 Silenziamento del gene <i>slc25a33</i> in cellule HeLa ed HeLa TK1 ⁻	42

3.3.1 Silenziamento stabile con plasmidi esprimenti shRNA in cellule HeLa TK1-	42
3.3.2 Silenziamento transiente con siRNA di cellule HeLa e HeLa TK1-	46
CONCLUSIONI.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	51

ABBREVIAZIONI

(d)CTP: (deossi)citidina trifosfato
(d)NMP, (d)NDP, (d)NTP: (deossi)nucleoside mono, di- e trifosfato
(d)TMP, (d)TTP: (deossi)timidina mono- e trifosfato
293: cellule trasformate di rene embrionale umano
ACC: ATP/ADP carrier
ADP: adenosina difosfato
APC-Cdh1: complesso di attivazione Cdh1 dipendente da APC
ATP: adenosina trifosfato
BSA: albumina sierica bovina
C63: fibroblasti di pelle umana
cDNA: DNA complementare
cpm: conte per minuto
CT: ciclo threshold
d(d)CTP: dideossicitidina trifosfato
dCK: deossicitidina chinasi
dGK: deossiguanosina chinasi
dGTP: deossiguanosina trifosfato
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: dimetilsolfossido
DNC: deoxynucleotide carrier
DTT: ditiotreitolo
EDTA: acido etilendiamminotetracetico
FACS: fluorescence activated cell sorter
FBS: fetal bovine serum
FIAU: 1-(2-deossi-2-fluoro- β -D-arabino-furanosil)-5-iodouracile o fialuridina
GFP: green fluorescent protein
HBS: HEPES-buffered saline
HeLa TK1: fibroblasti umani derivati da carcinoma alla cervice uterina prive dell'enzima timidina chinasi 1
HeLa: fibroblasti umani derivati da carcinoma alla cervice uterina
hENT1: human equilibrative nucleoside transporter 1
HEPES: acido N-2-idrossietilpiperazide-N-2-etansulfonico
hmbs: idrossimetilbilanosintasi
HuBMSC-MCP: human bone marrow stromal cell-derived mitochondrial carrier protein

IGF-I: insulin-like growth factor I
LB Agar: Luria Bertani medium
LTR: long terminal repeats
MCF: mitochondrial carrier family
MCF-7: cellule di carcinoma umano al seno
MCP: mitochondrial carrier protein
MDS: sindromi da deplezione del DNA mitocondriale
mRNA: RNA messaggero
mtDNA: DNA mitocondriale
mtRNA: RNA mitocondriale
OST TK1⁻: cellule di osteosarcoma umano prive dell'enzima timidina chinasi 1
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PNC1: pyrimidine nucleotide carrier 1
pRS: retroviral silencing plasmid
Rim2p: replication in mitochondria 2p
RISC: RNA-Induced Silencing Complex
RNAi: RNA interference
rRNA: RNA ribosomale
RT-PCR: real time PCR
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA
SLC: solute carrier family
ThPP: tiamina pirofosfato
TK1: timidina chinasi citosolica
TK2: timidina chinasi mitocondriale
Tpc1p: thiamine pyrophosphate carrier 1p
Tris: 2-amino-2-idrossimetilpropano-1,3-diolo
tRNA: RNA transfer
UTP: uridina trifosfato

ABSTRACT

Fin'ora lo studio di trasportatori mitocondriali di deossinucleotidi nelle cellule umane ha permesso di caratterizzare funzionalmente il trasporto di dCTP e ha dimostrato che il nucleotide timidinico importato nei mitocondri è il dTMP, ma le conoscenze sul trasporto degli altri deossinucleotidi sono lacunose. Studi svolti nel nostro laboratorio hanno indagato gli scambi di dNTP attraverso la matrice mitocondriale in cellule OST TK1⁻ silenziate per i trasportatori SLC25A33 e SLC25A36. Questi presentano elevata similarità di sequenza e sono omologhi al trasportatore di nucleotidi pirimidinici Rim2p di lievito. Sfruttando il meccanismo di RNAi si sono ottenute cellule silenziate stabilmente per *slc25a33* con un plasmide esprime uno shRNA. Il lavoro svolto durante il mio tirocinio mirava a inattivare l'espressione di *slc25a33* in due linee di cellule HeLa mediante RNAi con siRNA sintetici o plasmidi codificanti shRNA. Prima ho analizzato l'espressione del trasportatore in cellule trasformate e caratterizzato la linea cellulare. Poi ho trasfettato le cellule e rilevato il livello residuo di mRNA mediante RT-PCR. Con il silenziamento stabile si è raggiunto un buon spegnimento dell'espressione di *slc25a33* in cellule HeLa TK1⁻ ma quello più efficace si è ottenuto dalla trasfezione transiente con siRNA sintetici in entrambe le linee cellulari.

INTRODUZIONE

1.1 Sintesi del DNA mitocondriale e dei suoi precursori

I mitocondri umani contengono un piccolo genoma circolare a doppio filamento di 16.6 kbp codificante 13 polipeptidi che sono componenti essenziali di complessi della catena respiratoria mitocondriale. Le restanti componenti sono codificate da geni nucleari e vengono dislocate nel mitocondrio tramite specifici sistemi di importo. Oltre a queste proteine indispensabili per il corretto funzionamento della fosforilazione ossidativa, il DNA mitocondriale (mtDNA) codifica per due rRNA e ventidue tRNA necessari per la sintesi proteica all'interno della matrice; infatti i mitocondri contengono sistemi enzimatici responsabili della replicazione e dell'espressione del mtDNA che sono distinti da quelli nucleari. Una cellula somatica di mammifero può contenere da circa 1000 a 10000 copie di mtDNA, che rappresenta non più del 5% del DNA cellulare totale. La replicazione del mtDNA non è coordinata con quella del DNA nucleare: mentre quella del DNA nucleare avviene esclusivamente durante la fase S, il mtDNA viene replicato durante tutto il ciclo cellulare (Bogenhagen e Clayton, 1976) e anche in cellule a differenziamento terminale in cui il genoma nucleare ha smesso di replicarsi.

Le cellule eucariotiche necessitano di deossiribonucleotidi (dNTP) per la replicazione e la riparazione del DNA nucleare e mitocondriale. Questi precursori devono essere in quantità adeguate all'entità della sintesi ed in proporzioni bilanciate. Eventuali sbilanciamenti portano a imprecisioni della sintesi del DNA e del mantenimento del genoma, quindi a mutazioni genetiche puntiformi o alterazioni strutturali più estese. Anche la quantità totale di mtDNA può subire modificazioni quali deplezioni dovute a insufficiente disponibilità di precursori. Le sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (MDS) sono caratterizzate da una diminuzione del numero di copie del mtDNA, da una sintesi insufficiente dei componenti dei complessi della catena respiratoria e da scompensi del metabolismo energetico. Le sindromi, causate da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo dei dNTP e nella sintesi del mtDNA, sono ereditate come tratti autosomici recessivi e caratterizzate da fenotipi tessuto-specifici (Elpeleg et al., 2002).

I deossiribonucleotidi sono sintetizzati tramite due vie metaboliche: la via *de novo* e la via di recupero. La via *de novo* ha sede citosolica e consiste nella riduzione dei ribonucleosidi difosfato nei corrispondenti deossiribonucleosidi

difosfato da parte dell'enzima citosolico ribonucleotide reduttasi (Reichard, 1988). La via di recupero, che è presente sia nel citosol che nei mitocondri, porta alla consecutiva fosforilazione da mono- a trifosfato dei deossiribonucleosidi ottenuti dalla degradazione del DNA o importati dall'ambiente extracellulare.

La ribonucleotide reduttasi è un enzima eterotetramerico essenziale per la sintesi del DNA e regolato in modo allosterico e trascrizionale (Reichard, 1988). L'enzima consiste in una subunità maggiore omodimerica R1 (160 kDa), che contiene il sito catalitico e due siti per la regolazione allosterica, ed una subunità minore R2 (78 kDa) anch'essa omodimerica che contiene un centro diferrico (Fe^{3+}) con un radicale tirosile indispensabile alla reazione. L'espressione dei geni codificanti per R1 ed R2 è indotta in fase S ma l'abbondanza delle due subunità è diversa durante le fasi del ciclo cellulare. Infatti un meccanismo di controllo porta alla proteolisi di R2 in mitosi tramite ubiquitinazione da parte del complesso proteico APC-Cdh1 che riconosce una KEN-box presente all'N-terminale della proteina. La degradazione di R2 comporta l'inattivazione della ribonucleotide reduttasi in mitosi, quindi la sintesi *de novo* dipendente dall'isoforma R1-R2 della ribonucleotide reduttasi è limitata alla fase S/G2 ed assente in cellule non proliferanti.

È stata recentemente identificata (Tanaka et al., 2000 e Nakano et al., 2000) una seconda subunità minore, p53R2, omologa a R2 e indotta da p53 che non viene degradata in mitosi perché mancante della KEN-box. La subunità p53R2 forma un complesso enzimatico attivo con R1 (isoforma R1-p53R2) permettendo l'apporto di dNTP per i processi che avvengono al di fuori della fase S quali la riparazione del DNA e la replicazione del mtDNA (Håkansson et al., 2006). L'espressione di p53R2 è attivata da p53 in seguito a danni al DNA e per tale motivo inizialmente si era ipotizzato che la funzione prevalente della subunità fosse quella di partecipare alla sintesi dei dNTP usati per riparare i danni al DNA (Tanaka et al., 2000). Successivamente è emerso che la funzionalità dell'isoforma R1-p53R2 è indispensabile per il mantenimento del DNA mitocondriale.

Nella via di recupero i nucleotidi vengono prodotti riutilizzando i nucleosidi che derivano dal catabolismo degli acidi nucleici e dei nucleotidi endogeni. Enzimi detti nucleotidasi rimuovono i gruppi fosfato dai deossinucleosidi monofosfato portando al catabolismo dei deossiribonucleotidi, mentre le deossinucleoside chinasi ne permettono il recupero. I deossiribonucleosidi vengono fosforilati da quattro diverse deossinucleoside chinasi, citosoliche e mitocondriali. Gli enzimi citosolici coinvolti sono la timidina chinasi 1 (TK1), espressa solo in fase S, e la deossicitidina chinasi (dCK), ad espressione costitutiva lungo il ciclo cellulare. La timidina chinasi 2

(TK2) e la deossiguanosina chinasi (dGK) si trovano invece nella matrice mitocondriale.

La diversa distribuzione delle chinasi e le loro diverse specificità di substrato garantiscono la fosforilazione dei quattro deossiribonucleosidi in entrambi i compartimenti.

In fibroblasti umani in coltura il pool mitocondriale dei dNTP cambia in parallelo con quello citosolico in dipendenza dello stato proliferativo della cellula, rimanendo ad una percentuale sempre inferiore rispetto a quello citosolico. In cellule ciclanti le dimensioni dei pool mitocondriali sono circa il 3-10 % di quelli citosolici e questo rapporto si conserva anche in stato di quiescenza quando entrambi i pool si riducono di 10-50 volte (Ferraro et al., 2005).

1.2 Origine dei precursori del DNA mitocondriale

Dallo studio di patologie umane causate da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo dei dNTP, è emerso che la sintesi intramitocondriale è indispensabile per rifornire i precursori necessari al mtDNA in cellule differenziate ad elevata richiesta energetica. Si è infatti identificata una mutazione *frameshift* al gene DGUOK codificante la chinasi mitocondriale dGK che ha come conseguenza la produzione della proteina troncata in individui affetti da una forma epato-cerebrale di MDS (Mandel et al., 2001). Successivamente, si sono identificate mutazioni di TK2 in individui affetti da MDS miopatica dove l'attività dell'enzima nei mitocondri di cellule muscolari affette è ridotta del 14-45% rispetto ad individui di controllo sani, dimostrando l'importanza di TK2 per il mantenimento del pool mitocondriale dei dNTP pirimidinici (Saada et al., 2001).

Queste forme di MDS suggerirebbero quindi che la via di recupero sia la maggior fonte di dNTP per la replicazione del mtDNA, ma ciò è stato messo in discussione dalla scoperta che anche le mutazioni di p53R2 portano a una grave forma di MDS. La variante R1-p53R2 della ribonucleotide reduttasi adempie ad una importante funzione *in vivo* come dimostrato da deplezioni al mtDNA nel muscolo scheletrico di pazienti con una mutazione inattivante RRM2B, il gene codificante per p53R2, e in molti organi di topi knockout per questo gene (Bourdon et al., 2007). La deplezione del DNA mitocondriale dovuta ad alterazioni di p53R2 nell'uomo e nel topo implica che la subunità svolga un ruolo importante nel fornire dNTP per la sintesi del DNA mitocondriale in cellule non proliferanti.

Un'altra prova che dimostra il contributo della sintesi *de novo* al mantenimento dei pool mitocondriali deriva dall'analisi di colture quiescenti di

fibroblasti di pazienti affetti da MDS miopatica dovuta a mutazioni del gene della TK2. In queste cellule il contenuto di dTTP nel citosol e nei mitocondri non varia rispetto a quello dei fibroblasti di controllo (Frangini et al., 2009).

1.3 Scambi dinamici tra pool citosolici e mitocondriali rilevati con precursori radioattivi

Fino a poco tempo fa si riteneva che per la replicazione del mtDNA i mitocondri contenessero un particolare pool di dNTP non in equilibrio con quello citosolico. Infatti quando veniva fornita timidina radioattiva a cellule mancanti dell'enzima TK1 (TK1⁻) questa veniva fosforilata dalla timidina chinasi mitocondriale ed incorporata preferenzialmente nel mtDNA (Bogehagen e Clayton, 1976). Successivamente, utilizzando un metodo innovativo per la separazione dei due pool, è stata dimostrata l'esistenza di uno scambio reciproco tra i pool di dNTP sintetizzati nel citosol e quelli prodotti nei mitocondri (Pontarin et al., 2003).

