



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO BIOLOGIA CELLULARE

XXI CICLO

**MODELLI CELLULARI DI DEFICIENZE PER LA
TIMIDINA CHINASI MITOCONDRIALE**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore : Ch.mo Prof. Vera Bianchi

Dottoranda : Elisa Franzolin

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 Metabolismo dei precursori del DNA in cellule di mammifero	7
<i>1.1.1 Caratteristiche strutturali e funzionali delle deossiribonucleoside chinasi</i>	<i>9</i>
1.2 Regolazione dei pool citoplasmatici dei dNTP	11
<i>1.2.1 p53R2 e la sintesi dei deossiribonucleotidi in cellule quiescenti</i>	<i>14</i>
<i>1.2.2 Studio dei substrate cycle citoplasmatici</i>	<i>16</i>
1.3 Origine dei precursori del DNA mitocondriale	16
<i>1.3.1 Difetti nel metabolismo dei dNTP e malattie mitocondriali</i>	<i>18</i>
<i>1.3.2 Regolazione del pool mitocondriale dei dNTP e substrate cycle mitocondriali</i>	<i>20</i>
1.4 La fosforilazione della timidina nelle cellule di mammifero: le due timidina chinasi	21
<i>1.4.1 Purificazione e caratterizzazione delle timidina chinasi 1 e 2</i>	<i>22</i>
<i>1.4.2 Clonaggio della timidina chinasi mitocondriale</i>	<i>24</i>
<i>1.4.3 Saggi dell'attività timidino chinasi della timidina chinasi mitocondriale</i>	<i>26</i>
1.5 Trasportatori proteici mitocondriali	27
<i>1.5.1 Trasportatori coinvolti negli scambi dinamici tra i pool citoplasmatici e mitocondriali</i>	<i>29</i>
<i>1.5.2 Caratterizzazione di SLC25A19</i>	<i>30</i>
<i>1.5.3 Due ipotetici trasportatori mitocondriali di deossiribonucleotidi: SLC25A33 e SLC25A36</i>	<i>31</i>
2. SCOPO	35

3. MATERIALI E METODI	37
3.1 Linee cellulari e condizioni di crescita	37
3.2 Silenziamento genico costitutivo e selezione dei cloni	38
3.3 Silenziamento genico transiente mediante siRNA	39
<i>3.3.1 Silenziamento della timidina chinasi mitocondriale</i>	<i>39</i>
<i>3.3.2 Silenziamento di slc25a36</i>	<i>40</i>
3.4 Estrazione dell' RNA, sintesi del cDNA e real-time PCR relativa	41
3.5 Estrazione del DNA e quantificazione del mtDNA mediante real-time PCR quantitativa	43
3.6 Analisi con il citofluorimetro	45
<i>3.6.1 Analisi del ciclo cellulare</i>	<i>45</i>
<i>3.6.2 Analisi della massa mitocondriale e delle dimensioni cellulari</i>	<i>45</i>
3.7 Estratti cellulari per saggi enzimatici	46
3.8 Saggi dell'attività timidino chinasi	46
3.9 Saggio della citrato sintasi	47
3.10 Saggio della timidina fosforilasi	48
3.11 Western blot	49
3.12 Marcatura isotopica delle cellule	50
3.13 Estrazione del pool citoplasmatico e mitocondriale dei nucleotidi	50
3.14 Estrazione del pool cellulare totale dei nucleotidi	51

3.15 Determinazione delle dimensioni dei pool dei ribonucleotidi mediante HPLC	51
3.16 Determinazione delle dimensioni dei pool dei dNTP e della radioattività specifica del dTTP	52
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	53
4.1 Un nuovo saggio enzimatico per la determinazione dell'attività della timidina chinasi mitocondriale	53
<i>4.1.1 Confronto tra ³H-BVDU ed altri substrati nel saggio di attività della timidina chinasi mitocondriale</i>	<i>57</i>
<i>4.1.2 Variazione dell'attività della timidina chinasi mitocondriale durante il ciclo cellulare</i>	<i>60</i>
4.2 Contributo della timidina chinasi mitocondriale al mantenimento del pool mitocondriale del dTTP	63
<i>4.2.1 Attività della timidina chinasi mitocondriale in fibroblasti quiescenti e influenza della timidina fosforilasi</i>	<i>64</i>
<i>4.2.2 Sintesi de novo del dTTP in fibroblasti quiescenti</i>	<i>68</i>
<i>4.2.3 Silenziamento della timidina chinasi mitocondriale in fibroblasti umani quiescenti</i>	<i>71</i>
<i>4.2.4 Metabolismo della timidina in due linee di fibroblasti con la timidina chinasi mitocondriale mutata</i>	<i>77</i>
4.3 Analisi funzionale di due ipotetici trasportatori mitocondriali di nucleotidi	78
<i>4.3.1 Silenziamento genico di slc25a33 e slc25a36</i>	<i>79</i>
<i>4.3.2 Silenziamento genico transiente di slc25a36</i>	<i>81</i>
<i>4.3.3 Crescita cellulare, dimensioni cellulari, massa mitocondriale e mtDNA nelle cellule slc25a33-RNAi e slc25a33-slc25a36-RNAi</i>	<i>82</i>
<i>4.3.4 Analisi dei pool citosolici e mitocondriali dei ribo- e dei deossiribonucleotidi in cellule slc25a33-RNAi</i>	<i>87</i>

4.3.5 <i>Analisi dei pool citosolici e mitocondriali dei ribo- e dei deossiribonucleotidi in cellule slc25a33-slc25a36-RNAi</i>	89
5. CONCLUSIONI	94
6. PROSPETTIVE FUTURE	98
7. RIASSUNTO	99
8. SUMMARY	103
9. BIBLIOGRAFIA	107

ABBREVIAZIONI

CdR: deossicitidina
cDNA: DNA complementare
ddCTP: dideossicitidina trifosfato
dN: deossinucleosidi
(d)NDP, (d)NTP: (deossi)nucleoside mono, di- e trifosfato
(d)AMP, (d)ADP, (d)ATP: (deossi)adenosina mono, di- e trifosfato
(d)CMP, (d)CDP, (d)CTP: (deossi)citidina mono, di- e trifosfato
(d)NMP, (d)GMP, (d)GDP, (d)GTP: (deossi)guanosina mono, di- e trifosfato
(d)TMP, (d)TDP, (d)TTP: (deossi)timidina mono, di- e trifosfato
(d)UMP, (d)UDP, (d)UTP: (deossi)uridina mono, di- e trifosfato
mtDNA: DNA mitocondriale
mRNA: RNA messaggero
RNAi: RNA interference
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA
TdR: timidina
UdR: uridina

ENZIMI

ACC: ATP/ADP CARRIER
CS: citrato sintasi
cdN: 5'(3') deossiribonucleotidasi citosolica
dCK: deossicitidina chinasi
dGK: deossiguanosina chinasi
DmdNK: deossiribonucleoside chinasi di *Drosophila melanogaster*
DNC: deoxynucleotide carrier
hENT1: human equilibrative nucleoside transporter 1
hmbs: idrossimetilbilanosintasi
mdN: 5'(3') deossiribonucleotidasi mitocondriale
NMPK, NDPK: nucleoside mono e difosfato chinasi
RNR: ribonucleotide reduttasi
TK1: timidina chinasi citosolica
TK2: timidina chinasi mitocondriale
TP: timidina fosforilasi

COMPOSTI, TAMPONI E SOLUZIONI

AraT:1-β-D-arabinofuranosil timidina BSA: albumina sierica bovina
AZT: azidotimidina
BVDU: (E)-5-(2-bromovinil)-dUrd
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: dimetilsolfossido
DTNB: 5-5'-ditiobis-(2-acido nitrobenzoico)

DTT: ditionitrosotriolo
EDTA: acido etilendiamminotetracetico
FCS: fetal calf serum
Hepes: acido N-2-idrossietilpiperazide-N-2-etansulfonico
MOPS: acido 3-[N-morfolino] propanosulfonico
OAA: acido ossalacetico
PBS: phosphate-buffered saline
TCA: acido tricloroacetico
TE: tampone Tris EDTA
TNB: acido tionitrobenzoico
Tris: 2-amino-2-idrossimetilpropano-1,3-diolo

ALTRE ABBREVIAZIONI

a.a.: aminoacidi
A.S.: attività specifica
BAC: bacterial artificial chromosome
CCD-Lu34: fibroblasti umani di polmone
Ci: Curie
Ct: fluorescence threshold values
cpm: conte per minuto
C 63: fibroblasti di pelle umana
C 72: fibroblasti di pelle umana
FACS: fluorescence activated cell sorter
GFP: green fluorescent protein
HEK 293: human embryonic kidney 293
HOS: cellule di osteosarcoma umano
HPLC: high performance liquid chromatography
HuBMSC-MCP: human bone marrow stromal cell-derived mitochondrial carrier protein
IC₅₀: concentrazione di inibitore che inibisce la reazione enzimatica del 50%
IGF-I: insulin-like growth factor I
MCF: mitochondrial carrier family
MCPHA: Amish microcephaly
MDS: sindromi da deplezione del DNA mitocondriale
MNGIE: mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy
OST: cellule di osteosarcoma umano prive della TK1
p: significatività esatta
PCR: polymerase chain reaction
Pi: fosfato inorganico
PNC1: pyrimidine nucleotide carrier 1
RT-PCR: real time PCR
SLC25: solute carrier family 25
TPP: tiamina pirofosfato

1. INTRODUZIONE

1.1 Metabolismo dei precursori del DNA in cellule di mammifero

Per garantire la corretta replicazione e riparazione del DNA le cellule necessitano di un apporto bilanciato di ciascuno dei quattro deossiribonucleosidi trifosfato (dNTP). Le cellule di mammifero contengono due pool di dNTP: uno citoplasmatico per la replicazione del DNA nucleare ed uno mitocondriale per la sintesi del DNA mitocondriale (mtDNA). E' necessario che i dNTP siano disponibili per tutta la durata del ciclo cellulare. Infatti, se la replicazione del DNA nucleare è limitata alla sola fase S, quella del mtDNA e la riparazione del DNA proseguono anche al di fuori di essa.

Il mio lavoro ha riguardato il metabolismo dei precursori del DNA ed è stato soprattutto focalizzato sulla sintesi del dTTP. Diversi sono infatti gli enzimi coinvolti nella regolazione di questo precursore la cui disponibilità è fondamentale per il mantenimento della stabilità genomica. Ciò è dimostrato dall'esistenza di alcune patologie umane causate da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo della timidina che, alterando il contenuto di dTTP nel mitocondrio, determinano la destabilizzazione del genoma mitocondriale. Particolare attenzione verrà quindi posta nelle vie di sintesi e regolazione del dTTP.

I dNTP possono essere prodotti attraverso due vie di sintesi: la via *de novo* e la via di recupero (Reichard, 1988). Nella via *de novo* i ribonucleosidi 5'-difosfato formati a partire da piccole molecole vengono ridotti nel citoplasma a 2'-deossinucleotidi grazie all'azione della ribonucleotide reductasi (RNR). Questa via fornisce gran parte dei precursori necessari per la sintesi del DNA nucleare e, grazie a specifici trasportatori della membrana mitocondriale interna, anche del mtDNA. L'attività della RNR determina la sintesi diretta di dADP, dCDP e dGDP che verranno poi fosforilati da specifiche chinasi a trifosfati. La sintesi del dTTP attraverso la via *de novo* è invece più complessa e partendo dalla riduzione di CDP e UDP coinvolge numerosi altri enzimi, tra cui la timidilato sintasi che dal dUMP catalizza la formazione del dTMP (fig. 1). Il dTMP viene sintetizzato

attraverso la via *de novo* e di recupero ed è successivamente fosforilato dalla timidilato chinasi (TMPK) a dTDP e dalle nucleoside difosfato chinasi (NDPK) a dTTP. La fosforilazione della TMPK e delle NDPK è reversibile grazie all'azione fosfatase degli enzimi stessi.

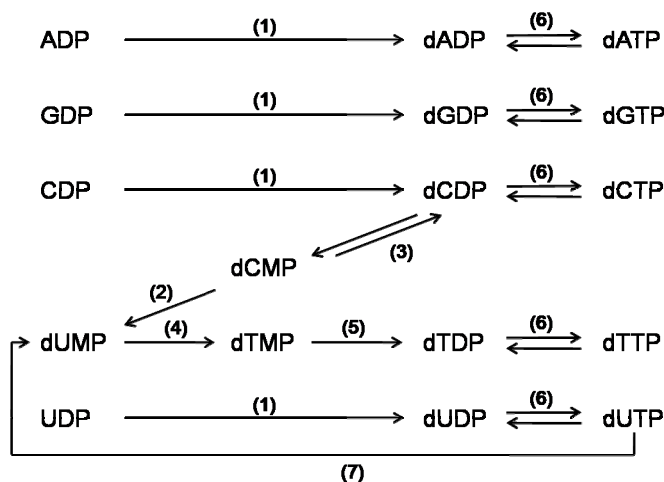


Fig. 1 Sintesi *de novo* dei dNTP. (1) ribonucleotide reduttasi (RNR), (2) dCMP deaminasi, (3) CMP-UMP chinasi, (4) timidilato sintasi (TS), (5) timidilato chinasi (TMPK), (6) nucleotide difosfato chinasi (NDPK), (7) deossiuridina trifosfatasi (dUTPasi)

Nelle cellule esistono due vie di recupero, una citosolica ed una propria dei mitocondri (fig. 2). In entrambi i casi i deossiribonucleosidi ottenuti dalla degradazione del DNA vengono consecutivamente fosforilati fino alle forme trifosfato. Le cellule di mammifero contengono quattro deossiribonucleoside chinasi. La timidina chinasi 1 (TK1) e la deossicitidina chinasi (dCK) sono citoplasmatiche, mentre la timidina chinasi 2 (TK2) e la deossiguanosina chinasi (dGK) si trovano all'interno della matrice mitocondriale. Nel citoplasma la TK1 fosforila la deossiuridina e la timidina mentre, la dCK oltre alla deossicitidina è in grado di fosforilare anche la deossiadenosina e la deossiguanosina. La TK2, a differenza della TK1, oltre alla timidina e alla deossiuridina è in grado di fosforilare anche la deossicitidina. La dGK invece catalizza la fosforilazione sia della deossiguanosina che della deossiadenosina. Quindi, la diversa distribuzione delle chinasi garantisce la fosforilazione di tutti i quattro deossiribonucleosidi in entrambi i compartimenti. La TK1 è attiva solamente durante la fase S, mentre le altre deossiribonucleoside chinasi sono espresse costitutivamente e subiscono

delle leggere modulazioni di attività durante il ciclo cellulare (Franzolin et al., 2006; Leanza et al., 2008).

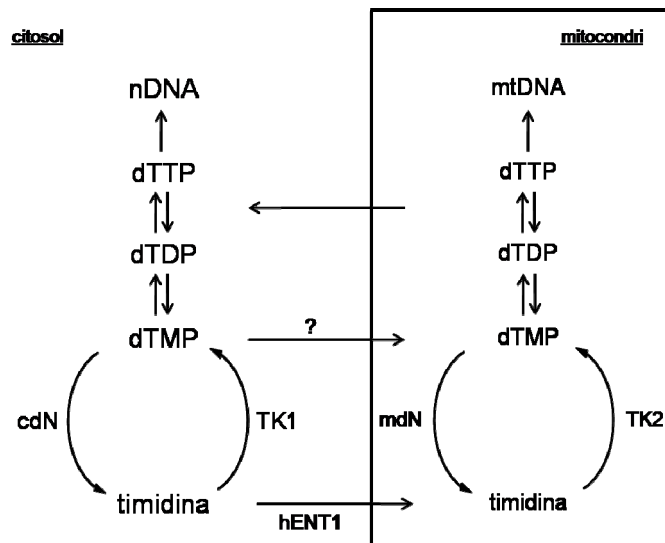


Fig. 2 Rappresentazione delle vie di sintesi di recupero citoplasmatica e mitocondriale per la sintesi del dTTP

1.1.2 Caratteristiche strutturali e funzionali delle deossiribonucleoside chinasi

Confrontando la sequenza aminoacidica delle quattro deossiribonucleoside chinasi di mammifero, è stato possibile distinguere due diverse famiglie di appartenenza evolute in modo distinto. La prima famiglia comprende la sola TK1 mentre, alla seconda appartengono TK2, dCK, dGK, la deossiribonucleoside chinasi di *Drosophila melanogaster* (DmdNK) e la TK dell'herpes virus 1 (Eriksson et al., 2002). Le deossiribonucleoside chinasi della seconda famiglia hanno molte caratteristiche comuni che le distinguono dalla TK1. Hanno infatti una certa similarità di sequenza e struttura dimerica. La TK1 nella forma attiva è invece un tetramero. La DmdNK è l'unica deossiribonucleoside chinasi identificata in *Drosophila melanogaster* ed è in grado di fosforilare tutti i quattro deossiribnucleosidi naturali. La determinazione della struttura tridimensionale della DmdNK ha fornito un modello da cui è stata ricavata la struttura della dGK (Johansson et al., 2001) che è risultata essere strettamente correlata a quella della dCK (Sabini et al., 2003) (fig. 3). Nonostante la struttura della TK2 non sia ancora stata risolta, il 40% di identità di sequenza con DmdNK ha consentito di ricavare

un modello strutturale anche di questo enzima (Eriksson et *al.*, 2002). La TK1 mostra una similarità di sequenza con le altre deossiribonucleoside chinasi solo nella regione N-terminale che si organizza a formare un P-loop per il legame del donatore di fosfato.

Nei dimeri delle deossiribonucleoside chinasi ciascun monomero ha un'architettura α/β in cui 8-10 α -eliche circondano 5 foglietti β paralleli. Nella TK1 invece ciascun monomero è costituito da due domini: un dominio α/β da cui sporge il P-loop e un piccolo dominio contenente zinco. Tra i due domini è collocato il sito di legame del substrato (Welin et *al.*, 2004). La specificità di legame per i substrati sembra essere determinata dalle dimensioni del sito catalitico che nella TK1, essendo più piccolo rispetto alle altre deossiribonucleoside chinasi conferisce all'enzima la capacità di riconoscere una gamma più ristretta di substrati.

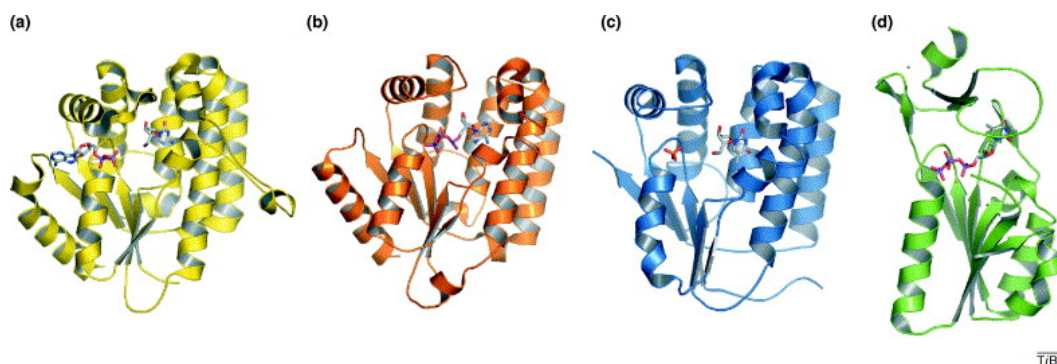


Fig. 3 Strutture quaternarie di quattro deossiribonucleoside chinasi con dei loro substrati. (a) dCK umana + deossicitidina e ADP, (b) dGK umana + ATP come inibitore, (c) DmdNK + deossitimidina e uno ione solfato, (d) TK1 umana + dTTP. (Sandrini e Piskur, 2005)

Nonostante queste differenze strutturali la regolazione a feedback da parte dei dNTP avviene allo stesso modo in tutte le deossiribonucleoside chinasi. E' quindi curioso notare come in natura si siano evolute due famiglie diverse di chinasi per catalizzare reazioni simili tra loro e sottoposte allo stesso tipo di inibizione (Sandrini e Piskur, 2005).

1.2 Regolazione dei pool citoplasmatici dei dNTP

Nelle cellule in proliferazione il maggiore apporto di deossiribonucleotidi è necessario durante la fase S, momento in cui il DNA genomico viene replicato. Il mancato controllo del contenuto e delle proporzioni relative dei dNTP può provocare anomalie genetiche e condurre alla morte cellulare (Kunz et al., 1994). La sintesi dei dNTP è regolata dalle relazioni funzionali tra gli enzimi biosintetici e catabolici coinvolti in questo processo. Un ruolo fondamentale in questa regolazione è svolto dalla ribonucleotide reductasi. Nei mammiferi la RNR è un etero tetramero costituito da due subunità (R1 ed R2) ed è soggetta ad una complessa regolazione di tipo allosterico, trascrizionale e di degradazione proteica.

La subunità maggiore R1 è un omodimero di 160 kDa e contiene il sito catalitico, un sito redox disulfidico, coinvolto nella riduzione dei substrati e due siti allosterici. La subunità minore (R2) è anch'essa un omodimero (78 kDa) e contiene un radicale tirosilico, stabilizzato da un ponte tra due atomi di Fe^{3+} e un atomo di ossigeno, indispensabile per la riduzione radicalica del substrato.