Lo studio dello scambio di deossinucleotidi attraverso la membrana mitocondriale di cellule in coltura, si avvale di esperimenti di flusso isotopico (Pontarin et al., 2003). Questi consistono nell'incubare cellule in coltura con precursori marcati radioattivamente e successivamente isolare i pool citosolici e mitocondriali per determinare non soltanto la radioattività totale incorporata nei due pool, ma anche la radioattività specifica, espressa in cpm/pmole, dei dNTP derivati dal nucleoside radioattivo somministrato (Fig.1).

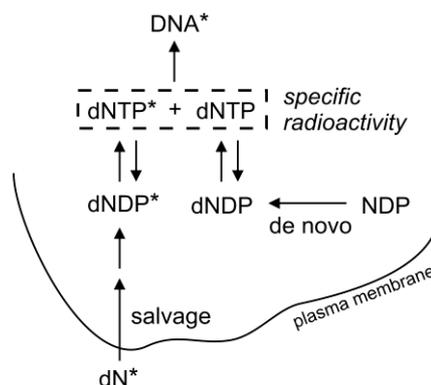


Fig.1 Rappresentazione schematica della tecnica di flusso isotopico che permette di misurare le dinamiche dei pool di dNTP. Con l'asterisco è indicato il precursore marcato radioattivamente (da Rampazzo et al., 2010).

La radioattività specifica permette di valutare il contributo della sintesi *de novo* e della via di recupero dei deossinucleosidi al mantenimento dei pool dei dNTP in base alla diluizione della radioattività specifica del nucleoside marcato che è stato fornito. Si sono in questo modo studiate le dinamiche del pool dei fosfati della timidina in cellule TK1⁺ e TK1⁻ umane, fornendo timidina triziata e misurando la radioattività specifica del dTTP nel compartimento mitocondriale e citosolico.

In cellule TK1⁻ la timidina triziata fornita viene fosforilata solamente dalla TK2 presente nei mitocondri, mentre in cellule TK1⁺ ciclianti la fosforilazione avviene sia nel citosol che nei mitocondri.

In cellule TK1⁻ la presenza di dTTP radioattivo nel citosol dimostra che avviene un esporto di fosfati della timidina dal mitocondrio. Invece la diluizione della radioattività specifica del dTTP mitocondriale, dovuta ai fosfati della timidina sintetizzati *de novo* nel citosol e quindi non radioattivi, indica il loro importo nei mitocondri (Fig.2). Esperimenti condotti in cellule ciclianti TK1⁺ hanno dimostrato che l'attività specifica del dTTP è elevata sia nel citosol (dove è attiva la TK1) che nei mitocondri. In cellule TK1⁺ quiescenti, che non esprimono la timidina chinasi citosolica e dipendono esclusivamente dalla TK2 per la fosforilazione della timidina, l'attività specifica del dTTP è più elevata rispetto a cellule proliferanti con valori vicini a quella della timidina marcata che è stata fornita (Fig.2). Ciò significa che si verifica una scarsa diluizione dovuta al dTTP non marcato prodotto perché la via *de novo* è poco attiva.

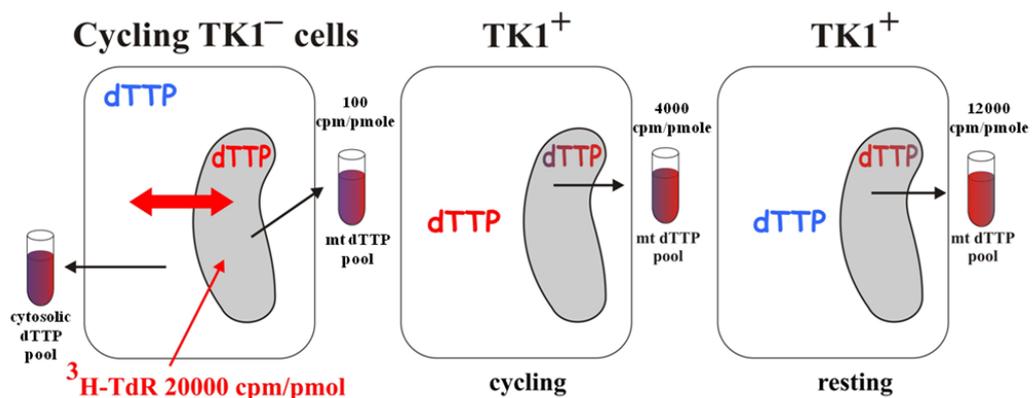


Fig.2 Rappresentazione dell'isolamento del pool di dTTP citosolico e mitocondriale per lo studio delle dinamiche del pool di fosfati della timidina in cellule TK1⁺ e TK1⁻. In blu viene rappresentato il dTTP non radioattivo prodotto nel citosol mentre in rosso il dTTP radioattivo prodotto dalla fosforilazione della timidina triziata aggiunta al terreno di coltura. Si nota che in cellule TK1⁻ proliferanti l'attività specifica del pool mitocondriale di dTTP è bassa (da Pontarin et al., 2003) mentre in cellule TK1⁺ ciclianti aumenta a 4000 cpm/pmole, fino ad arrivare a 12000 cpm/pmole in cellule TK1⁺ quiescenti (da Ferraro et al., 2005).

Anche le cellule TK1⁻ proliferanti esprimono soltanto la TK2, ma qui l'attività specifica del dTTP mitocondriale è inferiore a quella riscontrata nelle cellule TK1⁺ quiescenti. Infatti nelle cellule proliferanti la sintesi *de novo* citosolica è attiva e il dTTP non radioattivo importato nel mitocondrio diluisce quello derivato dalla via di recupero mitocondriale dipendente dalla TK2. Il dTTP citosolico in queste cellule ha radioattività ancora più bassa di quello mitocondriale in quanto il dTTP radioattivo prodotto nel mitocondrio viene esportato e diluito nel grande pool citosolico prodotto *de novo*. Questi dati dimostrano che esiste una comunicazione bidirezionale tra citoplasma e mitocondrio.

Esperimenti di flusso isotopico, effettuati in cellule proliferanti, hanno dimostrato che i dNTP mitocondriali derivano prevalentemente dall'attività della ribonucleotide reduttasi insieme a quella dell'enzima TK1. Dal confronto degli effetti del silenziamento di TK2 tramite *RNA interference* in due linee cellulari TK1⁺ e TK1⁻, si è dimostrato che la TK2 non è necessaria per il mantenimento del pool del dTTP in cellule ciclanti quando la sintesi *de novo* citoplasmatica è attiva (Rampazzo et al., 2007).

I pool mitocondriali e citosolici mostrano un comportamento dinamico, suggerendo un rapido scambio tra loro. Successivi esperimenti che supportano l'ipotesi di uno scambio reciproco tra i due compartimenti, hanno riguardato il pool di dGTP mitocondriale. In questo caso si è visto che il dGTP citosolico e mitocondriale sono in equilibrio dinamico e rapidamente raggiungono uno stato stazionario sia in cellule ciclanti che in cellule quiescenti (Leanza et al., 2008).

In uno studio svolto nel nostro laboratorio, si è analizzato l'importo e l'esporto di fosfati della timidina in mitocondri di fegato di topo. Esperimenti di *pulse and chase* con timidina marcata radioattivamente dimostrano compartimenti metabolici separati per il pool di dTTP citosolico e mitocondriale ma in rapida comunicazione tra loro. Fornendo dTMP radioattivo 5 nM nel mezzo di incubazione in cui si trovano mitocondri isolati da fegato di topo si riscontra radioattività intramitocondriale e ciò significa che il nucleotide radioattivo viene importato. Ciò è dimostrato dall'accumulo del nucleotide radioattivo nei mitocondri, infatti quando il dTMP esterno è ad una concentrazione nM il nucleotide è 100 volte più concentrato nella matrice mitocondriale. Ripetendo l'esperimento con dTTP radioattivo, si è visto che nei mitocondri vengono trasferiti dTMP e timidina derivanti dalla defosforilazione del dTTP. Inoltre l'inibizione di complessi della catena respiratoria non ha effetto sull'importo di dTMP, quindi esso non dipende da una catena respiratoria funzionale o dall'idrolisi di ATP. L'analisi dell'esporto di fosfati della timidina dai mitocondri ha dimostrato che l'efflusso è solo moderato e non confrontabile con il rapido importo di dTMP. I dati indicano l'esistenza di un trasportatore specifico per il

dTMP nella matrice mitocondriale la cui natura molecolare resta da caratterizzare (Ferraro et *al.*, 2006).

Ulteriori prove degli scambi tra citosol e mitocondri derivano da saggi di trasporto di analoghi nucleosidici attraverso la membrana mitocondriale. Questi composti dopo essere stati fosforilati nella forma trifosfato, inibiscono la sintesi del DNA causando una terminazione prematura in seguito all'incorporazione nella catena nucleotidica o andando ad interferire con la DNA polimerasi. Essi vengono utilizzati in medicina come farmaci antivirali o antitumorali, ma il loro impiego clinico è limitato dalla tossicità mitocondriale dovuta a deplezioni del mtDNA.

Gli analoghi nucleosidici possono venire fosforilati nel citoplasma dalle deossiribonucleoside chinasi e quindi attraversare la membrana interna mitocondriale solo tramite sistemi specifici di importo, in quanto i nucleotidi non possono attraversare le membrane cellulari. Altrimenti, attraversano la membrana come nucleosidi e quindi vengono fosforilati da enzimi presenti nei mitocondri. È stato identificato nell'uomo un trasportatore di nucleosidi la cui espressione sulla membrana mitocondriale è un determinante della tossicità mitocondriale dell'analogo fialuridina (FIAU). Con esperimenti di microscopia confocale è stato provato che hENT1 (human Equilibrative Nucleoside Transporter 1) è presente sia nella membrana plasmatica che in quella mitocondriale ed esperimenti con mitocondri isolati hanno dimostrato che trasporta nei mitocondri sia uridina che il suo analogo FIAU marcati isotopicamente, in quanto la sua sovraespressione aumenta la tossicità mitocondriale causata dal farmaco (Lai et *al.*, 2004).

1.4 Trasportatori mitocondriali per lo scambio di nucleotidi tra citoplasma e mitocondrio

I mitocondri sono la sede di importanti processi metabolici generanti energia come la fosforilazione ossidativa, il ciclo dell'acido citrico e, negli eucarioti superiori, la β -ossidazione degli acidi grassi. Queste attività metaboliche richiedono uno scambio rapido ed altamente specifico di molecole tra citosol e matrice mitocondriale.

La membrana mitocondriale interna possiede una bassa permeabilità elettroforetica a molte molecole ma attraverso l'azione di sistemi di trasporto è selettivamente permeabile a cofattori, metaboliti e nucleotidi. I nucleosidi possono attraversare per diffusione facilitata le membrane cellulari mentre i nucleotidi, una volta formati, non possono attraversare le membrane.

I trasportatori mitocondriali sono richiesti per la generazione di ATP, la sintesi del DNA mitocondriale, dell'RNA ed altre fondamentali funzioni cellulari. Nelle cellule eucariotiche i membri della famiglia di trasportatori mitocondriali MCF (Mitochondrial Carrier Family) facilitano il trasporto di metaboliti attraverso la membrana interna mitocondriale, connettendo funzioni citoplasmatiche e della matrice. Le MCP (Mitochondrial Carrier Proteins) sono codificate da geni nucleari e successivamente importate nella membrana mitocondriale interna, dove sono presenti in bassa quantità e caratterizzate da un turnover ridotto. Comparando le sequenze amminoacidiche delle prime MCP caratterizzate, si è visto che presentano molte caratteristiche conservate (Palmieri, 1994). La prima MCP identificata è stata AAC (ATP/ADP carrier), un trasportatore essenziale per la sintesi di ATP nel mitocondrio. Sono state identificate tre isoforme di questo trasportatore e la sua espressione è regolata dal differenziamento e dallo stato energetico cellulare.

La struttura primaria delle MCP è costituita da tre ripetizioni omologhe di circa 100 amminoacidi in lunghezza; ogni elemento ripetuto contiene due sequenze idrofobiche che formano una struttura secondaria ad α -elica transmembrana separate da un'estesa regione idrofilica. Questi loop idrofilici contengono una sequenza conservata chiamata "mitochondrial signature motif" di tipo P-h-D/E-h-h-K/R-h-R/K-(20-30 amminoacidi)-D/E-G-(4 amminoacidi)-a-K/R-G dove "h" indica un residuo idrofobico mentre "a" un amminoacido aromatico; le estremità N- e C-terminali sporgono nel citosol dallo stesso lato della membrana (Fig.3).

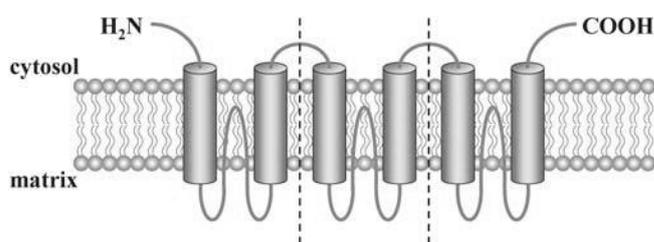


Fig.3 Struttura delle Mitochondrial Carrier Proteins MCP (da Palmieri, 2004).

Per caratterizzare funzionalmente le MCP conosciute o per identificare nuovi membri di questa famiglia di trasportatori proteici si sono sviluppati metodi di studio basati sulla ricostituzione delle proteine di interesse in vescicole di liposomi. Queste vescicole vengono pre-caricate con i composti di cui si indaga il

trasporto, come ad esempio i nucleotidi, e poi incubate in presenza di un particolare nucleotide radioattivo per studiarne l'importo nei liposomi.

Il primo trasportatore mitocondriale di deossinucleotidi caratterizzato in cellule umane con il metodo di studio appena descritto mostra un'efficiente attività di trasporto del dCTP. Gli esperimenti svolti con una frazione eterogenea di proteine della membrana mitocondriale ricostituite in liposomi hanno dimostrato che il ^{32}P -dCTP fornito nel terreno di incubazione veniva trovato all'interno dei mitocondri; inoltre la concentrazione del dCTP radioattivo aumentava con l'aumentare della concentrazione proteica. Questo importo era inibito dall'ATP ed era specifico per il dCTP (Bridges et al., 1999).

La ricostituzione in vescicole di liposomi può riguardare singole proteine ricombinanti prodotte in batteri. Applicando questa strategia sperimentale è stata scoperta la funzione di quindici nuovi trasportatori del lievito espressi in forma ricombinante in *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Le proteine vengono poi purificate ed incorporate nei liposomi per caratterizzarle effettuando saggi di trasporto con diversi substrati radioattivi (Palmieri et al., 2006).

Questo approccio è più rigoroso del precedente, ma non esente da errori. Infatti la ricostituzione della proteina in una membrana artificiale *in vitro* non riproduce una condizione confrontabile a quella che avrebbe *in vivo*, dove sono presenti altri complessi proteici, fattori regolativi, o modificazioni post-traduzionali che influenzano il suo funzionamento.

1.5 Il trasportatore DNC o SLC25A19

In uno studio pubblicato nel 2001 (Dolce et al., 2001) è stato descritto un trasportatore umano di deossiribonucleotidi della famiglia MCP denominato DNC (Deoxyribonucleotide Carrier). Dalla ricostituzione in liposomi e dalla caratterizzazione funzionale con saggi di trasporto, si è dimostrato che possiede tutte le caratteristiche della famiglia di trasportatori mitocondriali MCF e che catalizza uno scambio tra nucleotidi e deossinucleotidi; i migliori substrati interni alla membrana mitocondriale sono dNTP e ADP mentre quelli esterni sono dNDP, dNTP e NDP, dove i dNDP possiedono la maggiore affinità. La funzione di questo trasportatore sembra essenziale per la sintesi del DNA mitocondriale ed è coinvolto nella citotossicità causata dagli analoghi nucleosidici in quanto scambia efficientemente i trifosfati dei dideossinucleosidi (Dolce et al., 2001). Da un'analisi genetica è risultato che il gene umano che codifica per DNC è *slc25a19* ed è localizzato nel cromosoma 17 (17q25.3) (Iacobazzi et al., 2001).

Successive pubblicazioni hanno però messo in dubbio il trasporto di deossinucleotidi da parte della proteina DNC (o SLC25A19). È stato infatti provato che in cellule in coltura DNC non è associato a citotossicità causata da analoghi nucleosidici e che non vi sono evidenze che lo classifichino come trasportatore di deossinucleotidi nei mitocondri *in situ*. La cinetica di DNC non supporta il fatto che sia un trasportatore di dNTP o dNDP perché le concentrazioni di deossiribonucleotidi e le proporzioni tra ribo- e deossinucleotidi utilizzate da Dolce et al. (2001) non corrispondono a quelle fisiologiche. Inoltre in saggi in cui viene fornito (d)dCTP alle cellule, si è visto che gli effetti degli analoghi sulla deplezione del mtDNA non variano con i livelli di espressione del trasportatore (Lam et al., 2005).

Da un'analisi dell'allineamento della sequenza amminoacidica di SLC25A19 con quella di proteine di lievito, si è riscontrata un'elevata similarità di sequenza con Tpc1p, un trasportatore mitocondriale della tiamina pirofosfato (ThPP). Inoltre nella regione delle tre α -eliche transmembrana che formano il sito attivo, sei residui su sette coincidono suggerendo che la specificità di substrato sia probabilmente la stessa per entrambe le proteine (Kang e Samuels, 2008). In cellule di topi knockout *slc25a19^{-/-}* non si sono riscontrate deplezioni del mtDNA o diminuzione dei deossiribonucleotidi nella matrice mitocondriale. Un saggio di trasporto *in vitro* ha dimostrato che la proteina mutata riduce il trasporto di ThPP di circa il 70% rispetto alla proteina *wild-type* (Lindhurst et al., 2006). È stato quindi ipotizzato che DNC (SLC25A19) trasporti ThPP nei mitocondri e che la riduzione di questo cofattore, dovuta a mutazioni del trasportatore, inibisca l'attività di importanti enzimi mitocondriali coinvolti nel metabolismo ossidativo.

1.6 Identificazione del trasportatore di nucleotidi pirimidinici Rim2p in lievito ed omologie con trasportatori proteici umani mitocondriali

Il genoma nucleare di *Saccharomyces cerevisiae* codifica per 35 membri della famiglia di trasportatori proteici MCF dei quali 20 sono stati caratterizzati in studi genetici e biochimici (Palmieri et al., 2006). In lievito è stato descritto un trasportatore di nucleotidi pirimidinici, Rim2p (Replication in mitochondria 2p), di rilevante importanza per il mantenimento dell'integrità del mtDNA (Van Dyck et al., 1995). L'ampia distribuzione di questo trasportatore nel regno eucariotico indica che svolge un importante ruolo che si è conservato durante l'evoluzione. Le proprietà di trasporto e le caratteristiche cinetiche di Rim2p studiate ricostituendo la proteina in liposomi, insieme alla localizzazione mitocondriale, dimostrano che è un trasportatore per nucleotidi pirimidinici e che media lo scambio dei

deossinucleotidi con maggiore affinità per i di- e trifosfati (Marobbio et al., 2006; Fig.4).

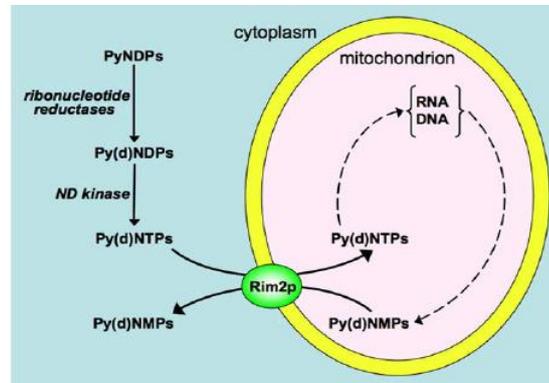


Fig.4 Ruolo del trasportatore Rim2p nella sintesi e degradazione del mtDNA e del mtRNA. Abbreviazioni: PyNDPs: nucleosidi difosfato pirimidinici, Py(d)NDPs: deossinucleosidi difosfato pirimidinici, Py(d)NTPs: deossinucleosidi trifosfato pirimidinici, Py(d)NMPs: deossinucleosidi monofosfato pirimidinici, ND: nucleoside chinasi (da Palmieri et al., 2006).

Nel genoma umano si sono identificati due ortologi di Rim2p: SLC25A33 e SLC25A36. La famiglia SLC25 (Solute Carrier family 25) trasporta un'ampia varietà di molecole ed è costituita da proteine che sono molto conservate nell'uomo e in lievito (Palmieri, 2004). Tra i nuovi membri di questa famiglia si trova la proteina SLC25A36, con funzione ancora sconosciuta, che mostra il 61% di identità amminoacidica con SLC25A33 (Haitina et al., 2006). Entrambi questi trasportatori presentano omologia con il trasportatore proteico mitocondriale Rim2p di lievito (Marobbio et al., 2006). Un'analisi dell'espressione ha provato che SLC25A33 è altamente espresso nel sistema nervoso centrale, mentre i livelli di mRNA nei tessuti periferici sono molto bassi; ciò suggerisce che la funzione primaria sia nel CNS (Haitina et al., 2006).

Nello studio di Wang e collaboratori (2004) si è identificato il trasportatore codificato da *slc25a33* in cellule umane stromali di midollo osseo (BMSC) chiamato HuBMSC-MCP (Human Bone Marrow Stromal Cell derived Mitochondrial Carrier Protein). Esso è localizzato sulla membrana mitocondriale ed è conservato filogeneticamente fra gli eucarioti. Da un'analisi dell'mRNA mediante RT-PCR si è dimostrato che viene espresso in linee cellulari tumorali e che mostra elevati livelli di mRNA nel muscolo scheletrico e nel testicolo ed in quantità minore in cuore, cervello, fegato, reni, prostata, colon e leucociti del sangue periferico. La proteina inoltre è presente nelle protrusioni di cellule MCF-

7 che sono caratteristiche di cellule tumorali. Si è quindi ipotizzato che trasporti un substrato correlato alla fosforilazione ossidativa mitocondriale in grado di fornire energia per metastasi di cellule tumorali (Wang et al., 2004).

In un successivo lavoro (Floyd et al., 2007) HuBMSC-MCP viene ridenominato PNC1 (Pyrimidine Nucleotide Carrier 1) per l'elevato grado di identità di sequenza con Rim2p di lievito. In saggi di trasporto effettuati ricostituendo la proteina in liposomi esso è in grado di trasportare UTP ed in minore quantità TTP e CTP. PNC1 oltre ad essere importante per l'attività mitocondriale, è coinvolto nella regolazione della crescita cellulare, delle dimensioni cellulari, della proliferazione e la sua espressione è indotta da insulina e IGF-I (Insuline-like Growth Factor I).

Si è osservato che la sua sovraespressione in cellule di mammifero in coltura porta all'aumento delle dimensioni cellulari mentre se viene silenziato le dimensioni cellulari diminuiscono e la proliferazione cellulare rallenta. Inoltre i livelli intramitocondriali di UTP appaiono ridotti, mentre la quantità di ATP e il potenziale della membrana mitocondriale interna rimangono invariati, pur in presenza di un aumento di ROS (Floyd et al., 2007).

1.7 Silenziamento mediante *RNA interference* dei geni *slc25a33* e *slc25a36*

Un metodo per studiare la funzione dei geni *in vivo* consiste nel valutare gli effetti sul metabolismo cellulare prodotti dal loro silenziamento o dalla sovraespressione delle proteine da essi codificate.

Il silenziamento basato sull'*RNA interference* (RNAi) permette di bloccare l'espressione di geni specifici.

In cellule di mammifero le molecole che causano RNAi sono corti oligonucleotidi di RNA a doppio filamento, lunghi circa 20 nucleotidi, che vengono tagliati da una nucleasi chiamata Dicer e maturati a *small interfering RNA* (siRNA) in grado di appaiarsi all'mRNA complementare. In questo processo il filamento antisense del doppio filamento di siRNA diventa parte di un complesso multiproteico detto RNA-Induced Silencing Complex (RISC) che appaia il siRNA all'mRNA complementare introducendo un taglio nell'mRNA. Il trascritto viene quindi degradato e la proteina non viene espressa. Per indurre RNAi si possono utilizzare molecole di siRNA sintetizzate *in vitro* o vettori che esprimono uno *short hairpin RNA* (shRNA), cioè un doppio filamento di RNA con struttura a forcina. La scelta avviene a seconda del sistema modello che si utilizza, della necessità di un silenziamento transiente o costitutivo che dura nel tempo e da altri parametri sperimentali. L'RNAi offre un approccio utile per studi

di perdita di funzione genica negli organismi eucariotici e permette di osservare direttamente gli effetti dovuti al silenziamento di un determinato gene.

Nel nostro laboratorio è in corso uno studio per la caratterizzazione dei trasportatori mitocondriali SLC25A33 e SLC25A36. Fin'ora si hanno informazioni su SLC25A33 da saggi di trasporto *in vitro*, effettuati ricostituendo la proteina in liposomi, e da analisi dell'espressione del trasportatore. Questi hanno dimostrato che all'interno dei liposomi SLC25A33 trasporta UTP, TTP e CTP e che variazioni della sua espressione hanno un effetto sulle dimensioni cellulari (Floyd et al., 2007). La funzione di SLC25A36 invece non si conosce, ma la proteina presenta un'elevata identità di sequenza amminoacidica con SLC25A33 (Haitina et al., 2006) e quindi è ipotizzabile anche per essa una funzione nel trasporto di nucleotidi.

Lo scopo è quello di verificare se la similarità di sequenza comporti una funzione analoga delle due proteine. Si sono quindi silenziati i geni dei due trasportatori (uno dei due o entrambi) per verificare se alterando il grado di espressione della proteina variano i pool nucleotidici mitocondriali e citosolici.

La linea cellulare OST TK1⁻ è stata prima trasfettata con plasmidi esprimenti uno shRNA per il silenziamento stabile di *slc25a33* ottenendo dei cloni con un livello di silenziamento dell'80-85%. Dall'analisi dei pool di ribo- e deossinucleotidi nei mitocondri e nel citoplasma, essi sono risultati invariati tra cellule silenziate e controlli.

Si è passati quindi a studiare l'effetto sugli scambi dinamici dei pool dei deossinucleotidi con esperimenti di flusso isotopico. Fornendo a cellule prive della timidina chinasi citosolica (TK1⁻) dei precursori radioattivi, in particolare timidina e uridina triziate, si sono osservate le variazioni dello scambio dei fosfati della timidina e dell'uridina attraverso la membrana mitocondriale. In cellule silenziate si nota un'inibizione dell'esporto di fosfati della timidina dai mitocondri che si riflette in una radioattività specifica del dTTP nei mitocondri maggiore rispetto ai controlli, mentre nel citosol la radioattività specifica è più bassa. Invece fornendo uridina triziata si presenta una bassa radioattività dei fosfati dell'uridina nel pool mitocondriale di cellule silenziate rispetto ai controlli: ciò indica che l'importo di nucleotidi di uridina dal citosol viene inibito.

Successivamente è stato silenziato *slc25a36* tramite trasfezione transiente utilizzando quattro sequenze di siRNA nei cloni OST TK1⁻ silenziati stabilmente per *slc25a33*. Si sono quindi eseguiti gli stessi esperimenti di flusso isotopico con timidina ed uridina triziate svolti con i cloni silenziati stabilmente per *slc25a33*. I dati raccolti indicano che il silenziamento di *slc25a36* con siRNA rinforza gli effetti del silenziamento di *slc25a33*, quindi i due trasportatori sembrano coinvolti nel trasporto dei deossinucleotidi pirimidinici attraverso la membrana

mitocondriale e collaborano per uno specifico esporto di fosfati della timidina dai mitocondri in scambio con fosfati dell'uridina.