La presenza della RNR nelle cellule ciclanti è correlata alla progressione del ciclo cellulare e ai sistemi di controllo della crescita cellulare con un picco di attività proprio durante la fase S. La trascrizione dei geni di R1 e R2 è infatti minima in G_0/G_1 e massima in fase S. In cellule proliferanti la subunità R1 ha un'emivita di 18-24 ore, perciò la sua presenza è pressoché costante ed in eccesso durante tutto il ciclo cellulare. L'espressione di R2 è invece ristretta alla sola fase S raggiungendo livelli massimi dopo 6-7 ore. R2 si accumula nella cellula fino alla tarda mitosi quando viene rapidamente degradata grazie alla presenza di un dominio KEN N-terminale riconosciuto dal Cdh1 anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C). L'emivita di R2 è di sole 3-4 ore e l'attività complessiva della RNR è di conseguenza limitata dal contenuto di questa subunità (Chabes e Thelander, 2000).

La regolazione allosterica della RNR dipende dalla presenza dei siti allosterici di attività e di specificità nella subunità R1. Il legame dell'ATP o del dATP al sito di attività determinano rispettivamente l'attivazione o l'inibizione a feedback della RNR. Il mantenimento del corretto bilanciamento tra i quattro diversi dNTP è invece garantito dal legame di un effettore allosterico specifico (dATP,

ATP, dTTP o dGTP) al sito di specificità. Il dCTP non è in grado di legarsi a questo sito e il suo accumulo non ha effetti sulla RNR. Tuttavia il dCTP è responsabile della regolazione allosterica sia della dCK che della dCMP deaminasi bilanciando la sintesi di dCTP e dTTP. La dCMP deaminasi fornisce infatti gran parte del dUMP utile alla sintesi del dTTP quando deossiuridina e timidina non sono disponibili nell'ambiente extracellulare e il legame del dCTP o del dTTP determina rispettivamente l'attivazione e l'inibizione dell'enzima.

Come la dCK anche le altre deossiribonucleoside chinasi sono regolate a feedback dai loro rispettivi dNTP. Inoltre, le chinasi della via di recupero formano con le 5'-deossinucleotidasi dei cicli di regolazione del substrato (substrate cycle) dove vengono catalizzate due reazioni opposte e irreversibili il cui risultato netto è l'idrolisi dell'ATP ad ADP e Pi.

Nell'uomo sono state identificate sette 5'-nucleotidasi con diverse localizzazioni subcellulari. Cinque di queste si trovano nel citosol, una è ancorata alla superficie esterna della membrana plasmatica ed una è invece specifica del mitocondrio (Bianchi e Spychala, 2003). Le 5'-deossinucleotidasi citosolica (cdN) e mitocondriale (mdN) preferiscono i deossiribonucleosidi 2' e 3' monofosfati ai ribonucleotidi e per questo motivo vengono definite deossinucleotidasi. Tutte le 5'-nucleotidasi intracellulari possiedono delle Km relativamente elevate e sono quindi molto sensibili alle oscillazioni delle concentrazioni dei substrati, in genere molto basse, da cui dipende la loro attività.

Le interconnessioni dinamiche tra le chinasi e le nucleotidasi, coinvolte nel catabolismo dei deossiribonucleotidi, contribuiscono al mantenimento di una concentrazione equilibrata di dNTP. In questo processo viene sfruttata la diversa permeabilità della membrana plasmatica ai prodotti dei substrate cycle. I nucleosidi possono infatti attraversare liberamente la membrana plasmatica per diffusione facilitata mentre, i nucleotidi, una volta prodotti rimangono intrappolati all'interno della cellula (fig. 4). Quando la via catabolica prevale su quella anabolica aumentano i deossiribonucleosidi che vengono escreti dalla cellula. Quando invece prevale l'anabolismo, i deossiribonucleosidi vengono importati dall'esterno e metabolizzati a dNTP (Gazziola et al., 2001). Altri enzimi catabolici quali deaminasi, fosforilasi e idrolasi rimuovendo i nucleosidi spostano l'equilibrio verso il catabolismo. La timidina fosforilasi (TP) ad esempio, regola il

contenuto di dTTP all'interno della cellula convertendo nel citoplasma la timidina a timina e deossiribosio-1-fosfato.

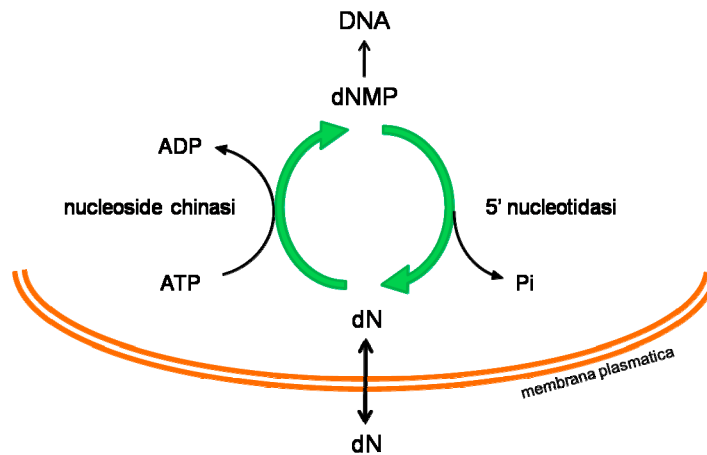


Fig. 4 Rappresentazione schematica di un substrate cycle tra deossiribonucleotidi (dNMP) e deossiribonucleosidi (dN)

La sintesi del dTTP è un processo coordinato con la replicazione del DNA infatti nelle cellule in fase S la concentrazione del dTTP è circa 20 volte superiore a quella delle cellule in G₀ (Spyrou e Reichard, 1988). Questa fluttuazione oltre che dalla fine regolazione della RNR e dal substrate cycle dTMP/timidina dipende anche dalla modulazione dell'attività delle due chinasi TK1 e TMPK. La TK1, oltre ad essere regolata come le altre deossiribonucleoside chinasi, è regolata anche a livello trascrizionale e post trascrizionale. Inoltre, la TK1 e la TMPK sono degradate durante la progressione mitotica. La TMPK viene degradata nella transizione dalla fase M alla G₁ grazie al complesso APC/C-Cdc20 e questo stato viene mantenuto durante l'entrata in G₁ dal complesso APC/C-Cdh1 (Ke et al., 2005). Per quanto riguarda la TK1 invece, la quantità dell'enzima aumenta di circa 10 volte durante la fase S, raggiunge un picco durante la mitosi ma esso viene rapidamente degradato nella prima fase G₁. Durante la mitosi la TK1, pur essendo presente in grande quantità, non è tuttavia molto attiva. Infatti, una fosforilazione nella serina 13 compromette lo stato tetramericco della TK1 e di conseguenza la sua attività (Li et al., 2004). Come per R2 la degradazione della TK1 avviene con il riconoscimento durante la tarda mitosi di un sito KEN C-terminale da parte di Cdh1, l'ubiquitinizzazione della proteina e il legame al

complesso APC/C (Ke e Chang, 2004). Il complesso APC/C-Cdh1 potrebbe quindi essere importante nella riduzione della concentrazione dei dNTP all'entrata in G₁, degradando contemporaneamente la subunità R2 e la TK1. Il dTTP come regolatore allosterico della RNR inibisce la riduzione del CDP e induce la formazione di dGDP. Quantità elevate di dTTP in G₁ determinerebbero la diminuzione del pool del dCTP e un contemporaneo aumento del pool del dGTP. Poiché la TMPK è richiesta per la formazione del dTTP in entrambe le vie di sintesi di recupero e *de novo*, la sua degradazione, anticipata rispetto a quella della TK1, è un mezzo per diminuire il dTTP nella fase mitotica. Durante la fase G₁ la contemporanea mancanza della TK1 e della TMPK mantiene bassa la concentrazione del dTTP garantendo un contenuto bilanciato dei dNTP e quindi la stabilità genomica (Hu e Chang, 2007).

1.2.1 p53R2 e la sintesi dei deossiribonucleotidi in cellule quiescenti

Come spiegato nel paragrafo 1.2 la RNR, oltre ad essere regolata allostericamente, è attiva in fase S. Ciò è dovuto sia alla trascrizione delle sue subunità durante la sola fase S sia alla degradazione di R2 in tarda mitosi. Le cellule post-mitotiche sono di conseguenza prive della RNR costituita dalle subunità R1/R2 e, fino a qualche anno fa, si pensava che la sintesi di recupero dei deossiribonucleosidi fosse l'unica fonte di dNTP per la replicazione del mtDNA e la riparazione del DNA. Questa visione è stata tuttavia stravolta dall'identificazione di un'ulteriore subunità della RNR indotta da p53 in seguito a danni al DNA ottenuti con raggi γ , UV e adriamicina (Tanaka et al., 2000; Nakano et al., 2000). Sia in topo che in uomo questa subunità mostra un'identità aminoacidica dell'80% con R2 ma manca del sito KEN N-terminale perciò, al contrario di R2, non viene degradata in tarda mitosi. Considerata la dipendenza da p53 e l'elevata similarità con R2 questa subunità è stata denominata p53R2. *In vitro* è stato dimostrato che p53R2 è in grado di legare R1 e di costituire una RNR attiva anche se con efficienza inferiore del 40% rispetto all'attività di R1/R2 (Guittet et al., 2001). Poiché l'espressione di p53R2 è stata da prima osservata in seguito a danni genotossici è stato attribuito a questa subunità un ruolo importante nella sintesi dei dNTP per la riparazione del DNA (Tanaka et al., 2000; Yamaguchi et al., 2001). Tuttavia il fatto che il DNA venga riparato entro poche ore dall'induzione del danno e

che la massima induzione di p53R2 si osservi invece non prima di 24 ore, ha fatto pensare che p53R2 abbia un'altra funzione. Recentemente è stato dimostrato che p53R2 è normalmente espressa anche in assenza di danni al DNA ad un livello endogeno 30 volte inferiore di quanto lo sia R2 in fase S (Håkansson et al., 2006; Pontarin et al., 2007). La quantità di p53R2 in cellule quiescenti aumenta rispetto al contenuto nelle cellule ciclanti anche se l'attività ribonucleotidica reduttasica rimane ridotta al 2-3% rispetto alle cellule ciclanti (Pontarin et al., 2007). Queste osservazioni supportano l'ipotesi del coinvolgimento di p53R2 nella sintesi dei dNTP per la replicazione del mtDNA soprattutto nelle cellule quiescenti. L'importanza di p53R2 in questo processo viene confermata dalle gravi conseguenze della sua mutazione osservate sia in topo (Kimura et al., 2003) che nell'uomo (Bourdon et al., 2007; Bornstein et al., 2008). I topi knock-out per p53R2 morivano tra l'undicesima e la dodicesima settimana di vita e mostravano danni in molti organi ma soprattutto nei reni. La patologia nei topi è stata attribuita ad un alterato contenuto di dNTP con il conseguente accumulo di mutazioni spontanee nel DNA. Nell'uomo il fenotipo è più grave rispetto ai topi e si manifesta con danni neurologici e renali. Nell'uomo è stata inoltre riscontrata una severa deplezione del mtDNA ed una ridotta attività della catena respiratoria nei tessuti affetti. Ciò non è stato invece rilevato nei topi knock-out.

Durante lo studio del ruolo di p53R2 è stata più volte postulata la sua traslocazione dal citoplasma al nucleo sia in seguito a danni al DNA (Tanaka et al., 2000; Yamaguchi et al., 2001) sia durante la fase S (Liu et al., 2005). La traslocazione di p53R2 nel nucleo supporta l'idea che i dNTP per la riparazione del DNA siano sintetizzati direttamente *in loco* ma, di recente, questa ipotesi è stata smentita. Diversi esperimenti hanno infatti dimostrato la co-localizzazione di R1, R2 e p53R2 nel citoplasma. Da queste analisi le tre subunità non risultano subire traslocazioni al nucleo nemmeno in seguito a danni al DNA (Pontarin et al., 2008).

Queste osservazioni hanno dimostrato l'esistenza di una via *de novo* mediata da R1/p53R2 anche al di fuori della fase S. Questa attività ribonucleotidica reduttasica è confinata nel citoplasma e i dNTP prodotti diffondono poi nel nucleo o vengono trasportati nei mitocondri. In questo modo in cellule post-mitotiche R1/p53R2 si aggiungerebbe alla sintesi di recupero dei dNTP nel supportare sia la replicazione

del mtDNA che la riparazione del DNA.

1.2.2 Studio dei substrate cycle citoplasmatici

Gli studi che hanno condotto alla dimostrazione dei substrate cycle citoplasmatici sono stati condotti mediante esperimenti di flusso isotopico, incubando le cellule con precursori radioattivi dei dNTP purinici e pirimidinici e valutandone poi l'incorporazione nel DNA e l'escrezione nel medium sotto forma di deossiribonucleosidi.

Questi esperimenti hanno dimostrato che nelle cellule ciclanti la maggior parte dei dNTP viene incorporata nel DNA e solo una piccola frazione viene escreta. Tuttavia, se il normale metabolismo dei dNTP viene perturbato, gli equilibri si spostano. L'inibizione della sintesi del DNA per esempio provoca l'aumento dell'escrezione dei deossiribonucleosidi, mentre l'inibizione della sintesi *de novo* un maggiore importo di questi composti dall'ambiente extracellulare (Bianchi et al., 1986). L'osservazione di questi fenomeni ha permesso di dimostrare l'esistenza di substrate cycle tra i deossiribonucleosidi e i loro rispettivi 5'-fosfati, che regolano la degradazione dei dNTP pirimidinici e la direzione del flusso dei deossiribonucleosidi attraverso la membrana plasmatica. Quando le chinasi non erano attive è stata riscontrata un'aumentata escrezione rispettivamente di timidina e deossiuridina o di deossicitidina e deossiadenosina. Questi esperimenti hanno consentito di identificare la TK1 come responsabile della fase anabolica del substrate cycle di dTMP/timidina e la dCK come enzima corrispondente nei substrate cycle dCMP/deossicitidina e dAMP/deossiadenosina (Höglund et al., 1988). Per quanto riguarda le nucleotidasi invece, esperimenti in cui la cdN è stata sovraespressa hanno permesso di attribuire a questo enzima la responsabilità della componente catabolica nel *substate cycle* di ribo- e deossiribonucleotidi pirimidinici (Gazziola et al., 2001).

1.3 Origine dei precursori del DNA mitocondriale

Nelle cellule eucariotiche il mtDNA rappresenta circa il 1-5% del DNA totale e per la sua replicazione richiede una frazione altrettanto ridotta di dNTP. Tuttavia la replicazione del mtDNA non è limitata alla sola fase S, quando la disponibilità di dNTP è maggiore, ma prosegue durante tutto il ciclo cellulare. Questa

necessità potrebbe essere particolarmente critica in cellule quiescenti dove la RNR è poco attiva.

Per lungo tempo si è ritenuto che, per la replicazione del mtDNA, i mitocondri disponessero di un particolare pool di dNTP non in equilibrio con quello citosolico. Infatti, timidina radioattiva fornita a cellule TK1⁻, dopo essere stata fosforilata dalla timidina chinasi mitocondriale, risultava essere incorporata preferibilmente nel mtDNA (Bogenhagen et al., 1976). Successivamente, grazie alla messa a punto di un protocollo per la separazione dei due pool, è stata dimostrata l'esistenza di uno scambio reciproco tra i pool di dNTP sintetizzati nel citosol e nei mitocondri. Esperimenti di flusso isotopico, condotti in cellule TK1⁺ e TK1⁻ con timidina triziata, hanno infatti dimostrato l'esistenza di un rapido influsso all'interno dei mitocondri di fosfati timidinici sintetizzati *de novo* e un equivalente uscita nel citoplasma di nucleotidi timidinici fosforilati nei mitocondri (Pontarin et al., 2003). Infatti, in cellule TK1⁻, il ritrovamento di dTTP radioattivo nel pool citosolico poteva essere giustificato solo dall'esportazione del nucleotide dal mitocondrio in seguito alla fosforilazione della timidina triziata da parte della TK2. Esperimenti successivi hanno dimostrato l'esistenza di scambi tra mitocondri e citosol anche per quanto riguarda il pool del dGTP mitocondriale (Leanza et al., 2008) supportando l'ipotesi di uno scambio reciproco tra i due compartimenti per tutti i quattro dNTP.

Queste osservazioni hanno consentito di chiarire quali sono le fonti di dNTP per la sintesi del mtDNA. In cellule ciclanti gran parte dei deossiribonucleotidi del pool mitocondriale sono sintetizzati nel citoplasma attraverso la via *de novo* o di recupero ed importati poi nei mitocondri mediante trasportatori specifici. Una via alternativa prevede invece che i dNTP siano sintetizzati direttamente all'interno dell'organello dalle chinasi (TK2 e dGK) della via di recupero mitocondriale. I dNMP prodotti, per poter essere incorporati nel DNA, dovranno prima subire la fosforilazione a di- e trifosfati. Nel corso degli anni è stata dimostrata l'esistenza di chinasi per i nucleotidi mono- e difosfato che potrebbero essere coinvolte nel metabolismo dei dNTP nel mitocondrio. Di recente è stata infatti identificata la prima nucleoside monofosfato chinasi mitocondriale umana. Questo enzima, denominato UMP-CMPK2 è in grado di fosforilare UMP, CMP, dUMP e dCMP ma con una efficienza superiore per i due deossiribonucleotidi (Xu et al., 2008).

Un lavoro di Milon alla fine degli anni '90 ha invece dimostrato nell'uomo l'esistenza di una nucleoside difosfato (NDP) chinasi mitocondriale (NME4) appartenente alla famiglia delle chinasi nm23-NDP (Milon et *al.*, 1997). NME4 è associata alla membrana mitocondriale interna, a differenza della NDP chinasi mitocondriale di piccione, che è solubile nella matrice (Lambeth et *al.*, 1997). Nonostante ciò, considerando l'elevata identità di sequenza degli enzimi nelle due specie, non è esclusa l'esistenza di ulteriori isoforme di NDP chinasi mitocondriali aventi diverse sub-localizzazioni (Milon et *al.*, 2000).

Poiché sia le attività della TK1 che della RNR classica sono ristrette alla sola fase S, fino a qualche tempo fa si riteneva che le due vie di sintesi di recupero fossero le uniche vie biosintetiche capaci di fornire i dNTP per il pool mitocondriale in cellule quiescenti. In modo particolare la TK2 che, al contrario della TK1, è attiva durante tutto il ciclo cellulare sembrava essere l'unica fonte di dTTP in cellule differenziate. L'identificazione di p53R2 e di una RNR attiva in cellule post-mitotiche (paragrafo 1.2.1) ha invece dimostrato un contributo della via *de novo* anche nelle cellule quiescenti (Håkansson et *al.*, 2006).

1.3.1 Difetti nel metabolismo dei dNTP e malattie mitocondriali

Una classe di malattie mitocondriali, le sindromi da deplezione del mtDNA (MDS), sono caratterizzate dalla riduzione quantitativa del numero di copie di mtDNA che si accompagna ad una ridotta attività dei complessi I, III, IV e V della catena respiratoria, contenenti proteine codificate nel mtDNA. Il primo caso di MDS nell'uomo è stato descritto nel 1991 (Moraes et *al.*, 1991). Da allora è stato individuato un gruppo clinicamente eterogeneo di MDS che interessano sia singoli organi che diversi tessuti, con gravità proporzionale all'ammontare della deplezione. Queste sindromi sono ereditate come tratti autosomici recessivi e sono causate da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo dei dNTP e nella sintesi del mtDNA (Elpeleg et *al.*, 2002). Ad oggi sono state individuate mutazioni in nove geni nucleari che causano deplezione del mtDNA nell'uomo (tab. 1) (Spinazzola et *al.*, 2008). Cinque di questi geni sono coinvolti nel metabolismo dei dNTP: la timidina chinasi mitocondriale, la deossiguanosina chinasi, la polimerasi γ e le sub unità α e β della succinil-CoA sintasi.

Mutazioni della timidina fosforilasi (TP) inducono l'incremento e

l'accumulo del dTTP all'interno della cellula che causa la miopatia encefalo-neuro-gastrointestinale mitocondriale (MNGIE) (Nishino *et al.*, 1999).

Mutazioni a carico della TK2 causano invece la forma miopatica di MDS che colpisce il muscolo scheletrico. Il nome della patologia è dovuto ai fenotipi dei primi casi descritti in cui i pazienti sviluppavano nei primi 3-4 anni di vita una grave ipotonia muscolare a cui seguiva la perdita dell'attività spontanea e nella maggior parte dei casi una morte precoce.

gene	proteina	fenotipo
THYM	Timidina fosforilasi	MNGIE
TK2	Timidina chinasi mitocondriale	MDS miopatica
DGUOK	Deossiguanosina chinasi	MDS epato-cerebrale
SUCLG1	Subunità α della succinil-CoA sintasi	MDS encefalo miopatica
SUCLA2	Subunità β della succinil-CoA sintasi	MDS encefalo miopatica
RRM2B	p53R2	MDS miopatica
POLG	Subunità catalitica della polimerasi γ	MDS epato-cerebrale
PEO1	Elicasi mitocondriale T4-phage-like	MDS epato-cerebrale
MPV17	Proteina della m.m.i. non caratterizzata	MDS epato-cerebrale

Tab. 1 Geni e rispettive proteine la cui mutazione è causa di MDS. m.m.i.= membrana mitocondriale interna (Spinazzola *et al.*, 2008)

Successivamente confrontando i fenotipi di venti pazienti con mutazioni alla TK2 lo spettro clinico della patologia è stato espanso. Infatti, oltre alla miopatia infantile con regressione motoria e morte precoce è stata osservata anche una forma di atrofia della muscolatura spinale e una miopatia senza regressione motoria associata ad una sopravvivenza superiore (Oskoui *et al.*, 2006). Sono state identificate diverse mutazioni della TK2 che si possono presentare sia in omozigosi che in eterozigosi (Saada *et al.*, 2001; Vilà *et al.*, 2003; Mancuso *et al.*, 2003; Carrozzo *et al.*, 2003; Galbiati *et al.*, 2006; Wang *et al.* 2005). Alcune alterano il sito catalitico della TK2, altre il sito di legame del donatore di fosfato.