SCOPO DELLA TESI

Proteine mitocondriali per il trasporto di dNTP sono state clonate in lievito (Marobbio et al., 2006) e caratterizzate biochimicamente in mitocondri di mammifero (Bridges et al., 1999 e Ferraro et al., 2006) ma le conoscenze sul trasporto di nucleotidi attraverso la membrana della matrice mitocondriale sono ancora limitate.

Recenti studi hanno dimostrato che almeno quarantasei geni del genoma umano codificano per trasportatori proteici mitocondriali della famiglia SLC25 (Haitina et al., 2006). Tra questi è stato identificato il gene *slc25a33*, la cui funzione non è stata ancora chiarita, che presenta omologia con il trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici Rim2p di lievito.

Studi effettuati nel nostro laboratorio in cellule OST TK1⁻ che avevano lo scopo di caratterizzare i trasportatori mitocondriali SLC25A33 e SLC25A36, hanno indicato che le due proteine sono coinvolte nel trasporto di fosfati di uridina e timidina attraverso la membrana mitocondriale.

Allo scopo di controllare se le conclusioni tratte dagli esperimenti con le cellule OST TK1⁻ fossero applicabili anche ad altre cellule umane, durante il tirocinio ho svolto degli esperimenti mirati allo studio della proteina SLC25A33 nelle linee cellulari HeLa ed HeLa TK1⁻ silenziandone il gene tramite il meccanismo di *RNA interference*. Come era stato fatto per la linea OST TK1⁻ ho utilizzato plasmidi codificanti shRNA e inoltre alcuni siRNA commerciali che riconoscono porzioni del trascritto diverse da quelle utilizzate fin'ora.

Poiché in letteratura è riportato che il trasportatore in esame presenta livelli di espressione elevati in linee cellulari tumorali (Floyd et al., 2007), ho analizzato i livelli di mRNA di *slc25a33* in linee cellulari trasformate confrontandole con cellule normali.

Nel nostro laboratorio le due linee di cellule HeLa usate in questa tesi non erano state ancora caratterizzate quindi è stato necessario svolgere degli esperimenti preliminari. Ho controllato l'attività timidina chinasi in ciascuna linea e analizzato la crescita cellulare mediante una curva di crescita.

Dopo aver individuato il protocollo adatto alla trasfezione di queste cellule, ho indotto lo spegnimento del gene *slc25a33* tramite silenziamento stabile mediato da plasmidi esprimenti uno shRNA e silenziamento transiente con siRNA sintetici. Il grado di silenziamento è stato misurato in base al livello di mRNA, determinato con analisi di Real Time PCR condotta sul cDNA corrispondente.

MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari e condizioni di crescita

Le linee cellulari utilizzate per gli esperimenti sono state:

HeLa: fibroblasti umani derivati da carcinoma alla cervice uterina.

HeLa TK1: fibroblasti umani derivati da carcinoma alla cervice uterina mancanti dell'enzima timidina chinasi 1 (TK1).

Le colture cellulari crescono in monostrato in supporti quali fiasche di plastica ventilate o piastre Petri sterili monouso che vengono mantenute in incubatore a 37 °C in presenza di una tensione di anidride carbonica del 5%.

Il terreno di coltura è composto da terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a bassa concentrazione di glucosio (1000 mg/ml) contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS), antibiotici (streptomicina 50 µg/ml e penicillina 60 µg/ml) e l'1% di amminoacidi non essenziali.

Periodicamente le cellule sono state trapiantate in nuovi supporti per permettere una corretta crescita in monostrato utilizzando una soluzione salina isotonica contenente EDTA, un chelante degli ioni calcio che mediano l'adesione cellulare al substrato, e l'enzima proteolitico tripsina per consentire il distacco delle cellule dal supporto; l'inattivazione dell'enzima avviene aggiungendo terreno di coltura. Le colture sono state controllate per l'assenza di contaminazione da micoplasmi e manipolate sempre in sterilità servendosi di cappe a flusso laminare sterilizzate mediante raggi UV per evitare contaminazioni dovute a microrganismi. Quando necessario le cellule sono state contate per mezzo di un Coulter Counter (Coulter Z1, Beckman coulter).

2.2 Congelamento e scongelamento delle colture cellulari

Periodicamente si sono congelate delle fiale contenenti un milione e mezzo di cellule da conservare per lunghi periodi in azoto liquido a -196 °C, per permettere di avere sempre a disposizione delle colture in vitro con caratteristiche cellulari originali che potrebbero altrimenti variare in seguito ad un mantenimento prolungato in coltura.

Il congelamento prevede di ottenere un pellet di cellule centrifugando la sospensione cellulare per 10 minuti a 1300 rpm alla temperatura di 4 °C, rimuovere il surnatante e risospesare in terreno di congelamento costituito dal normale terreno di coltura, contenente il doppio della percentuale di FBS e l'agente crioprotettivo DMSO (10%). In seguito, la sospensione viene trasferita in fiale che vengono poste in freezer in un criostep contenente isopropanolo, permettendo un congelamento graduale.

Lo scongelamento avviene immergendo le fiale in bagnetto termostato a 37 °C per pochi minuti, poi la sospensione viene risospesa in terreno fresco e centrifugata per 10 minuti a 1300 rpm a temperatura ambiente. Dopo che il terreno di congelamento è stato rimosso e sostituito con il normale terreno di coltura, la sospensione cellulare viene trasferita in una fiasca e mantenuta in incubatore.

2.3 Preparazione di campioni cellulari per l'analisi al citofluorimetro

Si è analizzata la distribuzione delle cellule nel ciclo cellulare servendosi di un citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) su campioni di almeno un milione di cellule. La sospensione cellulare deve venire prima lavata per due volte aggiungendo la soluzione salina PBS fredda e centrifugata a 1300 rpm per 10 minuti a 4 °C. Il pellet di cellule viene quindi risospeso in 1 ml di PBS e fissato in 2 ml di etanolo assoluto freddo aggiunto goccia a goccia vorticando piano. I campioni si conservano a 4 °C e per poter effettuare l'analisi al citofluorimetro devono rimanere almeno 24 ore a questa temperatura. Successivamente vanno centrifugati per 10 minuti a 1300 rpm ed il pellet viene lavato con acqua distillata, centrifugato e risospeso in 1 ml totale di ioduro di propidio 50 µg/ml ed RNasi 9 µg/ml per la colorazione. La sospensione viene trasferita in appositi tubini per l'analisi al citofluorimetro che si lasciano in incubatore a 37 °C al riparo dalla luce (a causa della sensibilità dello ioduro di propidio alla luce) per almeno un'ora prima dell'analisi.

2.4 Trasfezione di cellule HeLa mediante coprecipitazione con calcio fosfato

La trasfezione mediante coprecipitazione del DNA con calcio fosfato consiste nell'introdurre DNA esogeno nelle cellule inducendo la formazione di un precipitato che aderisce alla superficie cellulare. Il procedimento consiste nel preparare una sospensione di DNA e calcio cloruro alla quale viene aggiunta

molto lentamente la soluzione salina HBS 2X (HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1.5 mM).

Il giorno prima della trasfezione vengono seminate 200000 cellule HeLa in piastre Petri da 3.5 cm di diametro in modo di avere circa il 90% di confluenza al momento della trasfezione. Si prepara una soluzione A in un tubo da 1.5 ml contenente 225 µl di soluzione di DNA (3.5 µg di plasmide sciolto in acqua sterile) alla quale vanno aggiunti 25 µl di CaCl₂ 2.5 M. Successivamente si prepara una soluzione B in un tubo di vetro sterile da 10 ml con 250 µl di HBS 2X. Usando un pipettatore automatico ed una pipetta Pasteur di vetro si cerca di fare gorgogliare aria nella soluzione B e contemporaneamente aggiungere lentamente con una micropipetta la soluzione A (250 µl) goccia a goccia. Quindi vorticare per 5 secondi e lasciare precipitare il DNA a temperatura ambiente per 20 minuti. La soluzione ottenuta viene distribuita goccia a goccia sul monostrato cellulare e si pone la piastra in incubatore per 48 ore.

2.5 Silenziamento stabile mediato da plasmidi esprimenti uno shRNA

Le cellule HeLa TK1⁻ sono state trasfettate con diversi plasmidi (OriGene) esprimenti uno shRNA per ottenere un silenziamento stabile del gene *slc25a33*. I plasmidi utilizzati sono di tipo pRS (Retroviral Silencing plasmid) contenenti sequenze retrovirali murine LTR (Long Terminal Repeats), il gene per la resistenza all'antibiotico puromicina ed il promotore U6 che controlla l'espressione dello shRNA (Fig.1).

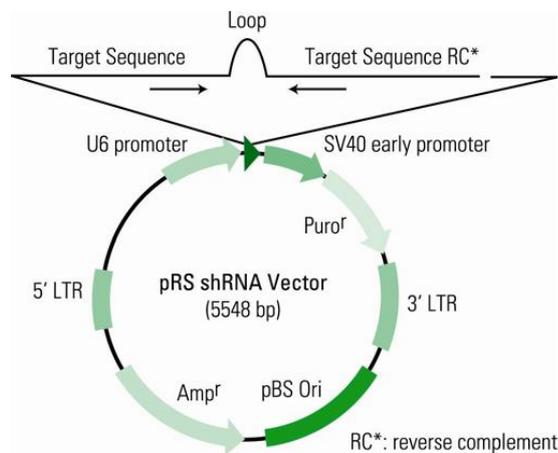


Fig.1 Mappa del plasmide pRS esprimente lo *short hairpin RNA*.

La porzione che esprimerà lo shRNA consiste in una sequenza gene specifica di 29 nucleotidi seguita da un loop di 7 nucleotidi ed un'altra sequenza di 29 nucleotidi complementare ed invertita; i quattro diversi plasmidi utilizzati per la trasfezione differiscono per questa sequenza gene specifica (Tab.1). Lo shRNA che viene prodotto dalla sequenza viene maturato ottenendo degli siRNA che andandosi ad appaiare alla sequenza complementare, inattivano l'espressione del gene *slc25a33* in modo stabile, in quanto il duplex ad RNA viene continuamente espresso dal sistema enzimatico cellulare.

Si sono ottenuti dei cloni di controllo, che non presentano silenziamento del gene di interesse, trasfettando le cellule con un plasmide vuoto denominato 20003, che codifica per una sequenza che non riconosce alcun gene.

Per selezionare i cloni che sono riusciti ad integrare il plasmide, viene aggiunta puromicina 1 µg/ml al terreno di coltura. Inoltre viene aggiunta uridina 50 µg/ml per evitare che eventuali danni mitocondriali dovuti al silenziamento interferiscano con la normale crescita cellulare.

shRNA ID	Sequenza costruito shRNA
481	AGACCAACATCCGTGACACCTGGACTCTT
482	ACCAGACCGAAGGCATTCGTGGCTTCTAT
483	GGCTCTAAGCAGATGAATACACTCCAGTG
484	CCTCCTGCATTGCTTATCCACACGAAGTC

Tab.1 Sequenze dei costrutti per il silenziamento del gene *slc25a33*.

2.5.1 Preparazione del DNA plasmidico

A partire da una coltura batterica trasformata con il plasmide di interesse, è possibile ottenere la quantità di DNA plasmidico sufficiente per la trasfezione. Si è utilizzato un kit di estrazione endotoxin-free (EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qiagen) per avere dei plasmidi privi di endotossine batteriche data la necessità di servirsi del DNA purificato per la trasfezione di cellule eucariotiche. Il protocollo di purificazione si basa su una procedura modificata di lisi alcalina, seguita dal legame del DNA plasmidico ad una colonna contenente una resina a scambio anionico ad opportune condizioni di pH e concentrazione salina.

Si procede preparando delle piastre Petri con terreno LB Agar contenente ampicillina 100 µg/ml per permettere la selezione dei batteri esprimenti il costrutto, sulle quali vengono seminati i batteri prelevando con un'ansa sterile la coltura batterica. Si lasciano crescere i batteri in incubatore a 37 °C ed il giorno successivo si trasferisce una singola colonia in 5 ml di terreno LB liquido

contenente ampicillina. Una volta posta la coltura batterica in agitazione a 37 °C per tutta la notte, la si diluisce di 1:500 in 250 ml di terreno LB liquido e si pone in beute in agitazione a 37 °C per tutta la notte.

Per ottenere una maxi-prep si devono innanzitutto raccogliere i batteri centrifugando la coltura batterica a 5000 g per 15 minuti a 4 °C, risospendere il pellet di cellule batteriche in un buffer fornito dal kit ed aggiungere il buffer di lisi, lasciandolo agire per cinque minuti dopo aver mescolato per inversione.

Si ottiene un lisato viscoso al quale si aggiunge un buffer che permette di bloccare il processo di lisi; è possibile ora notare la formazione di un precipitato bianco dato da DNA genomico, proteine e membrane cellulari. Dopo una centrifugata di 20 min a 15000 g si trasferisce il surnatante in falcon dove si aggiunge un buffer endotoxin-free mescolando per inversione per 10 volte e si incuba in ghiaccio per 30 minuti durante i quali il lisato da torbido diventerà trasparente.

Vengono preparate nel frattempo le colonnine per filtrare il lisato con 10 ml di buffer necessario ad equilibrare la colonna che si lascia eluire per gravità. Trascorsa l'incubazione in ghiaccio, si trasferisce il lisato nella colonnina equilibrata ed una volta ottenuto l'eluato la colonna viene lavata con un buffer per rimuovere la maggior parte dei contaminanti derivati della preparazione plasmidica. Si eluisce il DNA plasmidico con 15 ml di buffer fornito dal kit e lo si raccoglie in un tubo da centrifuga.

Per precipitare il DNA si aggiunge isopropanolo a temperatura ambiente e successivamente si centrifuga a 15000 g per 30 minuti a 4 °C. Tolto il surnatante, il pellet in isopropanolo viene lavato con 5 ml di etanolo 70% e centrifugato a 15000 g per 10 minuti. Si lascia asciugare il pellet di DNA plasmidico che verrà poi sciolto in 500 µl di acqua sterile, scaldato per 30 minuti a 37 °C e quantificato allo spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific). È possibile quindi conservare il plasmide a -20 °C.

2.5.2 Curva di dosaggio della puromicina

Al fine di rilevare la dose di puromicina necessaria a mantenere in selezione le cellule che hanno incorporato il plasmide, sono state testate diverse concentrazioni di puromicina (0.1 - 0.25 - 0.5 - 0.75 - 1 - 1.25 - 1.5 - 2 - 2.5 - 3 - 3.5 µg/ml) ed è stata scelta la dose che, dopo sette giorni, portava a morte dell'intera coltura cellulare. Per ciascuna linea cellulare si sono seminate le cellule in due piastre da 12 pozzetti: per la linea HeLa si sono seminate 10000 cellule per pozzetto in una piastra e nell'altra 20000 cellule; per la linea HeLa TK1⁻ 20000 e 30000 rispettivamente. Il giorno successivo alla semina è stata aggiunta

puromicina alle dosi sopra indicate e dopo sette giorni la dose ottimale è risultata 1 µg/ml.

2.5.3 Trasfezione di cellule HeLa TK1⁻ con diversi costrutti tramite Lipofectamine 2000

La trasfezione delle cellule HeLa TK1⁻ viene effettuata su una coltura cellulare al 90% di confluenza, che si raggiunge seminando le cellule in piastre Petri di 3.5 cm di diametro alla densità di 250000 cellule il giorno prima della trasfezione. Per ottimizzare l'efficienza del processo è necessario determinare la corretta quantità di DNA e lipofectamine da utilizzare in relazione allo specifico tipo cellulare da trasfettare; in questo caso si sono utilizzati 3.5 µg di DNA e 3 µl di Lipofectamine 2000 (Invitrogen) che verranno addizionati a terreno arricchito Opti-MEM (Gibco).

Si preparano quindi due soluzioni: la soluzione 1 contenente 3.5 µg di DNA plasmidico e terreno Opti-MEM e la soluzione 2 costituita da 3 µl di lipofectamine e terreno Opti-MEM. Queste due soluzioni si lasciano 5 minuti a temperatura ambiente e quindi le si riunisce in un unico tubo, mescolandole delicatamente, e vanno incubate 20 minuti a temperatura ambiente durante i quali il DNA viene complessato dalle lipofectamine. Si sostituisce quindi il terreno con terreno senza antibiotici per evitare che vi sia interferenza con la trasfezione e si aggiunge la soluzione trasfettante sulla piastra goccia a goccia distribuendola su tutto il monostrato cellulare. Le piastre vengono poste in incubatore a 37 °C per 6 ore e successivamente si rimuove il terreno sostituendolo con del terreno fresco per evitare effetti di tossicità cellulare dovuti alla permanenza delle lipofectamine in coltura.

2.5.4 Diluizioni clonali di HeLa TK1⁻ trasfettate con i plasmidi OriGene

Per avere singoli cloni, le colture policlonali ottenute dalla trasfezione con i quattro diversi costrutti più il plasmide di controllo sono state seminate a bassa densità quali 200, 500, 1000 e 2000 cellule in piastre Petri da 10 cm di diametro, permettendo così che una singola cellula trasfettata dia origine a un clone di cellule identiche tra loro. I singoli cloni sono stati raccolti e passati in piastre da 24 pozzetti, successivamente in piastre Petri da 3.5 cm di diametro ed infine suddivisi in piastre da 3.5 cm di diametro dalle quali estrarre l'RNA e piastre da 5 cm di diametro per espandere le singole popolazioni.

2.6 Silenziamento genico transiente di *slc25a33* per mezzo di siRNA

Utilizzando gli siRNA è possibile silenziare in modo transiente il gene *slc25a33*. Nelle linee cellulari HeLa ed HeLa TK1⁻ si sono testate tre diverse sequenze di siRNA in grado di riconoscere l'mRNA del trasportatore, ciascuna alle concentrazioni finali di 1 nM e 5 nM (Tab.2); come controllo si è utilizzata una sequenza di siRNA che non riconosce alcun gene.

siRNA	Sequenza senso	Sequenza antisense
6	GAGUUGCACCAUCAAGGGCUGUAUA	UAUACAGCCCUUGAUGGUGCAACUC
7	CCUAAACAGCAAUAUUGUGCAUAUUU	AAAU AUGCACAAUAUUGCUGUUAGG
8	ACACUCCAGUGUCUCGUUACGUUU	AAACGUAACGAGCACACUGGAGUGU

Tab.2 Sequenze degli siRNA per il silenziamento del gene *slc25a33*.

Il giorno prima della trasfezione si sono seminate 150000 cellule per la linea HeLa e 225000 cellule per la linea HeLa TK1⁻ in piastre Petri da 3.5 cm di diametro in modo che il giorno della trasfezione si trovino al 90% di confluenza. La trasfezione prevede che si preparino due soluzioni aventi ciascuna un volume pari al 10% del volume finale di terreno, una contenente gli siRNA diluiti in un buffer di annealing e terreno Opti-MEM e l'altra contenente 2.5 µl dell'agente trasfettante Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) e terreno Opti-MEM. I due tubini verranno poi uniti, mescolati delicatamente ed incubati a temperatura ambiente per 20 minuti. Si sostituisce quindi il terreno di coltura delle piastre con 2 ml di terreno privo di antibiotici e si trasfettano le cellule depositando goccia a goccia i 500 µl di soluzione, per un volume totale di 2.5 ml. Per evitare effetti di tossicità dovuti all'agente trasfettante, si è effettuato l'esperimento sia mantenendo delle piastre per 48 ore in presenza degli siRNA, sia andando a sostituire il terreno con terreno fresco dopo 15 ore dalla trasfezione.

2.7 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e Real Time PCR

Per valutare il livello di silenziamento ottenuto per il gene *slc25a33* si rileva il grado di espressione del gene mediante Real Time PCR.

Si è estratto l'RNA prima dalle colture policlonali e successivamente dai cloni derivati dalla coltura policlonale avente il grado più elevato di silenziamento. Le cellule cresciute in una piastra Petri di 3.5 cm di diametro vengono lisate con il

reagente TRIzol (Gibco), una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato che mantiene integro l'RNA. Si aggiunge quindi cloroformio, si agita vigorosamente per 15 secondi e si centrifuga in modo da ottenere una soluzione trifasica costituita da una fase acquosa incolore contenente l'RNA, una interfase bianca che costituisce la frazione proteica ed un pellet di fase organica rossa (fenolo-cloroformio). Per recuperare l'RNA si trasferisce la fase acquosa in un nuovo tubo, si aggiunge isopropanolo, che ne permette la precipitazione, e si effettua un lavaggio con etanolo al 75%. L'RNA viene sciolto in acqua e quindi portato a 56 °C per 10 minuti prima di essere quantificato al Nanodrop e conservato a -80 °C. Prima di procedere, si è verificato il grado di purezza e l'integrità caricandone 1 µg in un gel di agarosio all'1.5% dal quale si rilevano due bande, una corrispondente all'rRNA 18S e l'altra al 28S.

Si esegue quindi una retrotrascrizione per ottenere il cDNA a partire da 1 µg di RNA. Dei primer Random Hexamers (Applied Biosystems) e i dNTP 10 mM vengono incubati per 5 minuti a 65 °C servendosi di un termociclatore GeneAmp® PCR System 2700, si aggiungono quindi il tampone di reazione 5X ed un inibitore di RNasi (Applied Biosystems) e si incuba la soluzione 2 minuti a 25 °C. Successivamente si aggiunge l'enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) diluito 1:2 in un buffer 1X e si procede alla retrotrascrizione che avviene nel termociclatore con i seguenti passaggi: 10 minuti a 25 °C, 60 minuti a 42 °C e 15 minuti a 70 °C. Il cDNA che si ottiene viene portato alla concentrazione finale di 100 ng/µl in acqua Gibco e lo si conserva a -20 °C. Si verifica quindi la purezza del cDNA e che la reazione sia avvenuta, effettuando una PCR di prova con 30 ng di cDNA utilizzando primer che amplificano il cDNA della β-actina (Tab.3). Si prepara una mix costituita dai primer della β-actina, un buffer 10X, i dNTP e l'enzima termostabile Taq polimerasi 5000 U/ml (Amersham Biosciences) che verrà aggiunta al campione di cDNA 10 ng/µl; utilizzando il termociclatore si ripeteranno per 40 cicli le fasi di denaturazione del DNA, allineamento dei primer ed estensione. Si va quindi a controllare che il cDNA sia stato amplificato verificando la presenza di una banda in un gel di agarosio all'1%, corrispondente alla β-actina.

Gene	Primer forward	Primer reverse
<i>β-actina</i>	GCGGGAAATCGTGCGTGACATT	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGT
<i>hmbs</i>	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC
<i>slc25a33</i>	ATGGCATTTCGTGCCTAAC	TCTAGCTGCATTCCGGGTTTT

Tab.3 Sequenze dei primer utilizzati per PCR e RT-PCR.

Si determina ora il livello di mRNA residuo del gene *slc25a33*, bersaglio del silenziamento mediato dagli shRNA, mediante RT-PCR relativa analizzando ciascun campione con diverse quantità di cDNA in triplice copia per assicurare che venga mantenuta la stessa efficienza di amplificazione (cioè 2). La quantità di cDNA che si analizza è 8 ng e si utilizza una piastra da 96 pozzetti nei quali verrà aggiunta, oltre al campione di cDNA 4 ng/μl, una miscela di reazione Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), acqua ed i primer specifici per il gene di interesse ad una concentrazione 0.2 μM. Va ricordato che per ciascun campione, oltre ad effettuare un'analisi in triplice copia, si utilizzano i primer per il gene di interesse e una coppia di primer di un gene *housekeeping* scelto per normalizzare i valori che si ottengono dall'analisi. In questo caso è stato impiegato il gene codificante la idrossimetilbilanosintasi (*hmbs*) (Tab.3; Vandesompele et al., 2002). La piastra da 96 pozzetti viene caricata nel dispositivo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem) con un ciclo così definito: 10 minuti 95 °C, 25 s a 95 °C per 37 cicli, 1 minuto a 60 °C, 3 minuti a 72 °C, 15 s a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 15 s a 95 °C. I dati ottenuti vengono memorizzati tramite il 7500 System SDS Software.

Si devono ora analizzare le curve di amplificazione e fissare la soglia di fluorescenza nell'intervallo di linearità per realizzare un grafico che rappresenta la dipendenza dei CT (*Cycle Threshold*, soglia) dal logaritmo in base dieci della quantità di cDNA impiegata per ottenere il coefficiente angolare (m); questo coefficiente verrà calcolato per ciascun campione e viene utilizzato per calcolare l'efficienza di reazione data dalla formula $E=10^{-1/m}$ che corrisponderà ad un valore vicino a 2. Vengono quindi analizzati i dati usando il modello matematico suggerito da Pfaffl per la quantificazione relativa (Pfaffl, 2001) servendosi della formula:

$$R = \frac{E_{target}^{\Delta CT_{target}(ctrl-campione)}}{E_{rif}^{\Delta CT_{rif}(ctrl-campione)}}$$

Dove R indica il rapporto di espressione relativo, E l'efficienza di amplificazione (pari a 2), CT è il ciclo a cui la fluorescenza cresce in maniera apprezzabile al di sopra del background, con ΔCT_{target} si indica la deviazione nel ciclo soglia del gene target tra controllo e campione mentre con ΔCT_{rif} ci si riferisce alla deviazione nel ciclo soglia del gene di riferimento tra controllo e campione. Applicando il modello matematico di Pfaffl il livello residuo di mRNA di ciascun gene di interesse nelle cellule silenziate viene calcolato in relazione a quello osservato nelle cellule di controllo, ottenendo la percentuale di trascritto residuo.

2.8 Estratti proteici totali

A partire da un coltura cellulare in piastra Petri da 10 cm di diametro, si prepara un estratto proteico totale che verrà poi quantificato utilizzando la colorazione di Bradford. Dopo aver tolto il terreno, si effettuano 3 lavaggi con NaCl 0.9% tiepido e si lisano le cellule aggiungendo 200-300 μ l (a seconda della densità cellulare) di buffer di lisi 1X composto dai seguenti reagenti: Tris HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 0.2 M, Triton X 0.5%, un inibitore di proteasi (Roche), EDTA 2 mM, DTT 1 mM. Si staccano le cellule servendosi di una spatola, successivamente si trasferisce il lisato in una eppendorf e si vortica per 50 s per rompere le membrane cellulari. Viene quindi aggiunto NaCl 0.2 M e si vortica per 15 s per facilitare l'entrata in soluzione dell'estratto cellulare. Si centrifuga il campione a 19000 g per 10 minuti a 4 °C e si trasferisce il surnatante contenente l'estratto proteico in una nuova eppendorf che verrà conservata a -80 °C.

2.9 Quantificazione proteica in estratti proteici totali con il metodo colorimetrico di Bradford

La concentrazione proteica in estratti cellulari viene misurata con il saggio colorimetrico di Bradford, dove si utilizza un colorante che, legandosi agli anelli degli amminoacidi aromatici, vira il colore, il che permette di ricavare la concentrazione proteica dalla lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Si preparano dei tubini contenenti 200 μ l totali di estratto proteico diluito in acqua ai quali vanno aggiunti 800 μ l di colorante di Bradford diluito 1:3 con acqua. Generalmente si preparano almeno tre diverse aliquote a diverse concentrazioni di campione, quindi si lascia avvenire la reazione colorimetrica per 5 minuti a temperatura ambiente e si effettuano le tre letture allo spettrofotometro; la lettura a 595 nm deve essere effettuata entro 10 minuti dall'inizio della reazione colorimetrica. Ottenuto il valore di assorbanza si risolve l'equazione della retta di taratura precedentemente costruita con quantità note di albumina di siero bovino (BSA) ricavando la concentrazione proteica in μ g/ μ l.