Delezioni, duplicazioni e mutazioni puntiformi del gene della dGK determinano invece la forma epato-cerebrale di MDS (Mandel *et al.*, 2001; Taanman *et al.*, 2002; Salviati *et al.*, 2002). In questo caso poco dopo la nascita la malattia si manifesta con disfunzione epatica, acidosi lattica e anomalie neurologiche.

In queste patologie la deplezione del mtDNA è attribuita allo sbilanciamento

dei pool di dNTP. L'elevata tessuto-specificità del fenotipo sembra essere legata alla capacità dei tessuti non affetti dalla mutazione di mantenere un corretto metabolismo dei dNTP in seguito alla compromissione delle attività enzimatiche. Sono stati suggeriti alcuni possibili meccanismi. La diminuzione dell'attività della dGK, nei tessuti affetti da MDS epato-cerebrale, potrebbe infatti essere compensata dalla dCK. Tuttavia nel fegato e nel cervello l'attività della dCK sarebbe troppo bassa per sopperire alla mancanza della dGK. Nella MDS miopatica invece, le attività della TK1 e della dCK sono sufficienti a compensare la mancanza della TK2 nel fegato che viene invece interessato dalla mancanza della dCK. L'espressione della TK2 nel muscolo scheletrico è invece inferiore a quella degli altri tessuti e, le vie alternative per la sintesi del dTTP e del dCTP, non sembrano sufficienti a soddisfare l'elevata richiesta energetica del muscolo (Saada et al., 2003).

Nel tentativo di spiegare la tessuto specificità della MDS miopatica, la TK2 è stata mutata in topo sia mediante la tecnica del knock-in (Akman et al., 2008) che del knock-out (Zhou et al., 2008). In questo organismo la perdita della TK2 ha indotto deplezione del mtDNA in una gamma di tessuti (cervello, midollo spinale, cuore, muscolo e reni) più ampia rispetto all'uomo, ma l'attività della catena respiratoria è compromessa solo nel cervello. Anche in topo quindi si manifesta la tessuto-specificità della patologia che sembra tuttavia riguardare il sistema nervoso centrale e non il muscolo scheletrico.

1.3.2 Regolazione del pool mitocondriale dei dNTP e substrate cycle mitocondriali

Nelle cellule ciclanti le dimensioni dei pool mitocondriali equivalgono circa al 3% di quelli citosolici ma le proporzioni relative sono equivalenti tra loro, con il dTTP che rappresenta la componente maggiore e il dGTP quella minore. Durante la quiescenza entrambi i pool si riducono di 50 volte e le proporzioni relative dei quattro dNTP cambiano (Ferraro et al., 2005). Gli scambi tra i pool mitocondriali e citoplasmatici implicano la dipendenza da un sistema di regolazione in parte comune. Infatti, i dNTP importati dal citosol sono soggetti ai sistemi di regolazione citosolici, cioè alla regolazione della RNR e ai substrate cycle tra le deossiribonucleoside chinasi anaboliche e le 5'-deossinucleotidasi cataboliche.

L'identificazione della 5'-deossinucleotidasi mitocondriale (mdN), con un'elevata specificità per la timidina e la deossiuridina (Rampazzo et *al.*, 2000), ha fatto supporre l'esistenza di un substrate cycle mitocondriale per la regolazione delle quantità relative di timidina e dTMP all'interno dell'organello. Per dimostrare questa supposizione gli esperimenti di flusso isotopico in cellule ciclanti TK1⁺ si sono rivelati poco informativi (Gallinaro et *al.*, 2002). In cellule TK1⁻ invece, la timidina triziata è fosforilata solo dalla TK2 nel mitocondrio. Sovraesprimendo e silenziando l'attività della mdN la concentrazione del dTTP citoplasmatico e mitocondriale non variava. Ma nelle due condizioni sperimentali sono stati riscontrati cambiamenti nel grado di fosforilazione della ³H- timidina e nella quantità di dTTP radioattivo incorporato nel DNA che hanno consentito di confermare la partecipazione della mdN ad un substrate cycle mitocondriale in cui controbilancia l'attività della TK2 (Rampazzo et *al.*, 2004).

1.4 La fosforilazione della timidina nelle cellule di mammifero: le due timidina chinasi

Le cellule di mammifero possiedono due distinte timidina chinasi: la TK1 nel citosol e la TK2 nel mitocondrio. Entrambe fosforilano deossiribonucleosidi pirimidinici nelle loro corrispondenti forme monofosfato ma divergono tra loro per molti aspetti. Le due timidina chinasi sono infatti geneticamente distinte e codificate da due geni diversi, hanno specificità di substrato e livelli di attività differenti. L'attività della TK1 è regolata dalla crescita cellulare ed è elevata solo durante la fase S. In cellule quiescenti l'attività della TK1 è prossima allo zero. La TK2 è invece espressa in tutti i tessuti in modo proporzionale alla quantità di mitocondri e, non essendo regolata dal ciclo cellulare, nelle cellule differenziate è l'unico enzima in grado di fosforilare i deossiribonucleosidi pirimidinici (Arnér e Eriksson, 1995).

1.4.1 Purificazione e caratterizzazione delle timidina chinasi 1 e 2

I bassi livelli di espressione e l'elevata instabilità proteica hanno reso difficili i primi tentativi di purificazione della TK1. Sherley e Kelly nel 1988 sono riusciti a purificare la TK1 per la prima volta estraendola da cellule HeLa sincronizzate in fase S, dove l'attività timidino chinasi era elevata e stabilizzando l'enzima per aggiunta di digitonina nel tampone di purificazione (Sherley e Kelly, 1988). Dall'elettroforesi in condizioni denaturanti hanno ottenuto un polipeptide di 24 kDa e, poiché la proteina nativa aveva una massa molecolare di 96 kDa, hanno dedotto che la TK1 in soluzione fosse un tetramero. Il meccanismo di reazione e l'attività catalitica dell'enzima *in vitro* sono regolati dall'ATP. Infatti, la TK1 in presenza di ATP o di ATP e timidina è un tetramero, ma rimuovendo l'ATP si osserva una transizione reversibile alla forma dimerica. E' stato inoltre osservato che in presenza di basse concentrazioni di timidina e di livelli saturanti di ATP la TK1 è in forma di dimero ma che, all'aumentare della concentrazione del substrato, subisce una conversione alla forma più attiva di tetramero. La tetramerizzazione è quindi determinata dalla concentrazione del substrato e l'ATP ha il ruolo di stabilizzare l'enzima nella sua forma più attiva (Munch-Petersen et al., 1993).

Sono stati condotti numerosi studi al fine di comprendere i processi che regolano l'espressione e l'attività della TK1. Questo enzima viene infatti regolato a livello trascrizionale, traduzionale e post- traduzionale in base alle fasi del ciclo cellulare. In cellule ciclanti la trascrizione della TK1 è specifica della fase S e i livelli di trascritto rimangono pressoché costanti durante la progressione del ciclo cellulare. In queste cellule l'attività della TK1, molto bassa durante la fase G₁, aumenta significativamente tra la fase S e la G₂ raggiungendo il picco durante la mitosi. Poiché queste variazioni non si accompagnano a corrispondenti cambiamenti nel contenuto di mRNA, sono state attribuite al blocco della traduzione e all'instabilità della proteina (Arner e Eriksson, 1995). Nella regione C-terminale della TK1 umana è stata infatti dimostrata l'esistenza di una sequenza di 40 aminoacidi conservata anche in pollo, criceto e topo fondamentale per la degradazione della proteina durante la mitosi. Questa sequenza, contiene un sito KEN riconosciuto dal complesso APC/C-Cdh1. La TK1 una volta ubiquitinata viene degradata nei proteasomi durante la mitosi (Ke e Chang, 2004). In

cellule quiescenti l'assenza di attività della TK1 si accompagna invece ad un contenuto di mRNA molto basso, implicando quindi la soppressione della trascrizione (Wintersberger *et al.*, 1992).

La TK2 è stata purificata per la prima volta da linfociti di milza umana (Munch-Petersen *et al.*, 1991) dove è stata purificata nuovamente anche la TK1. Nella forma attiva la TK2 è un monomero di 29 kDa sia in presenza che in assenza di ATP e timidina. La TK2 presenta un'elevata similarità di sequenza con la dCK e la dGK che nelle loro forme attive sono dei dimeri. Questa considerazione ha messo in discussione la natura monomerica della TK2 nella forma nativa. In esperimenti successivi, condotti con la TK2 ricombinante murina, è stato infatti dimostrato che l'enzima attivo è un dimero. I risultati ottenuti in precedenza sono stati attribuiti a degli artefatti dovuti alla modalità di estrazione della proteina (Wang e Eriksson, 2000).

In seguito alla purificazione le due timidina chinasi sono state caratterizzate anche da un punto di vista cinetico. La TK1 è in grado di fosforilare solamente la timidina e la deossiuridina e i valori di K_m per i due substrati sono rispettivamente di 0.5 μM e 9 μM . La TK2 invece, oltre alla timidina fosforila anche la deossicitidina e la deossiuridina. La timidina viene fosforilata secondo una cinetica di cooperazione negativa per cui mostra due valori di K_m (16 μM e 0.3 μM) a seconda che le concentrazioni del substrato siano superiori o inferiori a 10 μM . Per la fosforilazione della deossicitidina e della deossiuridina viene invece seguita una cinetica di tipo Michaelis-Menten. In questo caso, con concentrazioni di substrato superiori a 10 μM , i valori di K_m sono rispettivamente pari a 36 μM e 6 μM . L'ATP e il CTP sono i donatori di fosfato rispettivamente nelle attività timidino chinasi e deossicitidino chinasi della TK2 con valori di K_m pari a 2 μM e 6 μM , quando il substrato è la timidina e 3 μM e 9 μM , quando il substrato è la deossicitidina. L'attività della TK2 viene inibita dal dTTP e dal dCTP che agiscono come inibitori competitivi (Munch-Petersen *et al.*, 1991).

Le due timidina chinasi oltre a fosforilare i loro substrati naturali possono anche fosforilare con specificità diverse alcuni analoghi pirimidinici impiegati come farmaci antivirali e antitumorali (es. AZT: azidotimidina, BVDU: (E)-5-(2-bromovinil)-2'-deossiuridina). Questi farmaci sono attivati mediante la fosforilazione da parte delle deossiribonucleoside chinasi. Alcuni di questi

composti competono con i substrati naturali e possono essere impiegati sia come substrati che come inibitori in saggi enzimatici *in vitro*.

1.4.2 Clonaggio della timidina chinasi mitocondriale

Nel lavoro pubblicato nel 1984, Bradshaw e Deininger hanno illustrato i risultati del clonaggio del gene della TK1 umana (Bradshaw e Deininger, 1984). La sequenza di cDNA riportata codificava una proteina con un peso molecolare di 25.5 kDa in accordo con quanto ottenuto dalla purificazione della TK1. La clonazione del gene della TK2 ha incontrato diversi ostacoli soprattutto per quanto riguarda l'identificazione della sequenza di localizzazione mitocondriale. La gran parte delle proteine mitocondriali sono infatti codificate dal DNA nucleare, sintetizzate nel citosol e importate nel mitocondrio grazie ad un segnale N-terminale che ne dirige la traslocazione. Questa sequenza è caratterizzata da un elevato contenuto di aminoacidi basici e idrofobici, pochi residui acidi e una struttura ad α - elica. Nel 1997 è stato effettuato un primo tentativo di clonaggio del gene della TK2. Questa sequenza codificava una proteina con circa il 30% di similarità con la dCK e la dGK ma non comprendeva un segnale di traslocazione mitocondriale (Johansson e Karlsson, 1997). Questo segnale era stato invece individuato nella clonazione del gene della dGK (Johansson e Karlsson, 1996). Con analisi Northern blot è stata verificata l'espressione ubiquitaria della TK2 con livelli maggiori in pancreas, fegato, muscolo e cervello. In seguito, basandosi sulle sequenze aminoacidiche della TK2 di cervello umana e bovina, è stato ottenuto un cDNA codificante una sequenza di 232 aminoacidi (Wang et al., 1999). Questa sequenza combaciava con quella della TK2 nativa ma non era ancora completa all'estremità N-terminale. Questa regione è infatti risultata ricca di elementi ripetuti che ne rendevano difficile la retro trascrizione. In questo lavoro sono state inoltre confrontate le proprietà cinetiche dell'enzima ricombinante tronco con quelle della TK2 nativa e sono risultate indistinguibili (Wang et al., 1999). La mancata identificazione della sequenza N-terminale della TK2 umana aveva avvalorato l'ipotesi dell'esistenza di una forma citosolica dell'enzima. Tuttavia, la clonazione della TK2 in topo ha confermato la sua localizzazione mitocondriale. Il cDNA di topo codificava una proteina di 270 aminoacidi comprendente una sequenza di 40 residui all'N-terminale che in

saggi *in vitro* si è dimostrata indispensabile per l'importo dell'enzima nei mitocondri (Wang e Eriksson, 2000). La sequenza N-terminale oltre a dirigere la traslocazione dell'enzima sembra regolare anche la sua stabilità determinandone la rapida degradazione nel caso rimanga nel citosol. Nel 2003 impiegando la sequenza di cDNA della TK2 umana riportata da Wang et *al.*, nel 1999, è stata analizzata una libreria genomica umana di BAC. Ciò ha consentito la caratterizzazione dell'intera sequenza del gene della TK2 umana (fig. 4).

```

atg ctg ctg tgg ccg ctg cgg gcc tgg gcc gcc cgg gcg ctg cgc
M L L W P L R G W A A R A L R 15
tgc ttt ggg ccg gga agt cgc ggg agc ccg gcc tca ggc ccc ggg
C F G P G S R G S P A S G P G 30
ccg cgg agg gtg cag cgc cgg gcc tgg cct ccc gat aaa gaa cag
P R R V Q R R A W P P D K E Q 45
gaa aaa gag aaa aaa tca gtg atc tgt gtc gag ggc aat att gca
E K E K K S V I C V E G N I A 60
agt ggg aag acg aca tgc ctg gaa ttc ttc tcc aac gcg aca gac
S G K T T C L E F F S N A T D 75
gtc gag gtg tta acg gag cct gtg tcc aag tgg aga aat gtc cgt
V E V L T E P V S K W R N V R 90
ggc cac aat cct ctg ggc ctg atg tac cac gat gcc tct cgc tgg
G H N P L G L M Y H D A S R W 105
ggt ctt acg cta cag act tat gtg cag ctc acc atg ctg gac agg
G L T L Q T Y V Q L T M L D R 120
cat act cgt cct cag gtg tca tct gta cgg ttg atg gag agg tcg
H T R P Q V S S V R L M E R S 135
att cac agc gca aga tac att ttt gta gaa aac ctg tat aga agt
I H S A R Y I F V E N L Y R S 150
ggg aag atg cca gaa gtg gac tat gta gtt ctg tcg gaa tgg ttt
G K M P E V D Y V V L S E W F 165
gac tgg atc ttg agg aac atg gac gtg tct gtt gat ttg ata gtt
D W I L R N M D V S V D L I V 180
tac ctt cgg acc aat cct gag act tgt tac cag agg tta aag aag
Y L R T N P E T C Y Q R L K K 195
aga tgc agg gaa gag gag aag gtc att ccg ctg gaa tac ctg gaa
R C R E E E K V I P L E Y L E 210
gca att cac cat ctc cat gag gag tgg ctc atc aaa ggc agc ctt
A I H H L H E E W L I K G S L 225
ttc ccc atg gca gcc cct gtt ctg gtg att gag gct gac cac cac
F P M A A P V L V I E A D H H 240
atg gag agg atg tta caa ctc ttt gaa caa aat cgg gat cga ata
M E R M L Q L F E Q N R D R I 255
tta act cca gag aat cgg aag cat tgc cca
L T P E N R K H C P 265

```

Fig. 4 Sequenza aminoacidica e di cDNA della TK2 come descritta in Wang et *al.*, 2003 (Accession number cDNA: Y10498, proteina: CAA71523). In rosso è evidenziato il segnale N-terminale di traslocazione al mitocondrio

Il gene della TK2 è risultato occupare un frammento di 45 kb nel cromosoma 16 ed essere costituito da 10 esoni e 9 introni. Il segnale di traslocazione al mitocondrio è codificato nell'esone 1. Questo segnale è omologo a quello di topo ma vi sono delle differenze nella posizione del sito ipotetico di taglio che

nell'uomo è stato localizzato tra i residui 33 e 34. Con il completamento della sequenza N-terminale della TK2 è stata quindi confermata la localizzazione mitocondriale dell'enzima (Wang *et al.*, 2003).

1.4.3 Saggi dell'attività timidino chinasi della timidina chinasi mitocondriale

Le analisi condotte sulla TK2 purificata hanno mostrato che la sua specificità di substrato si sovrappone a quella della TK1 e della dCK. Tuttavia gli enzimi citosolici hanno un'efficienza maggiore nel fosforilare i substrati comuni con la TK2. Nella fosforilazione della timidina, ad esempio, la TK1 è 15-20 volte più efficiente della TK2 (Munch-Petersen *et al.*, 1991). I saggi di attività enzimatica vengono condotti in estratti cellulari utilizzando dei substrati radioattivi. La contemporanea presenza dei tre enzimi negli estratti proteici rende tuttavia difficile discriminare l'attività della TK2 da quella delle altre due chinasi. Per cercare di ovviare a questo problema diversi gruppi hanno proposto l'impiego di substrati naturali o di analoghi pirimidinici sia come substrati che come inibitori nei saggi enzimatici.

Nel 1992 il gruppo di Eriksson ha proposto la combinazione di diverse condizioni da cui ricavare l'attività della TK2. Questo protocollo sfrutta le proprietà dell'AraT (arabinofuranosil timidina) e dell'AZT di essere fosforilate di preferenza rispettivamente dalla TK2 e dalla TK1 (tab. 2).

substrato	% attività enzimatica	
	TK1	TK2
TdR (10 μ M)	100	100
AraT (100 μ M)	6.4	130
AZT (20 μ M)	40	5

Tab. 2 Percentuale di fosforilazione di AraT e AZT da parte della TK1 e della TK2 rispetto alla fosforilazione della timidina (TdR) da parte di ciascun enzima. 100% corrisponde a 9918 nmol/mg/min per la TK1 e 680 nmol/mg/min per la TK2 (Arnér *et al.*, 1992)

Tuttavia, poiché l'attività della TK1 in cellule proliferanti è molto superiore a quella della TK2, le piccole percentuali di AraT fosforilate dall'enzima citosolico possono interferire nella misurazione dell'attività dell'enzima mitocondriale. In

alternativa nello stesso lavoro è stato proposto un saggio enzimatico in cui l'attività relativa della TK1 e della TK2 poteva essere valutata impiegando l'AZT in combinazione con timidina o AraT (Arnér *et al.*, 1992).

In lavori più recenti l'attività della TK2 è stata invece ricavata indirettamente sfruttando la capacità dell'enzima di fosforilare sia la timidina che la deossicitidina. In un caso viene misurata la fosforilazione di timidina radioattiva in presenza o in assenza di deossicitidina non marcata per inibire la TK2 (Wang e Eriksson, 2000). In un secondo caso invece come substrato viene fornita deossicitidina radioattiva che verrà fosforilata sia dalla dCK che dalla TK2, ma l'attività di quest'ultima viene inibita con un eccesso di timidina fredda (Rylova *et al.*, 2005). In entrambi i protocolli l'attività della TK2 viene quindi ricavata sottraendo ai valori di attività enzimatica totali quelli ottenuti in presenza degli inibitori.

Questi sistemi di valutazione sono tuttavia dei metodi di misurazione indiretti e poco affidabili. La messa a punto di un saggio enzimatico per la valutazione diretta dell'attività della TK2, non sensibile della presenza della TK1, è parte di questo lavoro.

1.5 Trasportatori proteici mitocondriali

I mitocondri sono sede della fosforilazione ossidativa, del ciclo dell'acido citrico e dell'ossidazione degli acidi grassi. Per garantire queste attività metaboliche è necessario il rapido e specifico scambio di molecole tra il citosol e la matrice mitocondriale. Nelle cellule eucariotiche il trasporto attraverso la membrana mitocondriale interna è catalizzato dall'insieme di proteine della grande famiglia dei trasportatori mitocondriali (mitochondrial carrier family, MCF). La maggior parte di questi trasportatori sono specifici per anioni, ma in alcuni casi vengono trasportati anche cationi. Le MCP (mitochondrial carrier protein) sono codificate da geni nucleari, nell'uomo dai geni *slc25*, e vengono successivamente importate nella membrana mitocondriale interna dove sono presenti in quantità molto ridotte. Alcune sono presenti in tutti i tessuti mentre altre mostrano una tessuto specificità determinata dalla loro funzione. L'analisi delle sequenze aminoacidiche delle prime MCP descritte ha evidenziato l'esistenza di molte caratteristiche conservate (Palmieri, 1994). Mostrano infatti una struttura

tripartita costituita da tre ripetizioni omologhe di circa 100 aminoacidi. Ciascuna ripetizione è formata da due domini ad α -elica transmembrana connessi da un'ansa idrofila. Questa ansa contiene una sequenza altamente conservata nota come “mitochondrial signature motif” così costituita: P-h-D/E-h-h-K/R-h-R/K-(20-30 aminoacidi)-D/E-G-(4 aminoacidi)-a-K/R-G dove “h” sta per idrofobico ed “a” per aromatico. Le due estremità C- ed N-terminali sporgono nel citosol dallo stesso lato della membrana e sono opposte rispetto alle anse idrofiliche (fig. 5). Queste caratteristiche hanno facilitato le ricerche di nuove MCP nei database genomici umani, di *Saccharomyces cerevisiae*, di *Arabidopsis thaliana* e di altri organismi.

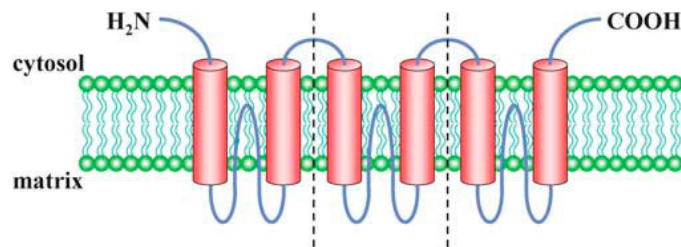


Fig. 5 Rappresentazione dell'organizzazione spaziale delle MCP in membrana

Gli studi per la caratterizzazione dei substrati trasportati sono stati in genere effettuati con le proteine ricombinanti purificate e ricostituite in proteoliposomi. Alcuni di questi trasportatori sono specifici per il trasporto di nucleotidi. Tra questi il trasportatore AAC (ATP/ADP carrier) è stato identificato nell'uomo e in molti altri organismi in tre diverse isoforme la cui espressione è regolata in base alle richieste energetiche o allo stato di differenziamento cellulare. AAC1 è la proteina più abbondante nella membrana mitocondriale ed è la prima MCP identificata. Da analisi filogenetiche tra i trasportatori mitocondriali di lievito è stato identificato un trasportatore di GTP/GDP (Ggc1p) la cui funzione principale sembra essere il trasporto di (d)GTP dal citosol ai mitocondri in scambio di GDP (Voza et al., 2004). In lievito è stato inoltre caratterizzato un trasportatore di nucleotidi pirimidinici, Rim2p, fondamentale per il mantenimento dell'integrità del mtDNA. Rim2p media lo scambio di tutti i (deossi)nucleotidi con una maggiore affinità per i di- e tri-fosfati (Marobbio et al., 2006). Rim2p mostra un'elevata identità di sequenza con le proteine umane codificate dai geni *slc25a33*

e *slc25a36* (fig. 6).

Nel 2005 Arco ha raggruppato tutte le informazioni note fino a quel momento sia riguardanti le MCP umane già caratterizzate che quelle non ancora classificate, associandole ai rispettivi ortologi in lievito (Arco e Satrústegui, 2005). In uno studio recente sono stati identificati nell'uomo 14 nuovi membri della famiglia SLC25 il cui numero complessivo ammonta a 46 (Haitina et al., 2006), tuttavia per molti di questi la funzione è ancora ignota.

1.5.1 Trasportatori coinvolti negli scambi dinamici tra i pool citoplasmatici e mitocondriali

I nucleosidi trifosfato presenti all'interno dei mitocondri possono derivare da due diverse fonti: i nucleosidi possono diffondere o essere trasportati, se troppo idrofilici, all'interno dei mitocondri oppure, possono essere fosforilati dalle chinasi nel citoplasma e successivamente trasportati nei mitocondri. Nell'uomo il trasporto di nucleosidi è mediato da hENT1 (Human equilibrative nucleoside transporter 1). Con esperimenti di microscopia confocale è stato infatti provato che il trasportatore hENT1 oltre che nella membrana plasmatica, è presente anche in quella mitocondriale ed esperimenti condotti su mitocondri isolati, hanno dimostrato che hENT1 è in grado di trasportare all'interno dei mitocondri sia uridina che il suo analogo fialuridina marcati isotopicamente (Lai et al., 2004).

Le prime prove dell'esistenza di uno scambio di deossiribonucleotidi attraverso la membrana mitocondriale sono state ottenute durante studi sulla dideossicitidina (ddC) come inibitore del virus dell'HIV. La ddC nelle cellule viene fosforilata dalla dCK e la sua forma trifosfato (ddCTP) causa deplezione del mtDNA poiché è un potente inibitore della DNA polimerasi γ . Esperimenti condotti in cellule linfoblastoidi dCK⁺ e dCK⁻ hanno dimostrato che, quando la dCK è attiva, il ddCTP sintetizzato nel citoplasma può essere trasferito all'interno dei mitocondri provocando deplezione del mtDNA. Lo stesso effetto non si osserva nelle cellule dCK⁻ (Chen e Cheng, 1992). Durante studi sulla sintesi del mtDNA è stato inoltre osservato che incubando mitocondri estratti da fegato di ratto, con ³²P-ddCTP il nucleotide viene impiegato nella sintesi del mtDNA. Il ritrovamento della radioattività all'interno dei mitocondri poteva essere spiegata con l'esistenza di specifici trasportatori di membrana (Enríquez et al., 1994). L'esistenza di

scambi dinamici di nucleotidi citoplasmatici e mitocondriali è stata poi confermata con esperimenti di flusso isotopico in cellule TK1⁻ (Pontarin et al., 2003) (vedi paragrafo 1.3). Più di recente sono state fornite le prove dello scambio di fosfati timidinici tra mitocondri e citosol. Infatti, fornendo a mitocondri isolati da fegato di topo 5 nM di dTMP radioattivo, questo viene rapidamente importato all'interno dei mitocondri con una concomitante diminuzione della sua concentrazione nel mezzo di incubazione. Inoltre, ripetendo l'esperimento con dTTP radioattivo questo viene trasferito nei mitocondri solo dopo essere stato degradato a dTMP e timidina (Ferraro et al., 2006). Questi dati indicano l'esistenza di un trasportatore altamente specifico per l'importo di dTMP all'interno dei mitocondri che tuttavia non è stato ancora caratterizzato. Bridges e collaboratori hanno invece fornito le prove della probabile esistenza di un trasportatore mitocondriale per il dCTP. In questo caso gli esperimenti sono stati condotti su una mistura eterogenea di proteine di membrana mitocondriale purificate e ricostituite in proteoliposomi. Il ³²P-dCTP fornito nel mezzo di incubazione viene ritrovato anche all'interno dei liposomi in modo proporzionale alla quantità di proteine. Questo trasporto è inoltre inibito dall'ATP e specifico per il dCTP (Bridges et al., 1999). Nonostante ciò anche per questo trasporto il responsabile molecolare non è stato ancora individuato.

1.5.2 Caratterizzazione di *SLC25A19*

Nel 2001 il prodotto del gene umano *slc25a19* appartenente alla famiglia delle MCP è stato identificato come il trasportatore dei deossiribonucleotidi (deoxyribonucleotide carrier, DNC) responsabile del trasporto dei deossiribonucleotidi all'interno dei mitocondri (Dolce et al., 2001). La proteina ricostituita in liposomi è infatti risultata capace di trasportare i dNDP e con efficienza minore i (d)dNTP, in scambio con ADP o ATP. Queste osservazioni hanno attribuito alla DNC un ruolo importante per l'apporto di precursori per la sintesi del mtDNA. Il gene *slc25a19* è mutato nei casi di microcefalia della popolazione Amish (MCPHA) (Rosenberg et al., 2002). Questa patologia è caratterizzata da una severa microcefalia congenita, da un elevato contenuto di α -chetoglutarato nelle urine e conduce alla morte precoce durante l'infanzia. Diversi lavori hanno tuttavia fornito prove indipendenti che provano l'errata

individuazione di DNC come trasportatore dei deossiribonucleotidi. Lam e collaboratori hanno osservato che, nel lavoro di Dolce, sono state impiegate concentrazioni di deossiribonucleotidi e proporzioni tra deossi- e ribonucleotidi non corrispondenti a quelle fisiologiche. Inoltre, fornendo alle cellule ddCTP, queste non divenivano più resistenti alla deplezione del mtDNA se DNC veniva silenziato e non mostravano un incremento della deplezione in seguito alla sovraespressione del gene (Lam et al., 2005). I risultati ottenuti dal topo knock-out per il gene *slc25a19* e analisi di sequenza hanno suggerito una funzione alternativa della DNC. *slc25a19* mostra infatti una similarità di sequenza molto elevata con il trasportatore della tiamina pirofosfato (TPP) di *Saccharomyces cerevisiae*, soprattutto nel sito di legame del substrato (Kang e Samuels, 2008). Questo composto è un cofattore di molti enzimi citosolici e mitocondriali ed è un co-enzima per il ciclo di Krebs. Il genotipo *slc25a19*^{-/-} in topo provoca la morte durante l'embriogenesi, tuttavia negli embrioni non sono state riscontrate deplezioni del mtDNA o diminuzioni dei pool dei dNTP nel mitocondrio. La concentrazione di TPP negli embrioni knock-out era invece non rilevabile rispetto a quella misurata negli embrioni di controllo (Lindhurst et al., 2006). In base a queste osservazioni sembra quindi più probabile che il prodotto del gene *slc25a19*, se è un trasportatore, sia coinvolto nel trasporto di TPP nell'uomo e che il suo ruolo nel trasporto di deossiribonucleotidi sia di minore importanza.

1.5.3 Due ipotetici trasportatori mitocondriali di deossiribonucleotidi: SLC25A33 e SLC25A36

Nel 2004 in cellule stromali di midollo osseo umano è stato individuato un nuovo componente della famiglia dei trasportatori mitocondriali denominato HuBMSC-MCP (Wang et al., 2004). Il suo gene *slc25a33*, privo di introni è stato localizzato nel cromosoma 11 e codifica una proteina di 321 aminoacidi con un peso molecolare di 35.4 kDa. HuBMSC-MCP, o SLC25A33, può essere codificato anche da un altro gene localizzato sul cromosoma 1 costituito da sette esoni e sei introni ma i cDNA sono identici. HuBMSC-MCP mostra inoltre il 60% di identità aminoacidica (fig. 6) con una MCP non ancora caratterizzata il cui gene, *slc25a36*, è localizzato nel cromosoma 3 (Arco e Satrústegui, 2005).

```

slc25a33      -----MATGGQQKENTL-----LHLFAGG
slc25a36      -----MSQRDTL-----VHLFAGG
Rim2p         MPKKSIEWEEDAIESVPYLASDEKGSNYKEATQIPLNLKQSEIENHPTVKPWWHFVAGG
               :. *                               :*.***

slc25a33      CGGTVGAIFTCPLEVIKTRLQSSRLALRTVYYPQVHLGTISGA---GMVRPTSVTPG--
slc25a36      CGGTVGAILTCPLEVVKTRLQSSSV---TLYISEVQLNTMAGA---SVNR--VVSPG--
Rim2p         IGGMAGAVVTCPPFDLVKTRLQSDI-FLK--AYKSQAVNISKGSTRPKSINY--VIQAGTH
               ** .**:.***:::*****. . .: .: :.*

slc25a33      ---LFQVLKSILEKEGPKSLFRGLGPNLVGVAPSRAVYFACYSKAKEQFNGIFV--PNSN
slc25a36      ---PLHCLKVILEKEGPRSLFRGLGPNLVGVAPSRAIYFAAYSNCKEKLNDFD--PDST
Rim2p         FKETLGIIGNVYKQEGFRSLFKGLGPNLVGVIPARSINFFTYGTTKDMYAKAFNNGQETP
               : : : :*: :*:***** *:*: * *.. *: * :

slc25a33      IVHIFSAGSAAFITNSLMNPIMVVKTRMQLEQKVRGSKQ--MNTLQCARYVYQTEGIRGF
slc25a36      QVHMISAAMAGFTAITATNPILIKTRLQLDARNRGERR--MGAFECVRKVYQTDGLKGF
Rim2p         MIHLMAAATAGWATATATNPILIKTRVQLDKAGKTSVRQYKNSWDCLKSVIRNEGFTGL
               :*::*. *: : : *****:***:  : . : .: * : * :*: :

slc25a33      YRGLTASYAGISETIICFAIYESLKLYLKEA---PLASSANGTE---KNSTSFGLMAAA
slc25a36      YRGMSASYAGISETVIHFVIESIKQLLEY---KTASTMENDEESVKEASDFVGMMLAA
Rim2p         YKGLSASYLGSVEGILQWLLYEQMKRLIKERSIEKFGYQAEGTKSTSEKVKEWCSRSGSA
               *:*:*** * * : : :*:*: : * . : : : : : :

slc25a33      ALSKGCASCIAYPHEVIRTRLR---EEGT-KYKSFVQTARLVFREEGYLAFYRGLFAQL
slc25a36      ATSKTCATTIAYPH-VVTRTRLR---EEGT-KYRSFQTLSSLVQEEGYGSLYRGLTHL
Rim2p         GLAKFVASIATYPHEVVRTRLRQTPKENGKRKYTGVLQSFKVIKEEGLFSMYSGLTPHL
               . :* *: :*** *:***** *:*. ** ..*: :*:*** :* ** .:*

slc25a33      IRQIPNTAIVLSTYELIVYLLEDRTQ
slc25a36      VRQIPNTAIMMATYELVVYLLNG---
Rim2p         MRTVPNSIIMFGTWEIVIRLLS----
               :* **: :*:*.***: :*.

```

Fig. 6 Allineamento delle sequenze aminoacidiche di SLC25A33, SLC25A36 e Rim2p. (*) identità di residuo, (:) sostituzioni conservative, (.) sostituzioni semi-conservative

La sequenza proteica di HuBMSC-MCP possiede tre domini di circa 100 aminoacidi conservati tra i trasportatori mitocondriali e uno dei caratteristici mitochondrial signature motif delle MCP. Inoltre, l'analisi del profilo idrofobico ha prodotto una struttura organizzata in 6 eliche transmembrana con le estremità C- ed N-terminali affacciate verso il citosol. HuBMSC-MCP sembra avere una elevata espressione nel muscolo scheletrico e nei testicoli ed essere invece moderatamente presente in cuore, cervello, fegato, reni, prostata, colon e leucociti di sangue periferico. La sua espressione non è invece stata rilevata in placenta, polmoni, pancreas, milza, timo, ovaie e piccolo intestino. Inoltre analisi di real-time PCR hanno dimostrato che HuBMSC-MCP è espresso anche in molte linee cellulari tumorali. In cellule MCF-7 trasfettate per indurre l'espressione della proteina coniugata alla GFP è stato dimostrato che HuBMSC-MCP si localizza nei mitocondri, infatti la fluorescenza della GFP combaciava con quella del colorante mitocondriale MitoTracker Red CMXRos. Nonostante la sua localizzazione, è stata esclusa la partecipazione di HuBMSC-MCP nei processi di apoptosi dove i mitocondri giocano un ruolo fondamentale. HuBMSC-MCP è

stato localizzato nelle protrusioni pseudopodiche delle cellule MCF-7 e in cellule dendritiche la sua espressione induce un incremento della capacità endocitotica. Poiché sia la formazioni degli pseudopodi che l'endocitosi necessitano di elevate quantità di energia, è stato ipotizzato il coinvolgimento di HuBMSC-MCP nel trasporto di substrati per il processo di fosforilazione ossidativi (Wang et al., 2004).

Floyd e collaboratori hanno investigato la funzione di HuBMSC-MCP che è risultato essere uno dei geni la cui espressione è indotta da insulina e IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) attraverso la via di trasduzione del segnale mediata da PI-3 chinasi e serina-treonina chinasi mTOR. In questo lavoro HuBMSC-MCP viene denominato PNC1 per l'identità di sequenza con Rim2p che in lievito è un trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici (Van Dyck et al., 1995; Marobbio et al., 2006). Oltre a confermare la localizzazione di PNC1 sulle membrane mitocondriali hanno osservato come la sovraespressione di PNC1 induca l'aumento delle dimensioni cellulari mentre il suo silenziamento si accompagna alla diminuzione delle dimensioni cellulari e al rallentamento della proliferazione cellulare durante la fase G₁. PNC1 è quindi coinvolto nella regolazione della crescita cellulare. In saggi di trasporto in liposomi, PNC1 purificato è in grado di mediare lo scambio di ³H- UTP/UTP e in minore quantità anche di ³H- TTP/TTP e ³H- CTP/CTP. Questa attività è stata confermata dalla diminuzione del contenuto di UTP nei mitocondri di cellule MCF-7 dove PNC1 è stato silenziato (Floyd et al., 2007). In seguito a queste osservazioni PNC1 è stato identificato come il primo trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici.

2. SCOPO

Il mantenimento di un pool del dTTP bilanciato è importante per garantire la corretta replicazione e riparazione del DNA. Mutazioni in enzimi coinvolti nel metabolismo del dTTP, quali la timidina chinasi mitocondriale e la timidina fosforilasi, causano patologie note come sindromi da deplezione del DNA mitocondriale che dipendono dallo sbilanciamento dei dNTP. All'interno delle cellule il dTTP necessario per la sintesi del mtDNA può essere sintetizzato direttamente all'interno dei mitocondri oppure, può derivare dal dTMP importato dal citoplasma. Durante il mio lavoro di dottorato ho studiato i sistemi che regolano il metabolismo del pool mitocondriale del dTTP durante la proliferazione cellulare e la quiescenza.

I risultati che vengono presentati di seguito sono il frutto di tre pubblicazioni in cui abbiamo indagato il ruolo della TK2 all'interno della rete di enzimi e fattori che modulano le dimensioni del pool mitocondriale del dTTP. Il nostro scopo è quello di individuare le condizioni in cui l'attività della TK2 è limitante per la sintesi del dTTP e cercare di delineare le basi metaboliche della tessuto-specificità osservata nella deficienza genetica per la timidina chinasi mitocondriale.

Per fare ciò abbiamo analizzato il pool del dTTP sia in fibroblasti di pelle umana dove la TK2 è stata silenziata mediante RNA interference (Rampazzo et al., 2007), sia in fibroblasti provenienti da pazienti affetti da MDS miopatica dove la TK2 è mutata (Frangini et al., 2009). Per misurare il grado di attività della TK2 negli estratti cellulari abbiamo sviluppato un saggio enzimatico specifico (Franzolin et al., 2006).

Successivamente abbiamo iniziato uno studio, che è tuttora in corso, avente lo scopo di identificare il trasportatore della membrana mitocondriale responsabile dell'importo del dTMP nell'organello.

- Franzolin E, Rampazzo C, Pérez-Pérez MJ, Hernández AI, Balzarini J, Bianchi V. *Bromovinyl-deoxyuridine: A selective substrate for mitochondrial thymidine kinase in cell extracts.* Biochem Biophys Res Commun. 2006; 344 (1): 30-6.

- 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.
- Frangini M, Rampazzo C, Franzolin E, Lara MC, Vilà MR, Martì R, Bianchi V. *Unchanged thymidine triphosphate pools and thymidine metabolism in two lines of thymidine kinase 2-mutated fibroblasts.*
FEBS letters 2009; 276: 1104-13.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Linee cellulari e condizioni di crescita

Per eseguire gli esperimenti sono state impiegate otto diverse linee cellulari manipolate in sterilità e controllate periodicamente per l'assenza di contaminazioni da micoplasmi mediante il metodo Venor GEM (Minerva Biolabs). Le cellule crescono in monostrato su piastre petri o fiasche sterili, all'interno di incubatori a 37° C umidificati e in presenza del 5% di CO₂ nell'atmosfera. E' stato impiegato terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a due diverse concentrazioni di glucosio addizionato con siero fetale bovino (FCS) ed antibiotici (streptomicina 50 µg/ml ed penicillina 60 µg/ml). Le linee cellulari impiegate e le rispettive composizioni del terreno di coltura sono riportate in tabella 3.

Linea cellulare	Caratteristiche	Terreno di coltura
HOS	Cellule di osteosarcoma umane	DMEM 4500 mg/l + 10% FCS
OST	Cellule di osteosarcoma umane TK1 ⁻	
CCD-Lu34	Fibroblasti umani di polmone	DMEM 4500 mg/l + 10% FCS + 5 mg/l Hepes (Sigma) + a.a. non essenziali (Sigma)
HEK 293	Cellule trasformate di rene embrionale umano	DMEM 1000 mg/l + 7% FCS
C63	Fibroblasti umani di pelle	DMEM 4500 mg/l + 10% FCS + 5 mg/l Hepes (Sigma) + a.a. non essenziali (Sigma)
C72	Fibroblasti umani di pelle	
Pa	Fibroblasti umani di pelle con TK2 mutata (T77M/R161K)	
Pb	Fibroblasti umani di pelle con TK2 mutata (R152G/K171del)	

Tab. 3 Linee cellulari impiegate e composizione del terreno di crescita

Quando la coltura cellulare raggiunge la confluenza le cellule vengono trapiantate

lavandole con una soluzione di versene contenente EDTA e staccandole mediante tripsina. Le cellule vengono quindi risospese nel terreno di coltura, il cui siero neutralizza la tripsina, e contate per mezzo di un Coulter Counter (Coulter Z1, Beckman coulter). I fibroblasti di pelle e di polmone, una volta raggiunta la confluenza, possono essere mantenuti in quiescenza per 10 giorno con terreno contenente 0.1% di FCS dializzato.

3.2 Silenziamento genico costitutivo e selezione dei cloni

Le cellule HEK 293 sono state trasfettate con quattro diversi plasmidi OriGene per ottenere il silenziamento stabile dei geni *slc25a33* e *slc25a36*. Si tratta di plasmidi pRS (retroviral silencing plasmid) contenenti sequenze retrovirali murine LTR (Long Terminal Repeats), un gene per la resistenza alla puromicina ed un promotore U6. Il promotore U6 media l'espressione di shRNA (short hairpin RNA) costituiti da due sequenze di 29 nucleotidi, uguali ed invertite, separate da una sequenza di 7 nucleotidi. Da questa struttura a forcina vengono prodotti degli siRNA (small interfering RNA) le cui sequenze gene-specifiche (tab. 4) inducono il silenziamento del gene bersaglio. Come controllo le cellule sono state trasfettate con il plasmide vuoto denominato 20003 dalla ditta OriGene. Dopo la trasfezione al terreno di coltura vengono aggiunti puromicina 0.5 µg/ml, per selezionare le cellule che hanno incorporato il plasmide e uridina 50 µg/ml, per sopperire all'eventuale sofferenza cellulare dovuta a danni mitocondriali..