2.10 Saggio dell'attività timidina chinasi (TK1)

Si è eseguito il saggio dell'attività timidina chinasi nelle linee cellulari HeLa ed HeLa TK1⁻ per rilevare l'attività dell'enzima timidina chinasi 1 citosolica. Come substrato viene utilizzato il nucleoside marcato isotopicamente ³H-TdR (Perkin-Elmer) ad attività specifica 1070 cpm/pmole che si trova alla concentrazione 2 μM in una mix di reazione 2X composta da 100 mM TrisHCl pH 7.5, 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 10 mM NaF e 4 mM DTT. A 20 μl di mix di reazione 2X, vanno aggiunti 20 μl dell'estratto proteico in analisi diluito in un tampone di diluizione 2X (1mg/ml BSA, 10 mM TrisHCl pH 7.5, 2 mM DTT, 5 mM ATP); v'è ricordato che si prepara un background, che servirà per il calcolo dell'attività specifica dell'enzima, costituito da un campione che non contiene estratti proteici più la mix di reazione 2X.

La reazione avviene in un volume totale di 40 μl con quantità variabili di proteine in base alla linea cellulare da cui è stato preparato l'estratto. Si incubano i campioni a 37 °C per 20 minuti e successivamente si bollono un minuto per bloccare la reazione e si trasferiscono in ghiaccio. Si depositano 30 μl di volume totale su filtri DE81(Whatman) che legano i composti carichi negativamente, ed una volta asciutti vengono lavati tre volte per 5 minuti in ammonio formato 5 mM. Si trasferiscono i filtri in un tubino per scintillatore con 2 ml di HCl 0.1 M ed NaCl 0.2 M tenendoli in agitazione per almeno 30 minuti. Si aggiungono 14 ml di liquido di scintillazione per fluidi Ready Safe (Beckman Coulter) e la radioattività rilasciata in soluzione viene misurata dallo scintillatore TriCarb 2800 TR (Perkin-Elmer) che fornisce i valori di conte per minuto (cpm).

Dalla radioattività misurata e dalla radioattività specifica della timidina presente nella miscela di reazione si ottengono i valori di attività specifica dell'enzima espressi in pmoli di prodotto/min/mg.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per lo studio dei trasportatori proteici di membrana va tenuto conto che le proteine transmembrana hanno un turnover lento e sono generalmente presenti in quantità molto piccole nelle cellule. Infatti anche disponendo di anticorpi non è di solito possibile rilevare le proteine endogene al loro normale livello di espressione. Allo scopo di studiare il trasportatore SLC25A33 che si trova nella membrana interna mitocondriale, è utile rilevarne il grado di espressione ma data la scarsa sensibilità degli anticorpi ci si deve limitare all'analisi dell'mRNA.

La proteina mitocondriale SLC25A33 dimostra omologia con il trasportatore di nucleotidi pirimidinici di lievito Rim2p e saggi di trasporto *in vitro*, ricostituendo la proteina in liposomi, hanno indicato che è responsabile del trasporto di UTP (Floyd et al., 2007). Dato che è presente in bassa quantità sulla membrana mitocondriale, un silenziamento del trasportatore dovrebbe avere un impatto maggiore rispetto alla sua sovraespressione. L'ipotesi è supportata dal fatto che un mutante Rim2p di lievito mostra un fenotipo *petite* in terreno completo (Van Dyck et al., 1995).

In esperimenti condotti in precedenza con cellule OST TK1⁻ il gene *slc25a33* è stato silenziato utilizzando quattro plasmidi esprimenti shRNA, tra i quali uno ha dimostrato un grado di silenziamento elevato. Ora ci siamo proposti di inattivare l'espressione del gene utilizzando nuove sequenze bersaglio e confrontare l'efficacia del silenziamento in diverse linee cellulari.

Gli esperimenti da me svolti in questa tesi avevano lo scopo di caratterizzare funzionalmente SLC25A33 inattivando l'espressione della sequenza genica in cellule HeLa ed HeLa TK1⁻ mediante *RNA interference*. Per valutare il grado di silenziamento si è confrontato il contenuto di RNA messaggero nelle cellule silenziate con quelle di controllo.

3.1 Analisi dell'espressione del trasportatore SLC25A33 in linee cellulari trasformate

L'alterata proliferazione è una caratteristica tipica di cellule tumorali e richiede un maggiore apporto di energia rispetto alle condizioni normali. E' prevedibile quindi che in linee cellulari trasformate i trasportatori di membrana necessari al trasferimento di cofattori, metaboliti e nucleotidi siano più espressi per le maggiori funzioni che una cellula in attiva divisione deve svolgere. Lo studio di Floyd e collaboratori (Floyd et al., 2007) riporta che l'espressione del trasportatore SLC25A33 è maggiore in linee cellulari trasformate rispetto a cellule normali.

Per prima cosa quindi ho controllato l'espressione di SLC25A33 nelle linee cellulari trasformate HeLa, HeLa TK1⁻, 293 e OST TK1⁻ rispetto a una linea di fibroblasti umani normali (C63). In tutti i casi ho usato colture in fase di attiva proliferazione, estraendo l'RNA totale il giorno successivo alla semina. Per misurare il livello di mRNA di *slc25a33* si è effettuata una RT-PCR su cDNA ottenuto mediante retrotrascrizione dell'RNA estratto da ciascuna linea cellulare. Come controllo ho utilizzato il livello di mRNA di *slc25a33* nei fibroblasti proliferanti C63. I valori relativi di mRNA sono riportati come percentuale, assumendo che l'espressione di *slc25a33* sia pari al 100% nella linea C63 (Fig.1). La RT-PCR è stata eseguita esaminando ciascun campione in triplice copia con i primer per *slc25a33* e con una coppia di primer per il gene *housekeeping hmbs* usato come gene di riferimento per normalizzare i valori che si ottengono dall'analisi.

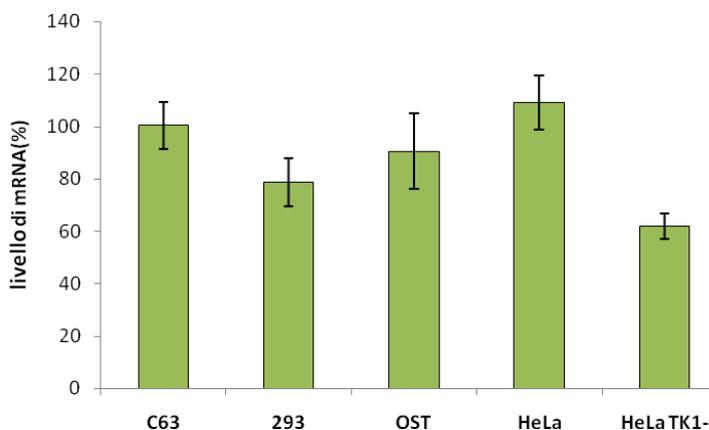


Fig.1 Espressione relativa di *slc25a33* in diverse linee cellulari rispetto a fibroblasti C63 proliferanti. La barra di errore indica i valori di deviazione standard ottenuti dal confronto con la linea cellulare di controllo C63 in due analisi di RT-PCR.

L'istogramma riportato in Fig.1 è il risultato delle medie tra due analisi di RT-PCR in cui ogni campione è stato esaminato in triplice copia. Il gene sembra espresso in maniera simile in cellule OST, 293 ed HeLa mentre è meno espresso nelle cellule HeLa TK1⁻. In ogni caso non ho osservato una maggiore espressione nelle cellule trasformate rispetto ai fibroblasti normali.

3.2 Caratterizzazione delle linee cellulari HeLa ed HeLa TK1⁻

Le linee cellulari trasformate HeLa ed HeLa TK1⁻ erano state acquisite di recente nel laboratorio ed era necessario caratterizzarle. La scelta di utilizzare una linea mancante dell'enzima TK1 è dovuta al fatto che si vogliono confrontare precedenti esperimenti svolti sullo studio di SLC25A33 nella linea cellulare OST TK1⁻. Prima di eseguire gli esperimenti di *RNA interference* ho analizzato le caratteristiche di crescita delle linee cellulari che avrei utilizzato per isolare cloni silenziati per *slc25a33*.

Per prima cosa si è controllata l'attività dell'enzima TK1 in entrambe le linee cellulari. La timidina chinasi 1 citosolica è un enzima chiave per la sintesi del dTTP nelle cellule eucariotiche. A differenza della timidina chinasi mitocondriale, la TK1 è attiva solamente nella fase S del ciclo cellulare e fosforila timidina e deossitimidina nelle forme monofosfato.

Il saggio che permette di rilevare l'attività dell'enzima in pmoli/min/mg di proteina, consiste nel fornire un substrato marcato radioattivamente a estratti proteici provenienti dalle linee cellulari da analizzare. Per misurare l'attività dell'enzima TK1 si utilizza come substrato timidina triziata (ad attività specifica nota) che viene aggiunta agli estratti proteici cellulari di HeLa, HeLa TK1⁻ e fibroblasti C63 proliferanti. Dal saggio si rileverà la radioattività del dTMP prodotto dall'enzima e in base a questa, tenendo conto della radioattività specifica della timidina usata, sarà possibile risalire alla quantità assoluta, espressa in pmoli, del nucleotide prodotto. Come controllo positivo si sono utilizzati gli estratti proteici di fibroblasti C63 proliferanti, perché in cellule in attiva crescita l'attività di TK1 è molto elevata per consentire l'adeguata sintesi dei precursori nel citosol.

Negli estratti di cellule HeLa TK1⁻, dove la TK1 non è attiva, ci si aspetta che la fosforilazione della timidina triziata sia dovuta alla sola TK2 mitocondriale che nelle cellule presenta un'attività specifica inferiore rispetto alla TK1 per i substrati comuni ai due enzimi.

Nelle tre linee HeLa, HeLa TK1⁻ e C63 si è rilevata un'attività specifica dell'enzima rispettivamente di 90 - 1.6 e 118 pmoli/min/mg di proteina. Ciò conferma che nella linea cellulare HeLa TK1⁻ l'attività timidina chinasi è molto bassa. Infatti la capacità di fosforilazione del substrato timidina a dTMP differisce tra una linea cellulare in cui sono presenti sia l'enzima TK1 che TK2 rispetto a cellule in cui è presente solo l'enzima TK2 nei mitocondri.

Successivamente ho svolto un'analisi della crescita delle due linee di cellule HeLa sia per avere una caratterizzazione più completa di queste due linee cellulari, sia per poterle confrontare la crescita prima e dopo il silenziamento del gene del trasportatore *slc25a33*. Per ciascuna linea si sono seminate 150000 cellule in piastre Petri da 5 cm di diametro e nei successivi cinque giorni di coltura è stata seguita la crescita e sono state misurate al citofluorimetro, per ogni giorno, le percentuali di fase G1, S e G2 del ciclo cellulare.

Le curve di crescita mostrano un andamento sovrapponibile e si nota una lieve differenza solamente durante la fase stazionaria, che per la linea HeLa viene raggiunta con un piccolo anticipo (Fig.2).

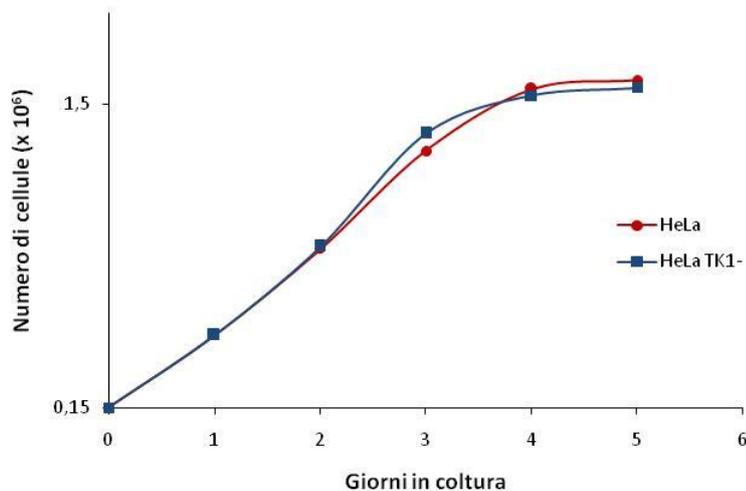


Fig.2 Curva di crescita delle linee cellulari HeLa ed HeLa TK1⁻.

L'analisi citofluorimetrica (Fig.3) mostra come al giorno 1 sia presente la più elevata percentuale di cellule in fase S e G2, che porta ad un rapido incremento del numero di cellule il giorno successivo (Fig.2). Per la linea HeLa, al passare del tempo si osserva una progressiva diminuzione di questi valori e un graduale aumento della percentuale di cellule in G1. Per la linea HeLa TK1⁻ la diminuzione della fase S con il passare dei giorni in coltura è meno pronunciata.