Gene bersaglio	ID plasmide	Sequenza ripetuta negli shRNA
<i>slc25a33</i>	481	AGACCAACATCCGTGACACCTGGACTCTT
	482	ACCAGACCGAAGGCATTCGTGGCTTCTAT
	483	GGCTCTAAGCAGATGAATACACTCCAGTG
	484	CCTCCTGCATTGCTTATCCACACGAAGTC
<i>slc25a36</i>	497	CAGATTCCAAACACAGCCATTATGATGGC
	498	AGACTCGGTTACAGCTTGATGCAAGGAAC
	499	CTCTTTATCGTGGTCTGACAACATCATCTA
	500	CAGCTGAACACCATGGCTGGAGCCAGTGT

Tab. 4 Sequenze contenute nei plasmidi OriGene per il silenziamento dei geni *slc25a33* e *slc25a36*

Sono state da prima allestite delle colture policlonali e successivamente, delle colture clonali sulle quali è stato valutato il grado di silenziamento dei

geni *slc25a33* e *slc25a36*, rispetto ai cloni di controllo, mediante real-time PCR relativa.

3.3 Silenziamento genico transiente mediante siRNA

Per il silenziamento genico della TK2 in fibroblasti quiescenti e di *slc25a36* in HEK 293 le cellule sono state trasfettate in modo transiente con siRNA. Sono stati messi a punto due protocolli che hanno consentito nel primo caso di mantenere le cellule quiescenti in presenza di siRNA per dieci giorni senza essere mai trapiantate e nel secondo caso, di mantenere le cellule in divisione ma in presenza degli siRNA per un periodo sufficiente a consentire il turn-over delle proteine di membrana.

3.3.1 Silenziamento della timidina chinasi mitocondriale

Per silenziare il gene della TK2 in cellule C63 è stato impiegato un pool di quattro siRNA (Dharmacon) la cui sequenza è specifica per il riconoscimento dell'mRNA dell'enzima e come controllo un pool di quattro siRNA che non riconoscono alcun gene (tab. 5). E' stato seguito un protocollo che ha consentito di mantenere le cellule confluenti in presenza di siRNA per 10 giorni senza essere trapiantate. In piastre petri vengono seminate 0.75×10^6 cellule in presenza di 10% FCS. Dopo quattro giorni, quando hanno raggiunto il 90% di confluenza, vengono trasfettate con una concentrazione finale 50 nM di siRNA in un volume totale di 10 ml di medium contenente 10% FCS e privo di antibiotici. Durante la trasfezione gli siRNA vengono prima complessati con 0.036 ml di agente trasfettante DharmaFECT 1 in 1.8 ml di terreno Opti-MEM (Gibco) e successivamente aggiunti al terreno di coltura. Tre giorni dopo, il medium contenente gli siRNA viene diluito 1:1 con terreno fresco con 10% FCS e le cellule vengono lasciate per altri 4 giorni in presenza di 25 nM siRNA. In fine le cellule subiscono un'ultima trasfezione con 25 nM siRNA in terreno contenente 0.1% FCS dializzato per consentire gli esperimenti di marcatura che verranno eseguiti tre giorni dopo.

siRNA	Sequenza siRNA
ON-TARGETplus siCONTROL	5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3'
Non-Targeting pool	5'-UGGUUUACAUGUUUUCUGA-3'
(4 non-targeting siRNA)	5'-UGGUUUACAUGUUUCCUA-3'
	5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3'

Tab. 5 Sequenze dei 4 siRNA che costituiscono gli ON-TARGET plus SMART pool da impiegare come controllo

3.3.2 Silenziamento di *slc25a36*

Per spegnere il gene *slc25a36* in cellule HEK 293 si è dovuto ricorrere al silenziamento transiente impiegando un pool di 4 siRNA (Dharmacon) le cui sequenze sono riportate in tabella 6. Come controllo è stato impiegato un pool di 4 siRNA che non silenziano alcun gene (tab. 5).

siRNA	Sequenza senso
9	GCUUAUAAAGACUCGGUUA
10	GUGACUUACUAGUUACGAA
11	CCAAUGAAAUAGCGUCUAA
12	AAGAACAAGACUACGUGAA

Tab. 6 Sequenze dei 4 siRNA che costituiscono l'ON-TARGET plus SMART pool siRNA per il silenziamento genico di *slc25a36*

Le cellule HEK 293 vengono seminate in piastre petri ad una densità tale da raggiungere il 90% di confluenza il giorno successivo, quando verranno trasfettate. Durante la trasfezione gli siRNA vengono complessati in terreno Opti-MEM con 4 µl di agente trasfettante DharmaFECT 1 per ml di terreno e quindi addizionati al terreno di coltura senza antibiotici, alla concentrazione finale 70 nM. Il giorno seguente le cellule vengono staccate e riseminate in terreno senza antibiotici contenente 35 nM siRNA dove saranno lasciate per i successivi tre giorni. Le cellule vengono quindi mantenute in presenza degli siRNA per 96 ore totali.

3.4 Estrazione dell' RNA, sintesi del cDNA e real-time PCR relativa

Per verificare il grado di silenziamento ottenuto sia in modo transiente che costitutivo, viene valutato il livello di espressione di ciascun gene di interesse mediante real-time PCR relativa. Per estrarre l'RNA viene rimosso il terreno di coltura e le cellule vengono lisate con Trizol (Invitrogen). Dopo una breve incubazione a temperatura ambiente, si aggiungono 200 μ l di cloroformio per ml di Trizol e si agita vigorosamente per 15 secondi. Centrifugando a 4° C per 15 minuti a 12000 g la soluzione si separa in tre fasi e l'RNA viene raccolto prelevando la sola fase acquosa sovrastante. Si aggiungono quindi 500 μ l di isopropanolo e si centrifuga nuovamente a 12000 g per 10 minuti per far precipitare l'RNA. Il pellet dopo essere stato lavato con etanolo 75% e sedimentato per centrifugazione viene risospeso in acqua sterile Gibco e conservato a -80° C.

Per verificare l'integrità dell'RNA estratto viene effettuata una elettroforesi denaturante in gel all'1.5% di agarosio contenente formaldeide 2.2 M. La corsa avviene in un tampone di migrazione 1X così costituito: 20 mM MOPS pH 7.0, 2 mM sodio acetato, 1 mM EDTA pH 8.0.

Dopo aver quantificato l'RNA con il Nanodrop si procede alla sintesi del cDNA. La retrotrascrizione viene effettuata impiegando 1 μ g di RNA sciolto in un volume totale di 9 μ l H₂O. Dopo un'incubazione di 5 minuti a 65° C con dNTP 10 mM e primer Random Hexamer (Applied Biosystems) si aggiungono il tampone di reazione 5x e l'inibitore di RNasi (Applied Biosystems). Dopo un'incubazione di 2 minuti a 42° C viene aggiunta la trascrittasi inversa SuperScript II (Invitrogen) e si fa avvenire la retrotrascrizione in un termociclatore GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems) nelle seguenti condizioni: 42° C per 60 minuti, 70° C per 15 minuti. A reazione avvenuta il cDNA viene diluito in acqua alla concentrazione di 10 ng/ μ l e conservato a -20° C. Per verificare la purezza del cDNA e la riuscita della retrotrascrizione viene allestita una PCR di prova aggiungendo 3 μ l di cDNA ad un volume finale di 25 μ l di soluzione di reazione (1X tampone per Taq polimerasi, 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M primers di un gene housekeeping (β -actina o *hmbs*) (Vandesompele et al., 2002), 0.6 U Taq polimerasi (GE Helthcare), acqua). La reazione avviene in un termociclatore impostato secondo il seguente ciclo: 95° C per 5 minuti, (95° C per 30

secondi, 60° C per 1 minuto) x 40 volte, 4° C all'infinito. Il risultato viene osservato mediante elettroforesi in gel all'1% di agarosio.

Il contenuto di mRNA residuo del gene di interesse viene valutato mediante real-time PCR utilizzando come stampo il cDNA preparato in precedenza.

Nella reazione vengono impiegate separatamente due coppie di primers: una per il gene di interesse, e una per il gene housekeeping scelto per normalizzare i valori ottenuti. Per gli esperimenti in fibroblasti C63 è stato scelto come gene housekeeping la subunità A del complesso della succinato deidrogenasi (*sdha*), che mantiene lo stesso livello di espressione sia in cellule proliferanti che quiescenti mentre, con le cellule HEK 293 è stato impiegato il gene codificante la idrossimetilbilanosintasi (*hmbs*) (Vandesompele et al., 2002). Le sequenze dei primer vengono riportate in tabella 7. Per la valutazione del livello di espressione delle tre sub unità della RNR e di p53 sono stati impiegati primer le cui sequenze sono riportate in letteratura (Jordheim et al., 2005; Byun et al., 2002; Mrass et al., 2004).

Gene	Primer forward	Primer reverse
β -actina	GCGGGAAATCGTGCGTGACATT	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGT
<i>sdha</i>	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
<i>hmbs</i>	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC
<i>slc25a33</i>	ATGGCATTTTCGTGCCTAAC	TCTAGCTGCATTCGGGTTTT
<i>slc25a36</i>	TAGCCCCTTCCAGAGCAATA	TGCAGTAAAACCTGCCATTG
TK2	GCCCGGTGTTTCAGTGTTT	GGCAGCAGTTCAAGCAGGA

Tab. 7 Sequenze di alcuni primer impiegati per PCR e real-time PCR

La real time PCR avviene in piastre da 96 pozzetti in un volume di 25 μ l costituito da cDNA, 0.2 μ M primers e la miscela di reazione Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ogni reazione viene effettuata con diverse quantità di cDNA in triplice copia per poter valutare il mantenimento dell'efficienza di amplificazione. La reazione avviene nello strumento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) impostato con i seguenti parametri: 95° C per 10 minuti, (95° C per 25 secondi) per 37 cicli, 60° C per un minuto, 3 min a 72° C, 15 sec 95° C, 1 min 60° C, 95° C per 15 sec, 4° C all'infinito. I dati ottenuti vengono salvati tramite 7500 System Software.

Dopo aver analizzato le curve di amplificazione e aver fissato la soglia di

fluorescenza nell'intervallo di linearità, si costruisce un grafico ponendo il Log della quantità di cDNA usata in relazione ai Ct (ciclo threshold, soglia) ottenuti. Per ciascun campione si ottiene una retta il cui coefficiente angolare (m) viene impiegato per calcolare l'efficienza della reazione di PCR ($E = 10^{-1/m}$) che sarà tanto migliore quanto più prossima a 2. 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 (Pfaffl, 2001).

3.5 Estrazione del DNA e quantificazione del mtDNA mediante real-time PCR quantitativa

Il DNA totale delle cellule viene estratto con il sistema Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) e risospeso in TrisHCl 10 mM pH 7.5. Il DNA genomico viene quindi quantificato con lo strumento Nanodrop (Thermo Scientific) e la sua integrità viene verificata mediante elettroforesi in gel all'1% di agarosio. Per la quantificazione mediante real-time PCR viene applicato il sistema TaqMan dove l'uso di una sonda fluorigenica consente il rilevamento di uno specifico prodotto di PCR mentre questo si accumula durante i cicli di PCR. Le sonde TaqMan sono legate al 5' ad un fluoroforo detto reporter e all'estremità 3' ad uno detto quencher capaci di emettere rispettivamente a lunghezze d'onda corte e lunghe. Quando la sonda è integra, legata al DNA o in soluzione, i due fluorofori sono sufficientemente vicini perchè il quencher inibisca l'emissione del reporter grazie al processo di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Durante la PCR quando i primer si legano al DNA e la polimerasi estende il filamento nascente in direzione 5'-3', il fluoroforo reporter viene rilasciato ed emette energia che viene quantificata. Il numero di copie di mtDNA e di DNA nucleare nei campioni viene valutato in base ad una curva standard costruita con plasmidi pGEM-T (Promega) contenenti le sequenze per l'espressione di un gene di riferimento per il DNA nucleare (RNasiP) ed per il mtDNA (rRNA 12S). La curva standard viene costruita con diverse quantità di ciascun vettore calcolate per ottenere l'espressione di un numero crescente e determinato di molecole RNasiP e 12S in rapporto 1:100.

Per la rilevazione del mtDNA vengono impiegati i primer per il gene 12S in

associazione alla sonda per lo stesso gene mtDNA TaqMan probe (Applied Biosystems) coniugata al fluoroforo 6FAM (tab. 8), mentre per l'amplificazione del gene nucleare RNasiP sia i primer che la sonda coniugata al fluoroforo VIC sono contenuti nella soluzione PDARs (Pre-Developed Assay Reagent) RNaseP (Applied Biosystems). La reazione avviene in piastre da 96 pozzetti contenenti ciascuno un volume totale di 20 µl costituiti da: 2 µl di DNA genomico (10 ng/µl) o plasmidico (a diverse concentrazioni per la retta standard), 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1X PDARs RNaseP, 112 nM primer per il gene mitocondriale 12S e 125 nM di sonda per il gene 12S (mtDNA TaqMan probe).

Nome	Sequenza
Primer 12S forward	5'-CCACGGGAAACAGCAGTGATT-3'
Primer 12S reverse	5'-CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA-3'
mtDNA TaqMan probe	6FAM-5'-TGCCAGCCACCGCG-3'-MGB

Tab. 8 Sequenze dei primer e della sonda per il riconoscimento del gene ribosomale 12S codificato nel mtDNA. MGB= minor groove binder (non-fluorescent quencher), 6FAM= 6-carboxy-fluorescein

La PCR avviene nello strumento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) impostato con i seguenti parametri: 2 minuti a 50° C, 10 minuti 95° C e per 40 volte (15 secondi a 95° C, 1 minuto a 60° C). I risultati vengono analizzati tramite il 7500 System Software che fornisce in base alla curva standard il numero di molecole 12S ed RNasiP presenti in ciascun campione analizzato. Per calcolare il numero di copie di mtDNA in ciascuna cellula viene quindi calcolato il rapporto tra il numero di molecole ottenute per la referenza 12S del mtDNA e il numero di molecole della referenza per il DNA nucleare RNasiP.

3.6 Analisi con il citofluorimetro

Per valutare la distribuzione lungo il ciclo cellulare, la massa mitocondriale e le dimensioni cellulari è stato impiegato lo strumento FACScan (Becton Dickinson).

3.6.1 Analisi del ciclo cellulare

Per analizzare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare circa 1×10^6 cellule vengono lavate per due volte in PBS freddo e centrifugate a 4°C per 10 minuti a 500 g. Il pellet viene quindi risospeso in 1 ml di PBS e le cellule vengono fissate aggiungendo 2 ml di etanolo assoluto a gocce agitando dolcemente per evitare la formazione di ammassi. I campioni vengono quindi lasciati almeno una notte a 4°C . al momento dell'analisi ciascun campione viene sedimentato e lavato in 2 ml di acqua distillata. Il pellet ottenuto per centrifugazione viene risospeso in 900 μl di ioduro di propidio (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e 10 μl di RNasi (9 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Prima dell'analisi il campione così preparato viene incubato per un'ora a 37°C per consentire la colorazione del DNA. Le analisi vengono effettuate con il programma Modofit LT.

3.6.2 Analisi della massa mitocondriale e delle dimensioni cellulari

I geni *slc25a33* e *slc25a36* codificano due proteine della membrana mitocondriale e il loro spegnimento potrebbe avere conseguenze in termini di massa mitocondriale. Per analizzare questo aspetto le cellule HEK 293 silenziate e di controllo vengono incubate per 30 min a 37°C con 100 nM MitoTracker Green FM (Invitrogen). Le cellule vengono quindi staccate, sedimentate e lavate in PBS. Dopo una centrifugazione di 10 min a 500 g le cellule vengono risospese in PBS ed analizzate al citofluorimetro mediante il programma Cell Quest. La fluorescenza emessa è proporzionale alla massa mitocondriale. Negli stessi campioni viene inoltre valutata la dimensione delle cellule in base al parametro FSC (forward scatter) che è proporzionale alle dimensioni cellulari.

3.7 Estratti cellulari per saggi enzimatici

Per estrarre le proteine cellulari totali le cellule, seminate in piastre petri di 10 cm di diametro, vengono private del terreno di coltura e lavate per 3 volte con NaCl 0.9% a temperatura ambiente. Vengono quindi aggiunti 200-300 μ l di tampone di lisi 1x (Tris HCl pH 7.5 10 mM, TritonX 0.5%, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, inibitore di proteasi (Roche)) in base alla concentrazione cellulare. Le cellule vengono staccate con una spatola, raccolte in eppendorf e vorticate 50 secondi per rompere le membrane cellulari. Si aggiunge quindi 0.2 M NaCl per facilitare l'entrata in soluzione dell'estratto cellulare e dopo aver vorticato per 15 secondi si centrifuga a 4° C per 10 minuti a 19000 g. Il surnatante contenente le proteine viene trasferito in nuove eppendorf e conservato a -80° C. Per misurare la concentrazione delle proteine negli estratti cellulari viene utilizzato il metodo colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976). La concentrazione proteica in μ g/ μ l viene determinata in base ad una retta di taratura costruita con quantità note di BSA (albumina di siero bovino).

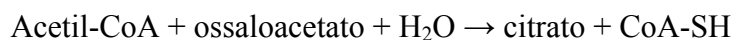
3.8 Saggi dell'attività timidino chinasi

Per la messa a punto dei saggi di attività della TK2 negli estratti proteici sono stati impiegati diversi nucleosidi marcati isotopicamente come substrati (3 H-TdR (Perkin-Elmer), 3 H-BVDU e 3 H-AraT (Moravek Biochemicals)). La reazione avviene in un volume totale di 40 μ l con quantità variabili di proteine in base alla linea cellulare da cui è stato preparato l'estratto. Le proteine vengono dissolte in un tampone di diluizione 2x (1mg/ml BSA, 10 mM TrisHCl pH 7.5, 2 mM DTT, 5 mM ATP) per un volume finale di 20 μ l. A queste vengono quindi aggiunti 20 μ l della soluzione di reazione 2x composta da 100 mM TrisHCl pH 7.5 (pH 8 con 3 H-AraT), 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 10 mM NaF (20 mM con 3 H-AraT e 3 H-CdR), 4 mM DTT e il substrato marcato isotopicamente. Per ciascuna concentrazione di substrato viene preparata una reazione senza proteine da impiegare come background. Dopo aver scoperto che l'idrolisi della 3 H-BVDU a BVU e 3 H-deossiribosio-1-fosfato, catalizzata dalla TP, interferisce con i risultati del saggio, alla mix di reazione con questo substrato è stato aggiunto 5-bromouracile (5BU, Sigma) 50 μ M, inibitore della TP. Per inibire l'attività della

TK2 è stato impiegato l'inibitore specifico KIN109 (Pérez-Pérez *et al.*, 2008) sciolto in DMSO e aggiunto alla reazione in quantità pari al 10% del volume. La TK2 è stata inoltre inibita con 500 o 1000 μM CdR nella fosforilazione di ^3H -TdR e con 1000 μM TdR in quella di 10 μM ^3H -CdR. Le reazioni vengono incubate a 37° C per tempi diversi in base al substrato impiegato: 20 minuti con ^3H -TdR, 40 minuti con ^3H -AraT, 60 minuti con ^3H -BVDU e 20 o 40 minuti con ^3H -CdR. La reazione viene boccata bollendo i campioni per un minuto e depositando 30 μl del volume totale su filtrini DE81 (Whatman) che legano i composti carichi negativamente. Una volta asciugati i filtrini vengono lavati tre volte per 5 min in abbondante ammonio formato 5 mM. Ciascun filtrino viene quindi trasferito sul fondo di una vial per scintillatore ed eluito per 30 minuti con 2 ml di 0.1 M HCl, 0.2 M NaCl. Quando i substrati radioattivi sono ^3H -AraT e ^3H -CdR il tampone di eluizione è invece composto da 0.1 M HCl, 0.2 M KCl. La radioattività rilasciata in soluzione viene quindi misurata allo scintillatore TriCarb 2800 TR (Perkin-Elmer) dopo l'aggiunta di 14 ml di liquido di scintillazione per fluidi Ready Safe (Beckman Coulter). I valori di attività specifica vengono espressi in pmol/min/mg.

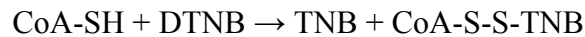
3.9 Saggio della citrato sintasi

La citrato sintasi (CS) è un enzima localizzato nella matrice mitocondriale codificato nel DNA nucleare. E' uno degli enzimi del ciclo dell'acido citrico che catalizza la seguente reazione tra acetil coenzima A (acetil-CoA) ed acido ossaloacetico (OAA) nella sintesi dell'acido citrico:



Il saggio dell'attività della citrato sintasi viene impiegato come indice della buona purificazione dei mitocondri infatti, il loro danneggiamento provoca la fuoriuscita della CS riscontrabile con la diminuzione dell'attività enzimatica.

Nella reazione catalizzata dalla CS viene prodotto CoA-SH e, per misurare l'attività della CS viene effettuato un saggio spettrofotometrico in cui viene sfruttata la capacità di questo composto di reagire con il DTNB (5-5'-ditiobis-(2-acido nitrobenzoico)) con il conseguente rilascio di acido tionitrobenzoico (TNB) che assorbe a 412 nm.



In una cuvetta da spettrofotometro vengono messi 1 ml Tris HCl 0.1 M pH 8.0, 10 μl DTNB 10 mM, 10 μl Acetil-CoA 5 mM ed una quantità di estratto mitocondriale pari a 2-10 μg di proteina. Si legge quindi l'assorbanza a 412 nm ad intervalli di 15 secondi per 3 minuti. Si aggiunge poi 50 mM OAA e si ripete la lettura come sopra. L'attività specifica dell'enzima espressa in U/mg viene quindi calcolata come segue:

$$\text{A.S.} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg prot.}} \right] = \frac{r_A}{l \times \epsilon_{\text{TNB}} \times V_{\text{TNB}}} \times \frac{V_{\text{cuvetta}}}{V_{\text{campione}} \times \rho}$$

Dove:

r_A : variazione dell'assorbanza al minuto calcolata come segue
 $[(\Delta A_{412}/\text{min}) + \text{OAA}] - [(\Delta A_{412}/\text{min}) - \text{OAA}]$

l : cammino ottico della cuvetta (1 cm)

ϵ_{TNB} : coefficiente di estinzione molare di TNB ($13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_{TNB} : numero stechiometrico di TNB nella reazione (1)

V_{cuvetta} : volume di soluzione nella cuvetta (1000 μl)

V_{campione} : volume di campione nella cuvetta in μl

ρ : concentrazione proteica del campione in ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

3.10 Saggio della timidina fosforilasi

L'attività della TP viene misurata apportando alcune modifiche al protocollo descritto in letteratura da Martí (Martí et al., 2004). Per ciascun campione vengono allestite due reazioni: due diverse quantità di proteine (6-12 μg) vengono incubate in 20 μl di tampone 0.1 M Tris-arsenato pH 6.5, 10 mM TdR e, parallelamente vengono preparate due reazioni uguali ma senza TdR che fungono da background. I campioni vengono incubati a 37° C per un ora trascorsa la quale, la reazione viene bloccata con 0.1 ml di NaOH 0.3 M. Le reazioni background vengono addizionate con 10 mM TdR prima di misurare l'assorbimento a 300 nm

da cui si ricava l'attività specifica della TP espressa in nmol/h/mg.

3.11 Western blot

Per la preparazione dell'estratto proteico 2×10^6 cellule vengono lavate due volte con PBS freddo. Dopo essere state sedimentate centrifugando a 500 g per 10 min a 4° C le cellule vengono risospese in 200 µl di tampone di lisi (PBS, 1,5% SDS e inibitore di proteasi per cellule di mammifero (Sigma)) e lisate mediante aspirazione attraverso un ago 30G x 5/16''. Dopo un'incubazione di 30 min in ghiaccio la sospensione viene centrifugata a 19000 g per 20 minuti e il surnatante contenente le proteine viene recuperato e conservato a -80° C. La concentrazione proteica è stata determinata mediante reazione con acido bicinchinonico (BCA) con il kit BCA protein assay (Pierce).

L'elettroforesi è stata effettuata impiegando diverse concentrazioni di poliacrilamide in base alle proteine che si volevano rilevare: 12% per R2 ep53R2, 9% per p53 e 6% per R1. Nel gel vengono caricate due diverse quantità di estratto proteico per poter verificare la proporzionalità del segnale. Sono quindi stati caricati 10-20 µg di proteine per R1 ed R2, 8-16 µg per p53, 2-4 µg per p53R2 e 0.5-1 µg per la β -actina utilizzata come standard interno per la normalizzazione dei segnali. Gli anticorpi impiegati per il riconoscimento delle tre sub unità della RNR e per la β -actina sono riportati in letteratura (Pontarin *et al.*, 2007), mentre l'anticorpo per p53 è un anticorpo monoclonale di topo (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1/1200. Gli anticorpi secondari sono tutti coniugati ad HRP (horseradish-peroxidase) e il loro segnale viene rilevato con il sistema ECL-advanced (GE Healthcare). La quantificazione dei segnali è stata eseguita mediante Kodak 1D Image Analysis Software.

3.12 Marcatura isotopica delle cellule

Le cellule C63 quiescenti in cui è stata silenziata la TK2 e di controllo sono state marcate con ^3H -TdR al fine di valutare l'incorporazione di questo precursore nel pool citoplasmatico e mitocondriale del dTTP. Per effettuare la marcatura viene rimosso il terreno di coltura e sostituito con terreno fresco contenente 0.1% FCS dializzato. Le cellule vengono quindi lasciate in incubatore ad equilibrare per 2 ore prima di procedere. L'aggiunta dell'idrossiurea (HU, Sigma), inibitore della RNR, e del 5BU viene eventualmente effettuata durante questo periodo. Trascorse le due ore, in una stanza a 37° C viene aggiunta ^3H -TdR (20000 cpm/pmol, Perkin-Elmer) alla concentrazione desiderata e le cellule vengono quindi incubate per i tempi desiderati prima di procedere all'estrazione del pool totale o dei pool citoplasmatici e mitocondriali. Negli esperimenti di pulse-chase le cellule sono state marcate con 100 nM ^3H -TdR per 60 minuti (pulse) trascorsi i quali il terreno è stato rimosso e sostituito con medium fresco contenente 0.1% FCS e gli eventuali inibitori, ma privo di TdR (chase) e riposte nuovamente in incubatore prima di estrarre il pool totale a distanza tempi diversi (0, 5, 15, 30, 60 e 180 minuti).

3.13 Estrazione del pool citoplasmatico e mitocondriale dei nucleotidi

L'estrazione e la separazione dei pool citosolici e mitocondriali viene effettuata seguendo un protocollo che prevede delle centrifugazioni differenziali. Tutte le operazioni vengono svolte a 4° C. Viene rimosso il terreno di coltura e le cellule vengono lavate quattro volte con PBS freddo. Dopo aver rimosso l'ultimo lavaggio le cellule vengono staccate con una spatola in 1.5 ml di tampone di estrazione 1x (0.21 M mannitolo, 0.07 M saccarosio, 0.2 M EGTA, 10 mM TrisHCl pH 7.5) contenente 0.5% BSA e quindi lisate mediante diversi passaggi attraverso un ago da siringa (23G x 1^{1/4} per cellule HEK 293 e 30G x 1/2" per cellule C63). Con una centrifugazione di 10 min a 19000 g si separano il citosol nel surnatante da un pellet di mitocondri e nuclei. Il pellet viene lavato in tampone di estrazione, sedimentato nuovamente e risospeso in 1 ml di metanolo 60% per estrarre il pool mitocondriale durante un'incubazione di un'ora a -20° C. Al termine dell'estrazione il pool mitocondriale viene bollito per 3 min e

centrifugato. Il surnatante così ottenuto contiene il pool di nucleotidi che, dopo essere stato seccato in una pompa a vuoto viene sciolto in acqua. Il pellet viene invece lasciato seccare per estrarre, il giorno successivo, le macromolecole con NaOH 0.3 M. Il pool citosolico viene invece estratto aggiungendo a 300 µl di surnatante, ottenuto alla prima separazione, 600 µl di metanolo assoluto e incubando a -20° C per un'ora trascorsa la quale viene bollito per 3 minuti. Viene quindi effettuata una seconda incubazione a -20° C per tutta la notte e il giorno seguente si procede con la centrifugazione del pool e l'evaporazione del surnatante contenete i nucleotidi. Dopo essere stati risospesi in acqua sia il pool citosolico che mitocondriale vengono conservati a -80° C.

3.14 Estrazione del pool cellulare totale dei nucleotidi

L'estrazione del pool cellulare totale dei nucleotidi viene effettuato in una stanza a 4° C rimuovendo il terreno di coltura e lavando il monostrato cellulare quattro volte con PBS freddo. Dopo aver lasciato scolare le capsule, le cellule vengono ricoperte con metanolo 60% e lasciate in piano per un ora durante la quale il pool totale viene rilasciato in soluzione. Il metanolo viene quindi raccolto e bollito per 3 minuti prima di essere evaporato e sciolto in acqua. Il pool così estratto viene conservato a -80° C.

3.15 Determinazione delle dimensioni dei pool dei ribonucleotidi mediante HPLC

La quantificazione dei pool ribonucleici negli esperimenti condotti in cellule HEK 293 è stata effettuata mediante analisi HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con lo strumento 515 HPLC Pump (Waters) e Dual λ Absorbance Detector 2487 (Waters). I campioni sono stati corsi in una colonna a scambio ionico Partisil 10 SAX (Whatman) con 1ml/min 0.4 M ammonio fosfato ($\text{NH}_2\text{H}_4\text{PO}_4$) pH 5. La quantificazione dei ribonucleotidi nei campioni è stata effettuata in relazione all'area dei picchi ottenuti con la cromatografia di 200 pmoli di ribonucleotidi standard.

3.16 Determinazione delle dimensioni dei pool dei dNTP e della radioattività specifica del dTTP

Per determinare le dimensioni dei pool dei quattro dNTP viene effettuato un saggio enzimatico modificato sul modello descritto da Sherman e Fyfe (Sherman and Fyfe, 1989). Questo sistema consente di valutare la quantità di un dNTP presente in un estratto cellulare usando oligonucleotidi sintetici e il frammento di Klenow della DNA polimerasi I (BioLabs). Ciascun oligonucleotide è costituito da una sequenza definita di soli due nucleotidi e viene utilizzato dalla polimerasi come stampo per sintetizzare un frammento di DNA impiegando un dNTP marcato isotopicamente, fornito in eccesso e il dNTP che si desidera quantificare all'interno del campione. La quantificazione viene effettuata in base ad una curva standard ottenuta aggiungendo alla reazione quantità note del dNTP che si desidera misurare (da 0 a 12 pmol). In base alle sequenze degli oligonucleotidi il rapporto (dNTP marcato:dNTP non marcato) è pari a 2 per il dTTP e pari a 3 per dCTP, dATP e dGTP. Il dNTP marcato è ^{32}P -dATP (GE Helthcare) per la quantificazione di dTTP, dCTP e dGTP e ^3H -dTTP (GE Helthcare) per quella del dATP.

La reazione avviene in tubi di vetro dove a 20 μl di campione, contenenti una certa quantità di ciascun pool, vengono aggiunti 80 μl di soluzione di reazione, ottenendo un volume totale di 100 μl (40 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0.25 μM oligonucleotide (Sherman and Fyfe, 1989), 0.2U Klenow, 0.25 μM ^{32}P -dATP o ^3H -dTTP, acqua e campione). I tubini vengono incubati a 37° C per 60 minuti trascorsi i quali vengono trasferiti in ghiaccio. Quindi 85 μl del volume totale vengono depositati su filtrini a scambio ionico DE81 (Whatmann) in grado di legare i fosfati dei dNTP trattenendo i polimeri. I filtrini vengono seccati e poi lavati 3 volte per 10 minuti con una soluzione acquosa 5% NaHPO_4 , una volta con acqua distillata e un'ultima volta con etanolo assoluto. Gli isotopi intrappolati nei filtrini vengono quindi contati allo scintillatore. La radioattività del ^{32}P (^3H per la quantificazione del dATP) permetterà di valutare le dimensioni dei pool dei dNTP espressa in $\text{pmol}/10^6$ cellule. Nel caso sia stata effettuata una marcatura con ^3H -TdR, preparando una retta di taratura con ^3H -dTTP anziché con dTTP freddo, si potrà valutare, oltre alla dimensione del pool del dTTP anche la sua radioattività specifica che verrà espressa in cpm/pmol.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli esperimenti condotti per indagare il ruolo della TK2 nel metabolismo del dTTP sono stati effettuati silenziando l'enzima mediante la tecnica dell'RNA interference. Per testare il grado di silenziamento abbiamo confrontato il contenuto di RNA messaggero (mRNA) nelle cellule silenziate con quello delle cellule di controllo. Considerando che la riduzione dell'mRNA non è sufficiente a garantire una proporzionale diminuzione del contenuto proteico, abbiamo deciso di misurare l'attività enzimatica della TK2 nelle cellule silenziate e di controllo. In letteratura non esistevano protocolli per valutare l'attività della TK2 in estratti proteici cellulari in modo diretto ed affidabile, è emersa quindi la necessità di sviluppare un saggio enzimatico adeguato. Negli estratti cellulari oltre alla TK2 sono presenti anche la TK1 e la dCK le cui specificità di substrato, in parte coincidenti con quelle della TK2, non consentono di misurare l'attività della TK2 in base alla fosforilazione dei suoi substrati naturali. Come substrato abbiamo quindi impiegato la (E)-5-(2-bromovinil)-2'-deossiridina (BVDU) marcata isotopicamente, la cui affinità è 100 volte superiore per la TK2 rispetto alla TK1 (Balzarini et *al.*, 2000).

4.1 Un nuovo saggio enzimatico per la determinazione dell'attività della timidina chinasi mitocondriale

Per verificare se la BVDU consente di misurare in modo specifico l'attività della TK2 anche in presenza della TK1, abbiamo da prima messo a punto le condizioni del saggio in cellule di osteosarcoma OST prive della TK1. Le analisi sono quindi state ripetute in cellule HOS TK1⁺ servendoci dell'inibitore KIN109 specifico per la TK2.

Per confrontare la capacità della TK2 di fosforilare ³H-TdR e ³H-BVDU, abbiamo incubato due aliquote (17-34 µg) di estratto proteico ottenuto con proteine estratte da cellule OST con dosi crescenti da 0.2 a 20 µM dei due substrati radioattivi. I valori di attività specifica ottenuti nei due casi sono dello stesso ordine di grandezza e sono stati riportati in un unico grafico (fig. 8). A tutte le

concentrazioni testate i valori di fosforilazione sono bassi e leggermente superiori con $^3\text{H-TdR}$ nell'intervallo di concentrazione tra 0.2 e 5 μM .

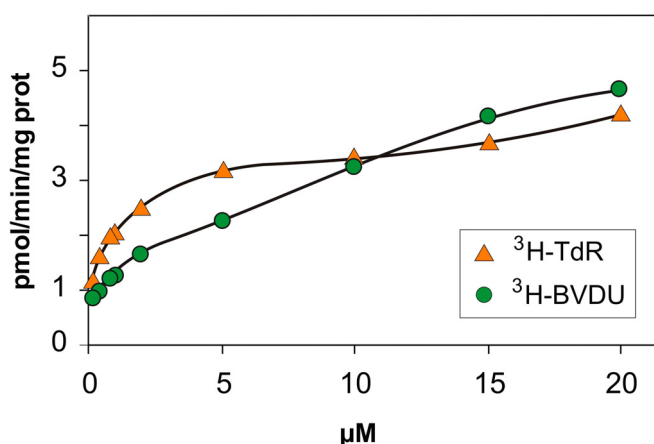


Fig. 8 Fosforilazione di $^3\text{H-TdR}$ e $^3\text{H-BVDU}$ fornite a dosi crescenti ottenuta in estratti proteici di cellule OST TK1⁻

Per verificare che i valori ottenuti fossero dovuti alla fosforilazione della TK2, i saggi sono stati ripetuti in presenza dell'inibitore KIN109. Questo composto è un inibitore competitivo della TK2 che di inibisce la fosforilazione di 1 μM timidina con IC_{50} pari a $0.47 \pm 0.03 \mu\text{M}$.

Negli estratti di cellule OST dove la TK1 non è attiva, ci si aspetta che la fosforilazione della $^3\text{H-TdR}$ sia dovuta alla sola TK2. Inibendo la timidina chinasi mitocondriale con 25 μM KIN109 abbiamo infatti osservato la completa inibizione della fosforilazione di 0.2 e 1 μM $^3\text{H-TdR}$ e una riduzione del 70% nella fosforilazione di 10 μM $^3\text{H-TdR}$, confermando la presenza della sola timidina chinasi mitocondriale (dati non mostrati). Abbiamo quindi indagato se anche la fosforilazione della $^3\text{H-BVDU}$ poteva essere attribuita solo alla TK2. Per fare ciò abbiamo testato la capacità di 25, 50 e 100 μM KIN109 di inibire la fosforilazione di quantità crescenti di $^3\text{H-BVDU}$ in estratti proteici della stessa linea cellulare OST (fig. 9). Le tre concentrazioni di inibitore determinano all'incirca la stessa percentuale di inibizione. Inoltre, con 0.2 μM $^3\text{H-BVDU}$ si ottiene un'inibizione del 90%, che diminuisce progressivamente all'aumentare della concentrazione di substrato.

Questi risultati indicano che negli estratti proteici cellulari l'inibitore KIN109 è in

grado di competere più efficientemente con la fosforilazione della TdR che non con la BVDU. Tuttavia, a basse concentrazioni di BVDU (0.2 μ M) la reazione viene quasi completamente bloccata ed è quindi attribuibile alla sola TK2.

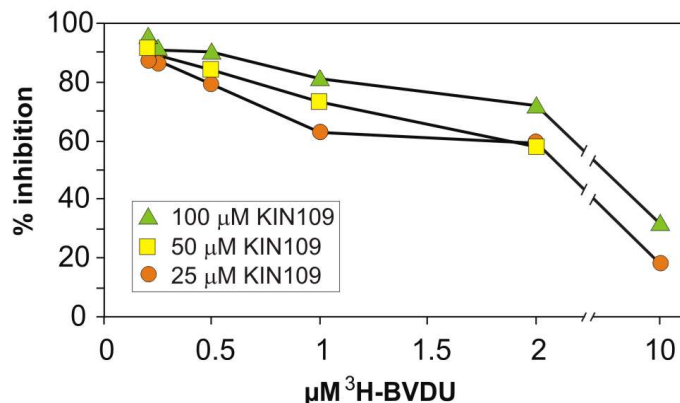


Fig. 9 Effetto dell'inibitore KIN109 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M nella fosforilazione di concentrazioni crescenti di 3 H-BVDU in estratti proteici di cellule OST. I valori sono riportati come percentuale rispetto a quelli ottenuti in assenza di inibitore

Tenendo conto di queste considerazioni abbiamo ripetuto lo stesso tipo di esperimenti in cellule di osteosarcoma HOS dove la timidina chinasi mitocondriale è attiva e presente in quantità molto superiori alla TK2. Anche in questo caso abbiamo confrontato la fosforilazione di 3 H-TdR e 3 H-BVDU in estratti proteici cellulari (fig. 10). Nei saggi con 3 H-BVDU sono stati impiegati 17-34 μ g di estratto proteico mentre, quando il substrato era 3 H-TdR sono stati impiegati 0.1-0.2 μ g di proteine. Nelle cellule HOS TK1⁺ i livelli di fosforilazione raggiunti con 3 H-TdR sono cento volte superiori a quelli ottenuti con il substrato 3 H-BVDU. A basse concentrazioni di 3 H-BVDU i valori di attività specifica misurati nelle cellule HOS sono paragonabili a quelli ottenuti nelle cellule OST TK1⁻, ma quando la concentrazione di 3 H-BVDU è superiore a 5 μ M i valori aumentano di 4-5 volte, rappresentando tuttavia solo il 2% della fosforilazione ottenuta con le stesse concentrazioni di 3 H-TdR. L'incremento della fosforilazione all'aumentare della concentrazione di 3 H-BVDU è stata attribuita alla fosforilazione da parte della TK1 presente in grande quantità, o all'interferenza di altri enzimi contenuti nell'estratto.

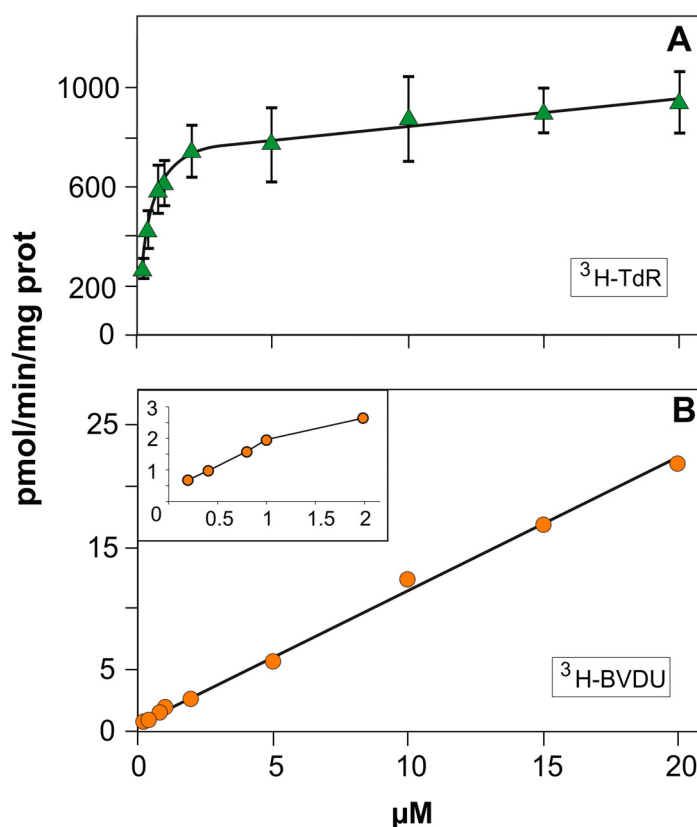


Fig. 10 Fosforilazione di $^3\text{H-TdR}$ (A) e $^3\text{H-BVDU}$ (B) in estratti proteici di cellule HOS TK1⁺. In figura (B) l'inserto indica l'attività a basse concentrazioni di $^3\text{H-BVDU}$

Per distinguere tra l'attività della TK1 e della TK2 nelle cellule HOS, abbiamo inibito l'attività della TK2 con 100 μM KIN109 in saggi condotti con 0.25-2 μM di $^3\text{H-TdR}$ e $^3\text{H-BVDU}$. L'effetto dell'inibitore non è percettibile quando il substrato impiegato è la timidina (tab. 9), indicando che gli elevati valori di attività specifica osservati in fig. 10A sono attribuibili alla sola TK1. Quando il substrato è $^3\text{H-BVDU}$ la reazione è inibita dalla presenza di KIN109 (tab. 9), ma non raggiunge le percentuali osservate nelle cellule OST prive della TK1. Infatti, se nelle cellule OST 100 μM KIN109 inibiva al 90% la reazione con 0.25 μM di $^3\text{H-BVDU}$ per scendere al 70% di inibizione con 2 μM di substrato, nelle cellule HOS TK1⁺ la massima inibizione raggiunta è pari a 58% in presenza di 0.25 μM di $^3\text{H-BVDU}$ e diminuisce notevolmente con l'aumentare della concentrazione del substrato. Questi risultati mostrano che quando entrambe le timidina chinasi sono presenti negli estratti cellulari la fosforilazione della BVDU a basse

concentrazioni avviene soprattutto da parte della TK2 e che all'aumentare della quantità di substrato aumenta la competizione con gli altri enzimi presenti nell'estratto proteico.