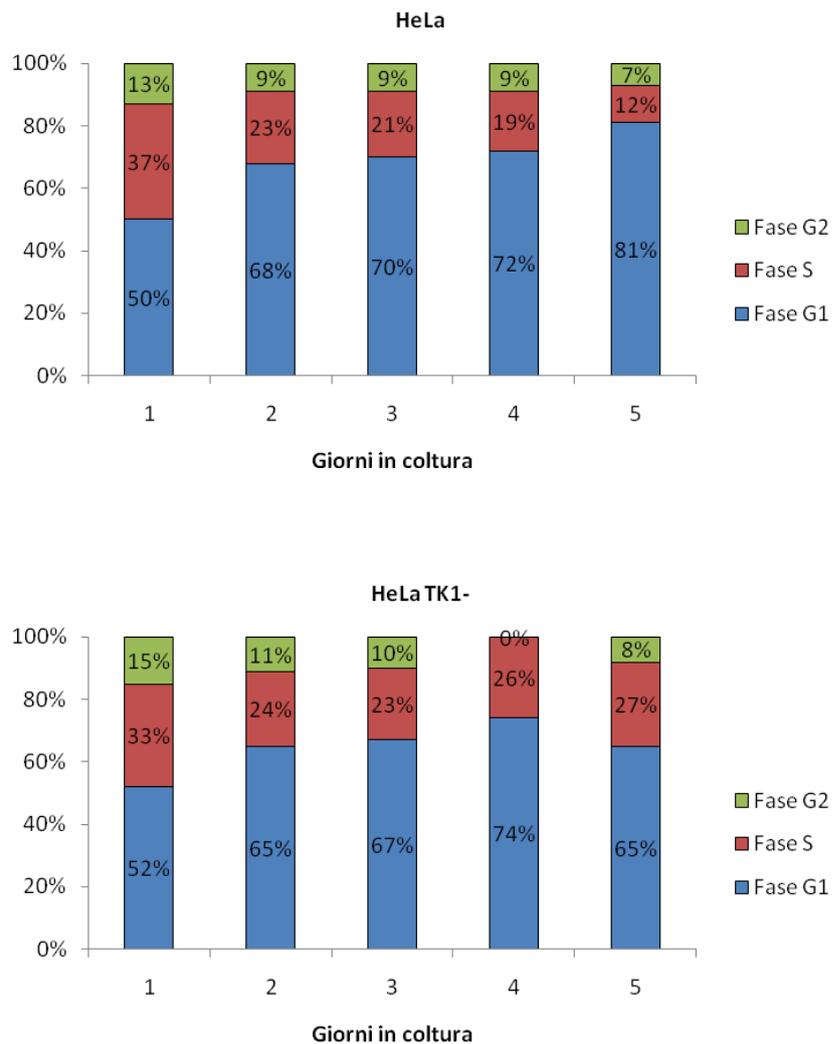


Fig.3 Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in colture proliferanti di cellule della linea HeLa e HeLa TK1⁻.

Poiché le cellule da silenziare in modo costitutivo dovevano essere trasfettate con un plasmide contenente il gene per la resistenza alla puromicina, ho saggiato diverse dosi dell'antibiotico (curva di dosaggio) sulle colture cellulari. Per selezionare le cellule che hanno incorporato il vettore per il silenziamento di *slc25a33* nel genoma, è necessario aggiungere al terreno di coltura l'antibiotico ad una dose che sia sufficientemente tossica da eliminare le cellule che non esprimono la resistenza e allo stesso tempo mantenga in vita i cloni che la esprimono. Dopo aver seminato in piastre da dodici pozzetti cellule non trasfettate delle due linee cellulari, ho aggiunto la puromicina a diverse dosi, da 0.1 a 3.5 µg/ml, e ho scelto quella minima che porta a morte tutte le cellule presenti nel

pozzetto. La dose ottimale è di 1 µg/ml di puromicina da aggiungere al terreno di coltura dopo la trasfezione.

3.3 Silenziamento del gene *slc25a33* in cellule HeLa ed HeLa TK1⁻

Ho utilizzato due strategie di trasfezione con lipofectamine per ottenere tramite *RNA interference* una diminuzione dei livelli di proteina SLC25A33. Un primo metodo consiste in un silenziamento stabile con vettori che esprimono uno shRNA; nel secondo si sono impiegati degli siRNA sintetizzati *in vitro*.

3.3.1 Silenziamento stabile con plasmidi esprimenti shRNA in cellule HeLa TK1⁻

Il silenziamento stabile del gene *slc25a33* avviene introducendo nella cellula un plasmide codificante uno shRNA. Il silenziamento sarà costitutivo perché una volta che il plasmide è stato incorporato nel genoma cellulare, verrà espresso sotto il controllo di un promotore sempre attivo.

I vettori utilizzati contengono il gene per la resistenza all'antibiotico puromicina e una sequenza gene-specifica di 29 nucleotidi ripetuta e invertita che, una volta trascritta in RNA, forma una struttura a forcina denominata shRNA. Gli shRNA vengono processati dal sistema enzimatico cellulare e maturati a siRNA; questi si appaiano alla sequenza bersaglio che viene di conseguenza degradata.

Una volta trasfettate le cellule con il plasmide, il DNA verrà mantenuto nel citoplasma da molte cellule per un periodo di tempo limitato, in genere 2-3 giorni (trasfezione transiente) mentre, in pochi casi, passerà al nucleo e verrà integrato nel genoma cellulare (trasfezione stabile). L'isolamento delle cellule che hanno subito l'integrazione richiede un gene marcatore presente nel DNA esogeno (nel nostro caso la resistenza alla puromicina), che consente alle cellule trasformate di crescere in un terreno selettivo.

Per trasfettare le cellule HeLa ed HeLa TK1⁻ ho utilizzato quattro diversi plasmidi, ciascuno codificante per una diversa sequenza di siRNA in grado di appaiarsi a una regione distinta del trascritto di *slc25a33*. In questo modo si potrà scegliere il plasmide con la sequenza di siRNA più efficiente, che consente cioè il grado più elevato di silenziamento.

Prima di procedere è necessario avere una quantità sufficiente di DNA plasmidico per la trasfezione. Ho preparato la quantità di DNA adeguata estraendola da colture di ceppi batterici trasformati coi singoli plasmidi di interesse (Tab.1).

Il plasmide denominato 20003 serve da controllo, infatti esso esprime uno shRNA che non silenzia alcun gene.

Plasmide	Quantificazione in ng/ μ l
481	895
482	1160
483	1094
484	1628
20003	1719

Tab.1 Quantificazione del DNA dei plasmidi 481, 482, 483, 484 e del plasmide di controllo 20003 presente nelle preparazioni maxi-prep.

Le dosi di lipofectamine per trasfettare le cellule HeLa e HeLa TK1⁻ sono state scelte seguendo quelle indicate dal protocollo di trasfezione consigliato dal produttore in relazione allo specifico tipo cellulare e alle dimensioni del recipiente di coltura. La dose di DNA plasmidico (3.5 μ g) è stata scelta in base ai precedenti esperimenti con le cellule OST TK1⁻ mentre per le lipofectamine si è testata la dose di 9 μ l per entrambe le linee cellulari mantenendole per 48 ore in coltura.

Le prove sono state condotte seminando le cellule in piastre Petri da 3.5 cm di diametro con 1.5 ml di terreno di coltura, ai quali verranno aggiunti 500 μ l di soluzione trasfettante. Si sono utilizzati 3.5 μ g di DNA plasmidico per ciascuno dei quattro diversi plasmidi più il plasmide di controllo. Dopo 48 ore dalla trasfezione poche cellule sono sopravvissute, probabilmente a causa della tossicità prodotta all'agente trasfettante. Evidentemente le cellule HeLa sono più sensibili alle lipofectamine delle cellule OST TK1⁻ usate in precedenza, dove queste condizioni non producevano tossicità.

Quindi si è deciso di effettuare delle prove di trasfezione utilizzando due diverse metodologie per scegliere quella più adatta alla linea cellulare HeLa. La prima strategia consiste nell'utilizzare lipofectamine come agente trasfettante mentre la seconda prevede la coprecipitazione del DNA con calcio fosfato.

Per valutare l'efficienza di trasfezione ho introdotto nelle cellule il plasmide pEGFP-N1 che contiene il gene della GFP (Green Fluorescent Protein). Poiché la GFP ha la peculiare caratteristica di assorbire la luce nel campo del blu ($\lambda=395$) ed emetterla nel campo del verde ($\lambda=509$), le cellule che esprimono la proteina appaiono di un colore verde fluorescente quando vengono irradiate dai raggi UV. Osservando al microscopio la fluorescenza emessa dalla GFP in cellule che hanno

incorporato il plasmide rispetto al totale di cellule nella piastra, mi permetterà di calcolare l'efficienza di trasfezione.

Il giorno successivo alla semina ho trasfettato le cellule HeLa in coltura in piastre Petri da 3.5 cm di diametro con 3.5 µg di DNA plasmidico contenente il gene della GFP, utilizzando lipofectamine o il metodo del calcio-fosfato. Per la trasfezione con lipofectamine ho saggiato le dosi 5 µl e 3 µl di agente trasfettante per piastra in un volume totale di 2 ml. Dopo 48 ore ho osservato al microscopio il numero di cellule fluorescenti rispetto al totale. Il rapporto tra cellule esprimenti la GFP e quelle non fluorescenti era maggiore per le cellule trasfettate con lipofectamine, quindi con questa metodica l'efficienza è maggiore e ho deciso di utilizzarla nei successivi esperimenti. La dose più bassa di agente trasfettante (3µl) permette alle cellule di sopravvivere quindi è la quantità indicata da utilizzare nelle successive prove.

Per evitare che questa dose di lipofectamine potesse comunque interferire con la sopravvivenza cellulare, ho cercato di ridurre il periodo di permanenza nel terreno di coltura. Quindi dopo 6 ore dalla trasfezione il terreno è stato sostituito con terreno fresco. Dopo tre giorni si è aggiunta puromicina alla coltura cellulare alla concentrazione 1 µg/ml in modo da selezionare le cellule che hanno incorporato il plasmide ed esprimono il gene per la resistenza all'antibiotico.

Le cellule ottenute dalla trasfezione con i quattro plasmidi per il silenziamento e con il plasmide di controllo sono state seminate in piastre Petri da 3.5 cm di diametro. Si è poi estratto l'RNA totale che viene retrotrascritto a cDNA ed è stata quindi eseguita una RT-PCR sul cDNA per controllare il livello di espressione del gene *slc25a33* in ciascuna coltura trasfettata. Per calcolare la percentuale di mRNA residuo nelle cellule trasfettate ho utilizzato come controllo la coltura policlonale trasfettata con il plasmide 20003.

Nella linea cellulare HeLa TK1⁻ si è osservato il grado di silenziamento più elevato nelle colture trasfettate con i plasmidi 482 e 483 (Tab.2) che esprimono sequenze shRNA che riconoscono due regioni distinte nel VI esone del gene *slc25a33*. Quindi si è ritenuto opportuno allestire subcolture solo di queste colture policlonali.

Per quanto riguarda la linea cellulare HeLa non si è ottenuto un buon silenziamento genico in quanto i livelli dell'mRNA di *slc25a33* misurati sono elevati, cioè il gene non è stato spento in misura soddisfacente con nessuno dei plasmidi provati (Tab.2). Pertanto per questa linea cellulare si è applicata una strategia alternativa di silenziamento transiente mediante siRNA, come verrà illustrato nei prossimi paragrafi.

Plasmide	HeLa TK1 ⁻	HeLa
481	98%	82%
482	46%	129%
483	45%	126%
484	84%	131%

Tab.2 Percentuale di mRNA del trasportatore *slc25a33* rilevata mediante RT-PCR.

Nel caso delle cellule HeLa TK1⁻ invece ho proceduto allestendo colture con diluizioni scalari dalle colture policlonali 482, 483 e 200003, seminando le cellule a densità molto basse in modo da poter isolare singoli cloni, e continuando a mantenerle in selezione con puromicina 1 µg/ml. Per ogni linea cellulare silenziata sono stati raccolti una serie di cloni (Tab.3) e di ognuno un'aliquota è stata congelata, mentre da una seconda aliquota è stato estratto l'RNA per l'analisi mediante RT-PCR.

Plasmide	Numero di cloni raccolti	Estrazione RNA totale	Analisi con RT-PCR
482	20	16	12
483	20	20	12
20003	12	12	4

Tab.3 Tabella che riassume il numero di cloni raccolti per le linee cellulari silenziata, i cloni dai quali si è isolato l'RNA totale e campioni sui quali è stata effettuata l'analisi di RT-PCR.

Per ottenere un controllo attendibile dell'espressione del gene in esame in cloni trasfettati con il plasmide vuoto 20003, il livello dell'mRNA è stato misurato in quattro cloni e quindi è stata calcolata la media delle determinazioni utilizzando controlli con valori soglia simili a quelli misurati nelle cellule HeLa TK1⁻ non trasfettate. Per questo motivo, tra i quattro controlli scelti, due sono stati scartati perché differivano troppo dalle cellule originali (C 1b e C 3).

Dalla quantificazione con RT-PCR, due cloni trasfettati con il plasmide 483, cioè 483-11 e 483-16 hanno rivelato il miglior grado di silenziamento, cioè 49% e 39% rispettivamente. Di questi cloni si è confrontata la crescita rispetto ai due controlli C 8 e C 13. Per cinque giorni si sono contate le cellule seminate in piastre Petri da 5 cm di diametro e si è analizzata la crescita. Le curve di crescita hanno dimostrato che tutte le colture cellulari crescono in modo simile.

Dato che al momento dell'isolamento le colture clonali erano piuttosto affollate, e la purezza dei cloni non era certa, si è deciso di subclonare i cloni 483-11 e 483-16 per ottenere colture cellulari con grado di silenziamento omogeneo e possibilmente più accentuato.

È importante notare che il silenziamento di grado più elevato è stato ottenuto con il plasmide 483, lo stesso che in precedenza si era dimostrato il più efficace nella linea OST TK1⁻. Ciò indica che la sequenza di siRNA espressa dal plasmide 483 ha come bersaglio una regione dell'mRNA di *slc25a33* che permette un efficiente spegnimento dell'espressione.

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio dimostrano che in cellule OST TK1⁻ il silenziamento del trasportatore influisce sullo scambio dei nucleotidi di uridina e timina. Dal confronto dei risultati che si otterranno con la linea HeLa TK1⁻ sarà possibile studiare gli effetti del silenziamento anche in questa linea cellulare ed eventualmente confermare lo scambio di nucleotidi mediato dal trasportatore.

3.3.2 Silenziamento transiente con siRNA di cellule HeLa e HeLa TK1⁻

Considerando che nella linea cellulare HeLa il silenziamento costitutivo di *slc25a33* non è stato soddisfacente, si è scelto di inattivare l'espressione del gene in modo transiente con siRNA mirati a sequenze bersaglio diverse da quella contro cui agisce il plasmide 483. Si è ritenuto opportuno testare il metodo anche nella linea HeLa TK1⁻ per verificare se è possibile arrivare a percentuali di silenziamento maggiori rispetto al silenziamento costitutivo.

A questo scopo le cellule HeLa ed HeLa TK1⁻ sono state trasfettate con tre diverse sequenze siRNA commerciali denominate 6, 7 e 8 specifici per *slc25a33* ed un siRNA di controllo che non si appaia ad alcun gene. Ciascun siRNA è stato saggiato alle due concentrazioni di 1 nM e 5 nM.