Fosforilazione di ³ H-TdR e di ³ H-BVDU in cellule HOS TK1 ⁺				
Substrato (μM)	Attività specifica (pmol/min/mg)		% inibizione	Δ* (pmol/min/mg)
	-KIN109	+KIN109		
³ H- BVDU				
0.25	0.63	0.27	58	0.36
0.5	0.98	0.54	45	0.44
1	1.45	1.16	20	0.29
2	2.64	2.21	16	0.43
³ H- TdR				
0.25	118	102	13	16
1	345	310	10	35
2	466	431	7	35

Tab. 9 Effetto dell'inibizione con 100 μM KIN109 nella fosforilazione di ^3H -BVDU e ^3H -TdR in estratti proteici di cellule HOS TK1⁺. I valori riportati sono la media di due diverse determinazioni che non differiscono più del 10%. Δ^* è la differenza tra l'attività misurata in assenza e in presenza di KIN109

Mediante queste prove abbiamo dimostrato che la presenza della TK1 negli estratti cellulari non consente di misurare l'attività della TK2 attraverso la fosforilazione della timidina. Abbiamo tuttavia individuato le condizioni di saggio enzimatico che consentono di misurare direttamente e con buona approssimazione l'attività della TK2 anche in presenza degli enzimi citosolici. Questo protocollo prevede l'impiego di 0.25 μM di ^3H -BVDU come substrato e, anche se non necessario, l'uso dell'inibitore KIN109 per verificare che l'attività misurata sia effettivamente attribuibile alla TK2 (Franzolin et al., 2006).

4.1.1 Confronto tra ^3H -BVDU ed altri substrati nel saggio di attività della timidina chinasi mitocondriale

Altri gruppi di ricerca hanno proposto saggi per la determinazione della TK2 che misurano l'attività enzimatica in modo indiretto sottraendo dalla fosforilazione totale di timidina, deossicitidina o alcuni analoghi nucleosidici quella ottenuta saturando la TK2 con un eccesso di un secondo substrato non radioattivo.

Abbiamo voluto confrontare l'efficienza del saggio enzimatico impiegando ^3H -BVDU come substrato con quella ottenuta con altri substrati.

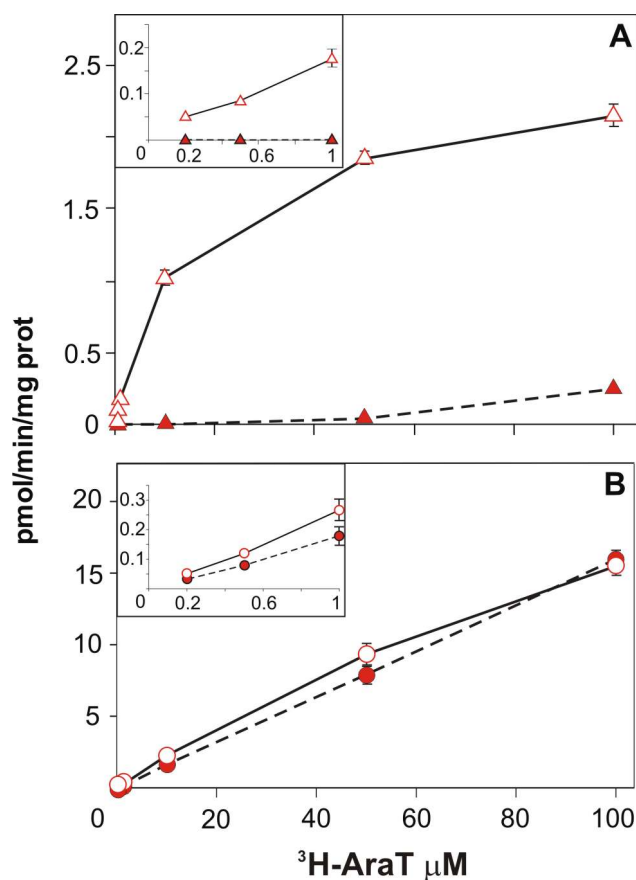


Fig. 11 Fosforilazione di concentrazioni crescenti di $^3\text{H-AraT}$ in estratti proteici di cellule OST TK1⁻ (A) ed HOS TK1⁺ (B), in assenza (simboli vuoti) e in presenza (simboli pieni) di 100 μM KIN109. Gli inserti mostrano i valori ottenuti con concentrazioni inferiori all'1 μM di substrato. Le barrette indicano l'intervallo di determinazione

Come spiegato nel paragrafo 1.4.3, l'AraT è un analogo della timidina che viene fosforilato da entrambe le timidina chinasi, ma con specificità superiore da parte della TK2. Abbiamo determinato l'effetto dell'inibizione della TK2 con 100 μM KIN109 nella fosforilazione di concentrazioni crescenti di $^3\text{H-AraT}$ in estratti proteici di cellule OST TK1⁻ ed HOS TK1⁺ (fig. 11). In entrambi i casi, a concentrazioni inferiori a 1 μM di substrato, i valori di attività specifica ottenuti sono dieci volte inferiori a quelli osservati nella fosforilazione di $^3\text{H-BVDU}$ in entrambe le linee cellulari. Nelle cellule OST la reazione raggiunge la saturazione a 50 μM $^3\text{H-AraT}$ con un valore di attività pari a 2 pmol/min/mg ed è completamente inibita da KIN109 (fig. 11A).

In cellule HOS invece, dove sono attive entrambe le timidina chinasi, la reazione è lineare ed aumenta fino a raggiungere il valore di attività 15 pmol/min/mg con 100 μ M di substrato. In queste condizioni l'inibizione da parte di KIN109 è inferiore a quella ottenuta nelle cellule HOS con 3 H-BVDU, infatti si osserva al massimo una inibizione del 30% a basse concentrazioni (fig. 11B). Questi risultati dimostrano che l'AraT, al contrario della BVDU, viene in gran parte fosforilata dalla TK1 soprattutto alla concentrazione 100 μ M proposta per la misurazione dell'attività enzimatica della TK2 (Arnér *et al.*, 1992).

In altri casi anziché analoghi nucleosidici per la determinazione dell'attività della TK2, vengono impiegati i substrati naturali sfruttando la capacità della TK2 di fosforilare oltre alla timidina anche la deossicitidina. In Wang *et al.* (2000) viene proposto di misurare la fosforilazione di 3 H-TdR nell'estratto proteico in assenza ed in presenza di un eccesso di CdR non marcata per saturare la TK2. L'attività della TK2 viene quindi ricavata sottraendo ai valori ottenuti in assenza di CdR quelli ottenuti inibendo la TK2. Abbiamo determinato l'effetto dell'inibizione della TK2 con 0.5 e 1 mM CdR nella fosforilazione di 1 e 10 μ M 3 H-TdR, sia in cellule OST TK1⁻ (con 17-34 μ g di estratto proteico) che HOS TK1⁺ (con 0.1-0.2 μ g di estratto proteico) (tab. 10).

Fosforilazione di 1 e 10 μ M 3 H-TdR in cellule OST TK1 ⁻ e HOS TK1 ⁺					
substrato	inibitore	OST TK1 ⁻		HOS TK1 ⁺	
		Attività (pmol/min/mg)	% inibizione	Attività (pmol/min/mg)	% inibizione
3 H-TdR 1 μ M	CdR				
	--	2.42 $\pm$ 0.22	--	408 $\pm$ 71	--
	0.5 mM	0.87 $\pm$ 0.14	64	420 $\pm$ 51	--
10 μ M	1 mM	0.65 $\pm$ 0.10	70	454 $\pm$ 62	--
	--	4.24	--	829	--
	0.5 mM	2.43	43	779	6
	1 mM	2.24	47	747	10

Tab. 10 Inibizione della fosforilazione di 3 H-TdR ottenuta con un eccesso di CdR in estratti proteici di cellule OST TK1⁻ e HOS TK1⁺. I valori riportati per i saggi con 10 μ M 3 H-TdR sono le medie di analisi effettuate in doppio. Nel caso di 1 μ M 3 H-TdR vengono indicate le deviazioni standard dei valori ottenuti in due diverse analisi

Nelle cellule OST TK1⁻ l'inibizione è al massimo del 70% con 1 mM CdR il che porterebbe a sottostimare l'attività della TK2. Nelle cellule HOS TK1⁺ si ottengono valori troppo elevati di fosforilazione che non consentono di apprezzare l'inibizione della TK2 e quindi di valutarne l'attività.

In alternativa nel saggio enzimatico può essere fornita ³H-CdR che verrà fosforilata sia dalla dCK che dalla TK2, presenti nell'estratto proteico. In questo caso l'attività della TK2 si ricava inibendola con un eccesso di timidina non marcata. Abbiamo applicato il saggio come riportato in Rylova *et al.* (2005), fornendo 10 µM ³H-CdR in presenza o in assenza di 1 mM TdR, per misurare l'attività della TK2 negli estratti proteici delle cellule OST TK1⁻ ed HOS TK1⁺. In entrambi i casi l'attività della dCK negli estratti proteici è troppo elevata per poter valutare per differenza il contributo della TK2 nella fosforilazione della ³H-CdR. Infatti, in cellule OST TK1⁻ è stata misurata un'attività specifica pari a 48 pmol/min/mg e 43 pmol/min/mg rispettivamente in assenza ed in presenza di inibizione, mentre in cellule HOS TK1⁺ i valori sono di 62 pmol/min/mg in entrambi i casi.

Con queste analisi abbiamo dimostrato che i protocolli riportati in letteratura per determinare l'attività della TK2 come differenza nella fosforilazione di TdR (o CdR) in assenza e in presenza di un inibitore della TK2, non sono adeguati per misurare con precisione in estratti proteici cellulari dove TK2, TK1 e dCK coesistono.

4.1.2 Variazione dell'attività della timidina chinasi mitocondriale durante il ciclo cellulare

Per comprendere se lo stato di proliferazione cellulare influenza le condizioni di saggio, abbiamo determinato l'attività della TK2 in estratti proteici cellulari di fibroblasti umani di polmone (CCD-Lu34) proliferanti o mantenuti in quiescenza per dieci giorni in terreno con lo 0.1% di siero. Le percentuali di fase S sono risultate di circa 25% nelle cellule proliferanti e inferiori all'1% nelle quiescenti.

I risultati ottenuti con i fibroblasti proliferanti misurando la fosforilazione di ³H-TdR e ³H-BVDU (fig. 12A e 12B), sono simili a quelli osservati con le cellule HOS TK1⁺. Negli estratti delle cellule quiescenti, dove l'attività della TK1 è notevolmente ridotta, abbiamo invece ottenuto dei livelli simili e

relativamente bassi di fosforilazione di entrambi i substrati (fig. 12C) ma tuttavia più elevati di quelli ottenuti nelle cellule OST TK1⁻.

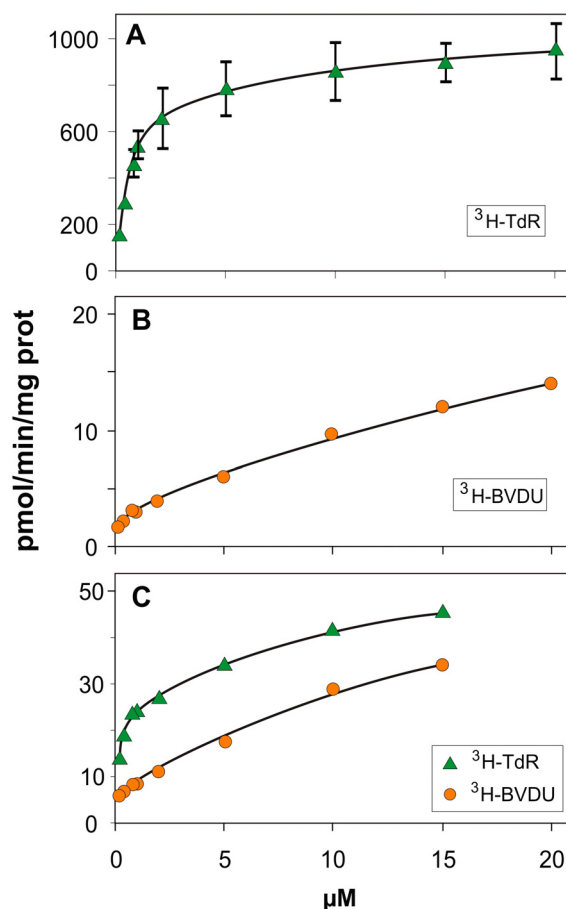


Fig. 12 Fosforilazione di ³H-TdR e ³H-BVDU in estratti proteici di fibroblasti CCD-Lu34 proliferanti (A, B) e quiescenti (C). In ciascun saggio sono state impiegate due diverse aliquote di ciascun estratto proteico

Nei fibroblasti proliferanti come nelle cellule HOS TK1⁺ (tab. 10) l'aggiunta dell'inibitore KIN109 alla reazione con ³H-TdR non provoca alcuna inibizione dell'attività misurata nei fibroblasti proliferanti in quanto è la TK1 la maggiore responsabile di questa fosforilazione (tab. 11A). Invece KIN109 è più efficace nell'inibire la fosforilazione della ³H-BVDU di quanto osservato nelle cellule HOS TK1⁺, indicando che nei fibroblasti proliferanti l'attività della TK2 è 3-5 volte superiore a quella misurata nelle cellule trasformate HOS.

Fosforilazione di ³ H-BVDU e ³ H-TdR in fibroblasti proliferanti e quiescenti					
A	Substrato (μM)	Attività (pmol/min/mg)	% inibizione		Δ* (pmol/min/mg)
		KIN109 25 μM			
		-	+		
³ H-BVDU					
	0.2	1.5	0.2	87	1.3
	1	2.7	1.1	59	1.6
	10	11.1	9.7	13	1.4
³ H-TdR					
	0.2	116	100	14	16
	1	377	340	10	37
	10	763	840	0	--
B	KIN109 100 μM				
		-	+		
³ H-BVDU					
	0.2	4.5	0.2	95	4.3
	1	7.3	2.5	66	4.8
	10	26	23	11	3
³ H-TdR					
	0.2	5.2	1.0	81	4.2
	1	16	3.1	81	12.9
	10	33	11	67	22

Tab. 11 Inibizione della fosforilazione di ^3H -TdR e ^3H -BVDU con KIN109 in fibroblasti CCD-Lu34 proliferanti (0.1-0.2 μg di proteine per ^3H -TdR e 17-34 μg per ^3H -BVDU) (A) e quiescenti (2.6-5.2 μg di proteine per ^3H -TdR e 1.3-2.6 μg per ^3H -BVDU) (B). I valori riportati sono la media di due diverse determinazioni che non differiscono più del 10% per ^3H -BVDU e più del 15% per ^3H -TdR. Δ^* è la differenza tra l'attività misurata in assenza e in presenza di KIN109

Nei fibroblasti quiescenti l'uso dell'inibitore KIN109 con 0.2 μM di ^3H -BVDU ha consentito di dimostrare che con il passaggio allo stato di quiescenza l'attività della TK2 aumenta di circa tre volte rispetto a quella posseduta dalle cellule proliferanti (tab. 11B) suggerendo un'induzione dell'attività dell'enzima mitocondriale quando la TK1 viene spenta (Franzolin et al., 2006).

Nei fibroblasti quiescenti (tab. 11B) all'aumentare della concentrazione di ^3H -BVDU si ottengono valori di fosforilazione sempre più elevati che vengono tuttavia inibiti sempre meno efficientemente da KIN109. Questa attività non può essere tuttavia attribuita alla sola TK1 che nei fibroblasti quiescenti è presente in quantità molto bassa. Infatti nelle stesse cellule la fosforilazione di ^3H -TdR, pur

presentando valori leggermente superiori a quelli ottenuti con ^3H -BVDU, è quasi totalmente inibita da KIN109. Ci siamo quindi chiesti da cosa potessero dipendere valori così elevati di attività ottenuti impiegando ^3H -BVDU come substrato. La soluzione di questo quesito sta nella presenza di TP negli estratti. Entrambi i substrati, BVDU e TdR, vengono degradati dalla timidina fosforilasi con il rilascio della base azotata e di deossiribosio-1-fosfato. Al contrario della ^3H -TdR che è marcata nella base azotata, la ^3H -BVDU in nostro possesso contiene l'isotopo ^3H legato allo zucchero. In seguito alla degradazione di ^3H -BVDU da parte della TP, viene quindi rilasciato ^3H -deossiribosio-1-fosfato la cui radioattività viene intrappolata nei filtri DE81 (vedi paragrafo 3.8) e rilevata nel saggio. Per ovviare a questo problema le condizioni di saggio sono state modificate con l'aggiunta di un inibitore dell'inibitore specifico per la TP (5-bromouracile 50 μM).

4.2 Contributo della timidina chinasi mitocondriale al mantenimento del pool mitocondriale del dTTP

Con gli esperimenti presentati di seguito abbiamo cercato di comprendere il ruolo della TK2 nel metabolismo del dTTP nei mitocondri considerando anche altri fattori da cui dipende la sintesi del dTTP quali la sintesi *de novo*, l'attività della timidina fosforilasi e la disponibilità di timidina.

Nel nostro laboratorio abbiamo iniziato questo progetto, silenziando la TK2 mediante RNA interference in due linee umane di osteosarcoma in possesso o meno della TK1. Mentre nelle cellule HOS TK1⁺ la timidina è fosforilata sia nel citoplasma che nei mitocondri, nelle cellule OST TK1⁻ la TK2 è l'unica timidina chinasi presente. Dal confronto degli effetti dello spegnimento nelle due condizioni si può ricavare il peso relativo delle due chinasi per la fosforilazione della timidina nelle cellule e per il mantenimento del pool mitocondriale del dTTP. Queste due linee trasformate possono essere analizzate in condizioni di proliferazione, ma non di quiescenza perché mancano di una inibizione da contatto efficace. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la TK2 non è necessaria per il mantenimento del pool del dTTP in cellule ciclanti dove le vie di sintesi citoplasmatiche sono attive (Rampazzo et al., 2007). Durante il mio dottorato abbiamo voluto quindi prendere in esame l'effetto dello spegnimento della

TK2 in cellule non proliferanti dove sia la TK1 che l'attività ribonucleotide reduttasica di R1/R2 non sono attive. A questo scopo abbiamo impiegato come sistema modello due linee di fibroblasti di pelle umana che dopo aver raggiunto la confluenza possono essere mantenuti in quiescenza per giorni o settimane con un basso contenuto di siero nel terreno di coltura.

4.2.1 Attività della timidina chinasi mitocondriale in fibroblasti quiescenti e influenza della timidina fosforilasi

Nelle cellule quiescenti sia la TK1 che la subunità R2 della ribonucleotide reduttasi non sono presenti, perciò la TK2 è l'unica timidina chinasi attiva e la sintesi *de novo* è limitata alla ridotta attività del complesso R1/p53R2 (Pontarin et al., 2007). La timidina utilizzata nella la sintesi del dTTP attraverso la via di recupero deriva dalla degradazione del dTMP endogeno prodotto *de novo* può essere inoltre importata direttamente dall'ambiente extracellulare. Queste due fonti di timidina sono molto ridotte nelle cellule e nei tessuti post-mitotici infatti, nell'uomo la concentrazione di timidina nel circolo sanguigno è inferiore ai limiti analitici di rilevazione (50 nM). Abbiamo quindi voluto verificare se queste piccole quantità di timidina sono utilizzabili per la sintesi del dTTP nelle cellule quiescenti. Abbiamo incubato due linee di fibroblasti di pelle (C63 e C72), in quiescenza da dieci giorni, con concentrazioni crescenti di timidina radioattiva nel terreno contenente lo 0.1% di siero dializzato. Dopo un'incubazione di 15 o 30 minuti abbiamo estratto ed analizzato sia la concentrazione del pool del dTTP che la sua radioattività specifica nel pool cellulare totale (fig. 13). In entrambe le linee cellulari il pool del dTTP aumenta in modo proporzionale sia al tempo di incubazione che alla concentrazione della ^3H -TdR, indicando che la TK2 è in grado di fosforilare la timidina fornita nel terreno anche se in concentrazione molto ridotta, con successiva sintesi di dTTP (fig. 13A). L'attività specifica del dTTP aumenta anch'essa con la dose di ^3H -TdR e con il tempo di incubazione e passa da 1/7 ad 1/2 del valore della radioattività specifica della ^3H -TdR fornita (20000 cpm/pmol) (fig. 13b). Il valore della radioattività specifica indica il contributo relativo della via di recupero e della via *de novo* nella sintesi del dTTP. Infatti, in questi esperimenti di marcatura isotopica, dall'attività della TK2 dipende la produzione di ^3H -dTTP la cui radioattività specifica, di per sé pari

a quella della ^3H -TdR fornita, viene diluita dal dTTP non marcato prodotto a partire da precursori endogeni non marcati. I risultati ottenuti indicano che nelle cellule quiescenti la sintesi di recupero è attiva e compete con la sintesi *de novo* per la produzione di dTTP. Questo processo è inoltre dipendente dalla disponibilità del nucleoside divenendo tanto più efficiente quanto maggiore è la concentrazione della timidina.