I tre siRNA introdotti nelle cellule per trasfezione sono molecole di RNA a doppio filamento di 25 bp. Interagendo con il complesso RISC, il filamento antisense partecipa al silenziamento del gene interferendo con la traduzione dell'mRNA.

Il gene umano *slc25a33* è localizzato nel cromosoma 1 (1p36.22) ed è costituito da 7 esoni. Gli siRNA 6, 7 e 8 si appaiano a tre diverse regioni dell'mRNA di *slc25a33* localizzate in tre diversi esoni (Tab.4) che a loro volta differiscono da quelle riconosciute dagli siRNA utilizzati per il silenziamento costitutivo (paragrafo 3.3.1).

siRNA	Sequenza antisense	Regione di appaiamento
6	UAUACAGCCCUUGAUGGUGCAACUC	giunzione III e IV esone
7	AAAUAUGCACAAUAUUGCUGUUAGG	IV esone
8	AAACGUAACGAGCACACUGGAGUGU	VI esone

Tab.4 Sequenza antisense degli siRNA e regione di appaiamento con il gene *slc25a33*.

Per evitare problemi di tossicità causati dalle lipofectamine che avrebbero potuto compromettere l'esperimento, si sono effettuate due prove di trasfezione: una mantenendo per 48 ore la miscela di trasfezione (complessi lipofectamine-siRNA) nel terreno di coltura e una seconda sostituendo il terreno dopo 15 ore. Il protocollo di trasfezione prevede un tempo di permanenza degli siRNA in coltura sufficientemente prolungato per diminuire i livelli di proteina tenendo conto che l'emivita delle proteine di membrana è lunga. Anche dopo le 48 ore le colture cellulari di entrambe le linee erano apparentemente in buone condizioni, senza mostrare tossicità dell'agente trasfettante. Quindi si è deciso di analizzare le colture cellulari mantenute per il periodo più prolungato in presenza di siRNA (48 ore). È stato estratto l'RNA totale che è stato retrotrascritto a cDNA e analizzato con RT-PCR.

Il silenziamento con siRNA è risultato efficace con la sequenza siRNA 7 alla concentrazione 5 nM in entrambe le linee cellulari (Fig.4). Infatti le percentuali di mRNA di *slc25a33* sono risultate del 19% per le cellule HeLa e del 22% per le cellule HeLa TK1⁻. Si nota che nella maggior parte dei casi una maggiore concentrazione di molecole di siRNA in soluzione porta a una percentuale di mRNA residuo più bassa; solo per il campione HeLaTK1⁻ siRNA 8 sembra che la concentrazione minore di siRNA porti a un maggiore silenziamento del gene, ma la validità del dato va verificata ripetendo la misurazione.

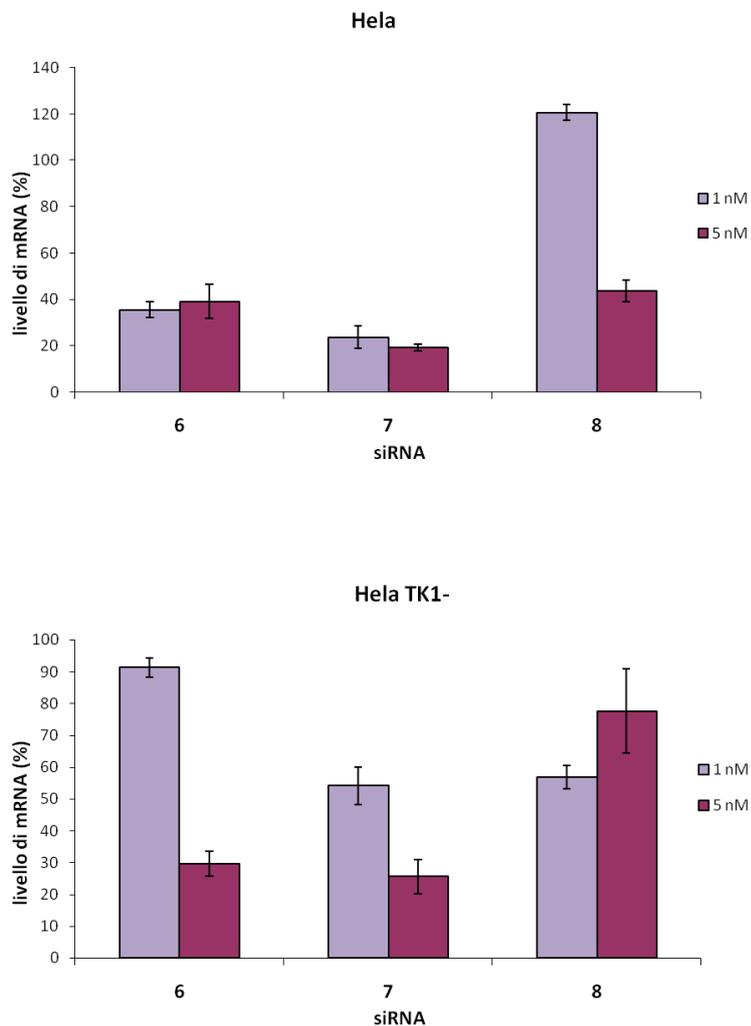


Fig.4 Livelli residui dell'mRNA di *slc25a33* quantificati mediante RT-PCR nelle linee cellulari HeLa ed HeLa TK1⁻ silenziate con tre sequenze siRNA (6, 7 e 8) alle due concentrazioni 1 nM e 5 nM. La barra di errore indica i valori di deviazione standard ottenuti dal confronto con i controlli.

In conclusione, con gli esperimenti di silenziamento effettuati utilizzando i quattro plasmidi si è riusciti ad ottenere un livello di mRNA residuo del 39% del gene *slc25a33* in cellule HeLa TK1⁻ ed è possibile che si osservino percentuali inferiori dal subclonaggio dei cloni 483-11 e 483-16. Ottimi livelli di silenziamento sono stati ottenuti in entrambe le linee cellulari dalla trasfezione transiente con siRNA sintetici.

CONCLUSIONI

Negli esperimenti svolti durante il mio tirocinio ho analizzato il grado di silenziamento, ottenuto mediante RNAi, del gene umano *slc25a33* in cellule HeLa ed HeLa TK1⁻. I livelli di mRNA rilevati con la tecnica RT-PCR hanno indicato che utilizzando plasmidi esprimenti uno shRNA si ottiene un buon spegnimento dell'espressione del gene, ma la percentuale di trascritto più bassa si raggiunge con un silenziamento transiente introducendo nelle cellule sequenze di siRNA sintetici. Paragonando i risultati ottenuti con queste linee cellulari rispetto a quelli della linea OST TK1⁻, si nota che la regione bersaglio degli siRNA che permette un buon silenziamento stabile è la stessa. Gli siRNA che consentono il maggiore abbassamento dei livelli di mRNA di *slc25a33*, potranno essere utilizzati per la caratterizzazione funzionale della proteina *in situ* in cellule umane.

Esperimenti futuri consisteranno in marcature isotopiche delle cellule silenziate con precursori radioattivi per studiare gli scambi di nucleotidi mediati da SLC25A33 attraverso la membrana mitocondriale interna. Se la proteina è coinvolta nel trasporto di uno o più nucleotidi, il suo silenziamento influenzerà la radioattività specifica nei compartimenti citosolico e mitocondriale dei dNTP coinvolti negli scambi rispetto alle condizioni normali.

BIBLIOGRAFIA

Bogenhagen D., Clayton D. A. **Thymidylate nucleotide supply for mitochondrial DNA synthesis in mouse L cells. Effect of 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate in thymidine kinase plus and thymidine kinase minus cells.**
J Biol Chem. 1976; 251 (10): 2938-44.

Bourdon A., Minai L., Serre V., Jais JP., Sarzi E., Aubert S., Chrétien D., de Lonlay P., Paquis-Flucklinger V., Arakawa H., Nakamura Y., Munnich A., Rötig A. **Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion.**
Nat Genet. 2007; 39 (6): 776-80.

Bridges E. G., Jiang Z., Cheng Y. **Characterization of a dCTP transport activity reconstituted from human mitochondria.**
J Biol Chem. 1999; 274 (8): 4620-5.

Dolce V., Fiermonte G., Runswick M. J., Palmieri F., Walker J. E. **The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals.**
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98 (5): 2284-8.

Elpeleg O., Mandel H., Saada A. **Depletion of the other genome-mitochondrial DNA depletion syndromes in humans.**
J Mol Med. 2002; 80 (7): 389-96.

Ferraro P., Nicolosi L., Bernardi P., Reichard P., Bianchi V. **Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate.**
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103 (49): 18586-91.

Ferraro P., Pontarin G., Crocco L., Fabris S., Reichard P., Bianchi V. **Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE).**
J Biol Chem. 2005; 280 (26): 24472-80.

Floyd S., Favre C., Lasorsa F. M., Leahy M., Trigiant G., Stroebel P., Marx A., Loughran G., O'Callaghan K., Marobbio C. M. T., Slotboom D. J., Kunji E. R. S., Palmieri F., O'Connor R. **The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial Pyrimidine Nucleotide Carrier to promote cell growth.**

Mol Biol Cell. 2007; 18 (9): 3545-55.

Frangini M., Rampazzo C., Franzolin E., Lara M.C. , Vilà M.R., Martì R., Bianchi V. **Unchanged thymidine triphosphate pools and thymidine metabolism in two lines of thymidine kinase 2-mutated fibroblasts.**

FEBS J. 2009; 276: 1104-13.

Haitina T., Lindblom J., Renström T., Fredriksson R. **Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system.**

Genomics. 2006; 88 (6): 779-90.

Håkansson P., Hofer A., Thelander L. **Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells.**

J Biol Chem. 2006; 281 (12): 7834-41.

Iacobazzi V., Ventura M., Fiermonte G., Preziosi G., Rocchi M., Palmieri F. **Genomic organization of the gene (SLC25A19) encoding the human mitochondrial deoxynucleotide carrier (DNC).**

Cytogenet Cell Genet. 2001 93: 40-42.

Kang J., Samuels D. C. **The evidence that the DNC (SLC25A19) is not the mitochondrial deoxyribonucleotide carrier.**

Mitochondrion. 2008; 8 (2): 103-8.

Lai Y., Tse C. M., Unadkat J. D. **Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs.**

J Biol Chem. 2004; 279 (6): 4490-7.

Lam W., Chen C., Ruan S., Leung CH., Cheng Y.C. **Expression of deoxynucleotide carrier is not associated with the mitochondrial DNA depletion caused by anti-HIV dideoxynucleoside analogs and mitochondrial dNTP uptake.**

Mol Pharmacol. 2005; 67 (2): 408-16.

Leanza L., Ferraro P., Reichard P., Bianchi V. **Metabolic interrelations within guanine deoxynucleotide pools for mitochondrial and nuclear DNA maintenance.**

J Biol Chem. 2008; 283 (24): 16437-45.

Lindhurst M. J., Fiermonte G., Song S., Struys E., De Leonardis F., Schwartzberg P. L., Chen A., Castegna A., Verhoeven N., Mathews C. K., Palmieri F., Biesecker L. G. **Knockout of *Slc25a19* causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103 (43): 15927-32.

Mandel H., Szargel R., Labay V., Elpeleg O., Saada A., Shalata A., Anbinder Y., Berkowitz D., Hartman C., Barak M., Eriksson S., Cohen N. **The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA.**

Nat Genet. 2001; 29 (3): 337-41.

Marobbio C. M. T., Di Noia M. A., Palmieri F. **Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization.**

Biochem J. 2006; 393 (Pt 2): 441-6.

Nakano K., Bálint E., Ashcroft M., Vousden K. H. **A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73.**

Oncogene. 2000; 19 (37): 4283-9.

Palmieri F. **Mitochondrial carrier proteins.**

FEBS Lett. 1994; 346 (1): 48-54.

Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications

Pflugers Arch - Eur J Physiol 2004; 447:689–7092004

Palmieri F., Agrimi G., Blanco E., Castegna A., Di Noia M. A., Iacobazzi V., Lasorsa F. M., Marobbio C. M. T., Palmieri L., Scarcia P., Todisco S., Voza A., Walker J. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins.

Biochim Biophys Acta. 2006; 1249–12622006

Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Res. 2001; 29 (9): e45.

Pontarin G., Gallinaro L., Ferraro P., Reichard P., Bianchi V. Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100 (21): 12159-64.

Rampazzo C., Fabris S., Franzolin E., Crovatto K., Frangini M., Bianchi V. Mitochondrial thymidine kinase and the enzymatic network regulating thymidine triphosphate pools in cultured human cells.

J Biol Chem. 2007; 282 (48): 34758-69.

Rampazzo C., Miazzi C., Franzolin E., Pontarin G., Ferraro P., Frangini M., Reichard P., Bianchi V. Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances.

Mutat Res. 2010 Jun 16. [Epub ahead of print] PMID: 20561600

Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis.

Annu Rev Biochem. 1988; 57: 349-74.

Saada A., Shaag A., Mandel H., Nevo Y., Eriksson S., Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy.

Nat Genet. 2001; 29 (3): 342-4.

Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y., Nakamura Y. **A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage.**

Nature. 2000; 404 (6773): 42-9.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.**

Genome Biol. 2002; 3 (7): RESEARCH0034.

Van Dyck E., Jank B., Ragnini A., Schweyen R. J., Duyckaerts C., Sluse F., Foury F. **Overexpression of a novel member of the mitochondrial carrier family rescues defects in both DNA and RNA metabolism in yeast mitochondria.**

Mol Gen Genet. 1995; 246 (4): 426-36.

Wang B., Li N., Sui L., Wu Y., Wang X., Wang Q., Xia D., Wan T., Cao X. **HuBMSC-MCP, a novel member of mitochondrial carrier superfamily, enhances dendritic cell endocytosis.**

Biochem Biophys Res Commun. 2004; 314 (1): 292-300.