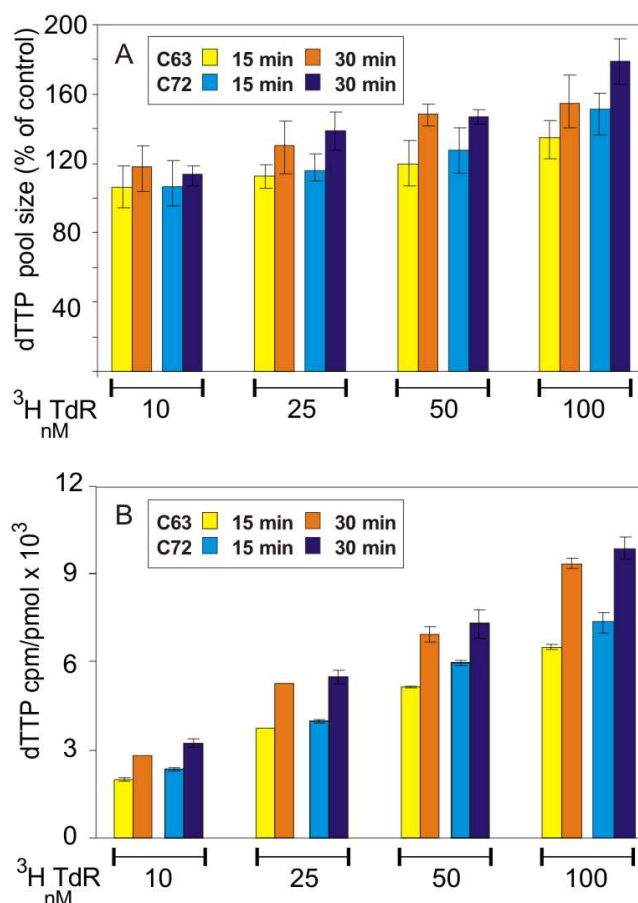


Fig. 13 Espansione delle dimensioni del pool del dTTP in cellule C63 e C72 quiescenti incubate con ^3H -TdR. Dimensioni (A) e radioattività specifica (B) del pool del dTTP. Le dimensioni del pool del dTTP sono espresse come percentuale rispetto alle dimensioni originarie dei pool prima dell'aggiunta di timidina al terreno (1.3 pmol/ 10^6 cellule per la linea C63 e 2.3 pmol/ 10^6 cellule per C72)

Le due linee cellulari provengono da due donatori distinti e potrebbero di conseguenza avere delle caratteristiche diverse. Osservando le quantità assolute di ^3H -TdR fosforilata abbiamo notato delle differenze tra le due linee cellulari. Infatti, in assenza di timidina aggiunta le dimensioni del pool del dTTP è

rispettivamente di 1.3 e 2.3 pmol/10⁶ cellule nelle linee C63 e C72 ed aumentano dopo 30 minuti di incubazione con 100 nM ³H-TdR a valori rispettivamente pari a 1.9 e 4.2 pmol/10⁶ cellule. Analizzando l'attività della timidina fosforilasi negli estratti proteici di queste cellule abbiamo riscontrato che le C63 possiedono un'attività della TP (820 nmol/h/mg) superiore a quella misurata nelle cellule C72 (260 nmol/h/mg). La TP, degradando la timidina in timina nel citoplasma, potrebbe competere con la TK2 per l'impiego del nucleoside andando ad influenzare le dimensioni del pool del dTTP.

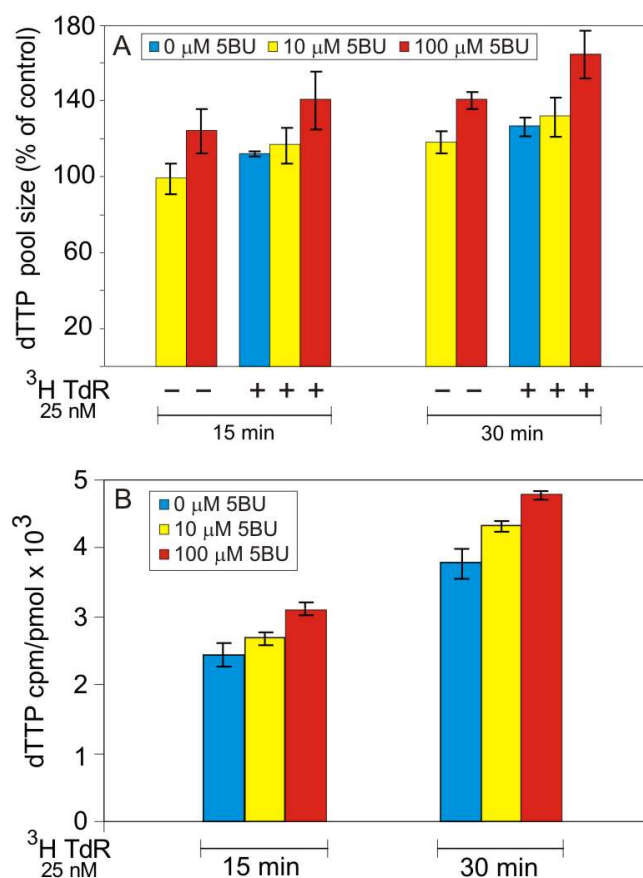


Fig. 14 Effetto dell'inibizione della timidina fosforilasi nel pool del dTTP in cellule C63 quiescenti marcate con ³H-TdR. Dimensioni del pool del dTTP (A) espresse come percentuali rispetto alle dimensioni del pool originarie nelle cellule che non hanno subito alcun trattamento (1.9 pmol/10⁶ cellule). In (B) viene riportata la radioattività specifica del dTTP nelle cellule incubate con ³H-TdR 25 nM (20000 cpm/pmol)

Per verificare questa ipotesi abbiamo trattato le cellule C63 non proliferanti con il 5-bromouracile, un inibitore della TP.

Le cellule sono state pre-trattate con due diverse dosi di 5BU (10 e 100 μM) per

15 minuti, successivamente al terreno è stata aggiunta ^3H -TdR 25 nM per ulteriori 15 e 30 minuti (fig. 14).

Come in precedenza, l'aggiunta di timidina ha provocato una leggera espansione del pool del dTTP dipendente anche dal tempo di incubazione. Questo aumento è ancora più sensibile dopo l'aggiunta dell'inibitore 5BU (fig. 14A). La radioattività specifica (fig. 14B) aumenta come in precedenza in base al tempo di incubazione ma, in questo caso, anche con la concentrazione di 5BU dimostrando che anche piccole dosi di inibitore della TP modificano la dinamica del pool del dTTP. Inoltre, in fig. 14A si può notare come anche in assenza di timidina esogena il pool del dTTP aumenta dopo 15 minuti e più sensibilmente dopo 30 minuti di trattamento con 100 μM 5BU. Per verificare questo risultato abbiamo incubato con 100 μM 5BU per diversi tempi cellule C63 quiescenti in assenza di timidina ma in terreno con lo 0.1% di siero dializzato (fig. 15).

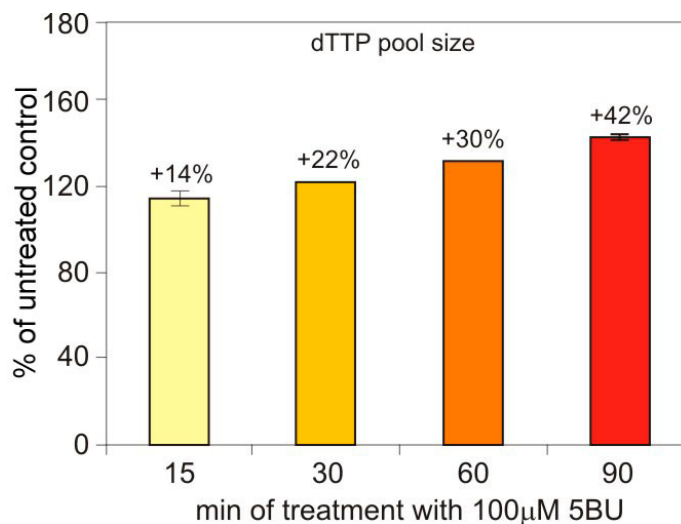


Fig. 15 Effetto dell'inibizione della TP nel pool del dTTP di cellule C63 quiescenti. Le dimensioni del pool del dTTP sono espresse come percentuale rispetto alle dimensioni originarie in cellule C63 quiescenti in cui la TP non è stata inibita (0.91×10^6 cellule)

Con il trascorrere del tempo, in assenza di timidina, le dimensioni del pool del dTTP aumentano del 14% dopo 15 minuti di inibizione della TP e raggiungono valori superiori del 42%, rispetto alla condizione di partenza priva di inibizione, dopo 90 minuti. Questi risultati indicano che cellule quiescenti anche in assenza di timidina nell'ambiente extracellulare possiedono un pool endogeno di timidina derivata dalla de fosforilazione del dTMP endogeno ad opera delle

deossinucleotidasi cdN e mdN. Questa è la prima dimostrazione *in situ* dell'azione di questi enzimi in assenza di timidina aggiunta dall'esterno o di manipolazione sperimentale dell'attività nucleotidasica. Anche in queste condizioni la TP compete con la TK2 per l'impiego del substrato, confermando che l'enzima timidina fosforilasi nelle cellule quiescenti influenza le dimensioni del pool del dTTP modulando la concentrazione della timidina che è il substrato della TK2 (Rampazzo et al., 2007).

4.2.2 Sintesi *de novo* del dTTP in fibroblasti quiescenti

Successivamente alla scoperta di p53R2 è stato dimostrato che nelle cellule quiescenti di controllo c'è sintesi *de novo* dei dNTP anche se a livelli 40 volte inferiori a quelli osservati nelle cellule proliferanti (Pontarin et al., 2007). Per verificare anche nel nostro sistema cellulare l'attività ribonucleotide reduttasica del complesso R1/p53R2, abbiamo da prima controllato tramite western blot la presenza delle tre subunità della RNR e di p53, il fattore di trascrizione da cui dipende l'induzione di p53R2, in fibroblasti C63 proliferanti e in quiescenza da dieci giorni (fig. 16). Nelle cellule quiescenti la subunità R2 non è rilevabile e la quantità di R1 è ridotta di oltre il 50% rispetto alle cellule proliferanti. Inoltre, l'incremento della quantità di p53 si accompagna a quello di p53R2 che diventa quasi 3 volte quello osservato nelle cellule ciclanti. L'aumento di p53 in letteratura viene riportato come un segnale dello stato di quiescenza (Itahana et al., 2002). Tuttavia, per escludere la possibilità che l'induzione di p53 sia dovuta ad una condizione di stress cellulare causata dal basso contenuto di siero, abbiamo mantenuto lo stesso tipo di cellule in quiescenza con il 10% di siero nel terreno, ma il risultato è rimasto invariato rispetto a quello mostrato in figura 16 (dati non mostrati).

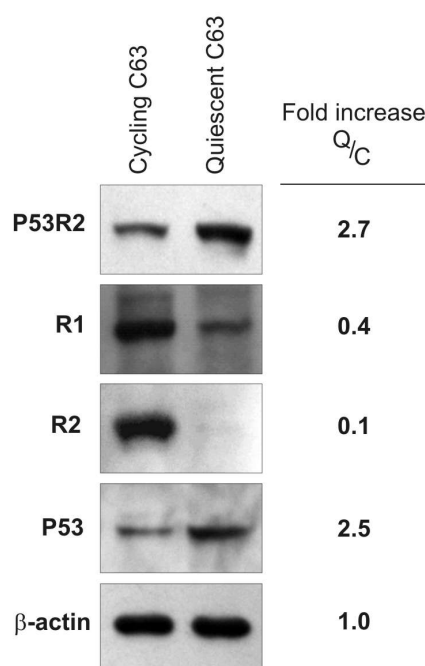


Fig. 16 Western blot di proteine estratte da cellule C63 proliferanti e quiescenti. Per ciascuna proteina analizzata è stata caricata la stessa quantità di proteine nelle cellule ciclanti e nelle quiescenti ma, a causa della diversa sensibilità degli anticorpi primari per le diverse proteine analizzate sono state impiegate quantità diverse di estratto. La β -actina è stata usata come controllo interno. Il rapporto tra i segnali è stato effettuato in base ai valori ottenuti dall'analisi quantitativa (vedi materiali e metodi paragrafo 3.11)

In base ai risultati ottenuti i fibroblasti C63 quiescenti possiedono le subunità R1 e p53R2 che formando un complesso enzimatico attivo potrebbero essere responsabili della sintesi *de novo* del dTTP. Per verificare questa ipotesi abbiamo condotto un esperimento di pulse-chase nei fibroblasti quiescenti inibendo la sintesi *de novo* mediante idrossiurea. Sono state considerate tre diverse condizioni: nel controllo le cellule hanno subito un pulse con 100 nM ^3H -TdR per 60 min, trascorsi i quali, sono state spostate in terreno fresco in assenza di timidina (chase) per 180 minuti; nelle altre due condizioni invece, trascorsi 50 minuti di pulse, le cellule sono state trattate con 3 o 15 mM HU e questo trattamento è stato mantenuto anche durante il chase in terreno privo di timidina. E' quindi stato estratto il pool cellulare totale a tempi diversi del chase e sono state determinate le dimensioni del pool del dTTP e la sua radioattività specifica (fig. 17).

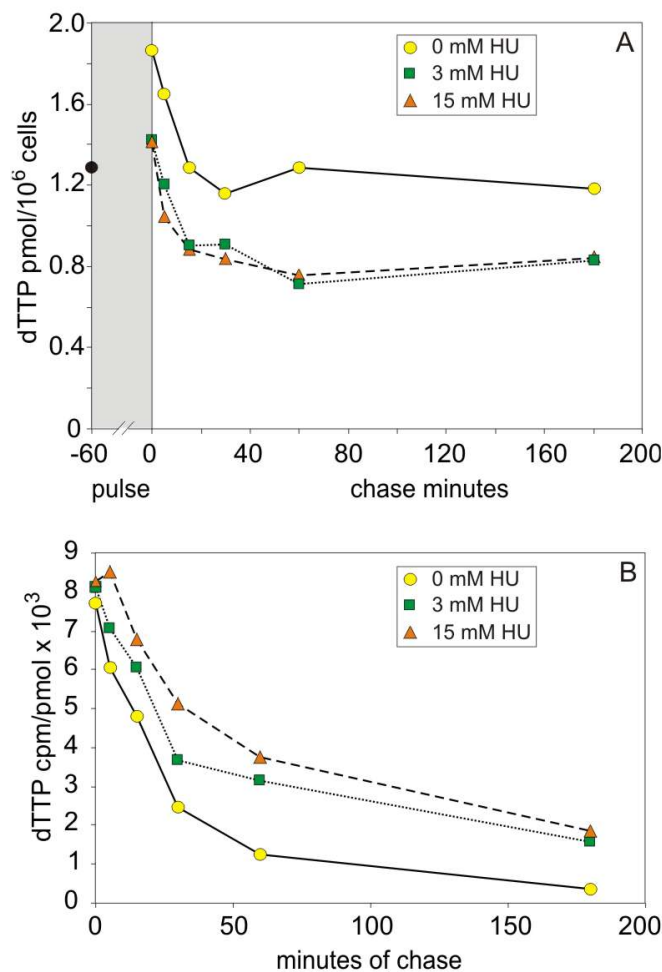


Fig. 17 Esperimento di pulse-chase con 100 nM ³H-TdR in fibroblasti C63 in quiescenza da dieci giorni. Tutte le cellule hanno subito un pulse di 60 minuti con 100 nM ³H-TdR (20000 cpm/pmol) a cui è seguito un chase di 180 minuti senza timidina. Dopo 50 minuti del pulse è stata aggiunta 3 o 15 mM HU a due gruppi di colture. Questo trattamento è stato mantenuto anche durante il chase. I controlli non hanno invece subito il trattamento con HU. In (A) sono riportate le dimensioni del pool del dTTP mentre in (B) l'andamento della radioattività specifica del dTTP durante il chase

Nei controlli il pool del dTTP durante i 60 minuti di pulse aumenta di circa il 30% passando da 1.3 a 1.9 pmol/10⁶ cellule, per ritornare ai valori iniziali dopo 15 minuti di chase in assenza di timidina esogena. Nelle cellule trattate con HU non si notano differenze tra le due dosi di inibitore impiegate e, poichè il trattamento con HU è iniziato negli ultimi 10 min del pulse, il contenuto di dTTP è inferiore a quello osservato nei controlli già all'inizio del chase. Questa diminuzione delle dimensioni del pool del dTTP nelle cellule trattate con HU prosegue per i primi 40

minuti del chase per poi stabilizzarsi a valori di dTTP pari al 60% di quelli osservati nel controllo (fig. 17A). La radioattività specifica nel controllo scende rapidamente durante i primi 30 minuti di chase per poi continuare a diminuire più lentamente. La continua perdita di radioattività del pool del dTTP dopo che le sue dimensioni si sono stabilizzate indica che nelle cellule è in atto un processo di riciclo del dTTP dovuto alla degradazione del ^3H -dTTP da parte delle 5'-deossinucleotidasi citosolica e mitocondriale e alla sua sostituzione con dTTP non marcato sintetizzato *de novo*. Nelle cellule trattate con HU questo processo è più lento soprattutto con la dose più elevata di inibitore. Nonostante ciò, dopo 30 minuti di chase la radioattività specifica è quasi dimezzata e continua a diminuire per tutta la durata del chase dimostrando che l'attività ribonucleotide reduttasica non è stata completamente inibita dalle dosi impiegate di HU (fig. 17B). I risultati ottenuti con il western blot e con l'esperimento di pulse-chase dimostrano quindi che nei fibroblasti quiescenti è presente il complesso R1/p53R2 che media la sintesi di dTTP *de novo* e che è responsabile del mantenimento del pool del dTTP in assenza di timidina esogena (Rampazzo et al., 2007).

4.2.3 Silenziamento della timidina chinasi mitocondriale in fibroblasti umani quiescenti

Dopo aver dimostrato che nei fibroblasti quiescenti esiste una rete di attività enzimatiche che insieme contribuiscono alla regolazione del pool del dTTP, abbiamo voluto investigare il ruolo della TK2 all'interno di questo sistema, cercando di chiarire quale sia il contributo relativo di ciascuno dei tre enzimi menzionati (TK2, timidina fosforilasi e ribonucleotide reduttasi). Abbiamo quindi silenziato la TK2 mediante RNA interference ed inibito gli altri due enzimi con i rispettivi inibitori chimici.

Per silenziare la TK2 le cellule C63, una volta raggiunta la confluenza, sono state trasfettate con una miscela di 4 siRNA aventi come bersaglio il trascritto della TK2 mentre, come controllo per la trasfezione, è stata impiegata una miscela di 4 siRNA che non riconoscono alcun gene. Dopo la trasfezione le cellule sono state mantenute in quiescenza ed in presenza degli siRNA per un totale di dieci giorni. Al termine del trattamento, a conferma dello stato di quiescenza, le cellule non mostravano attività della TK1 negli estratti proteici (dati non mostrati) e la

percentuale di fase S era dell'1% nei controlli e del 3.5% nelle cellule con la TK2 silenziata. Per verificare il grado di silenziamento della TK2 abbiamo effettuato una real-time PCR dove, oltre a misurare il livello di messaggero della TK2, abbiamo analizzato anche quello di p53 e delle subunità della RNR, comparandoli con i valori ottenuti in fibroblasti proliferanti (fig. 18A).

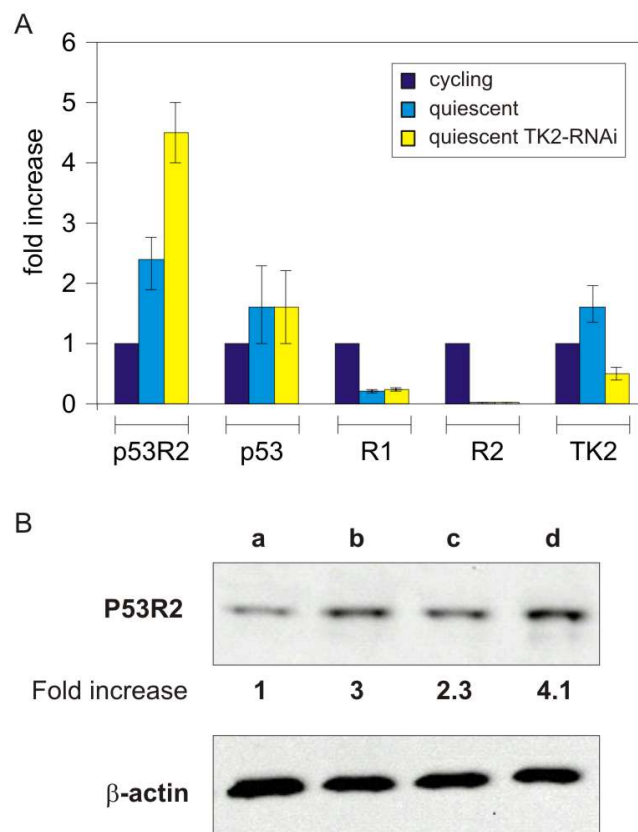


Fig. 18 Espressione delle sub unità della RNR, di p53 e della TK2 in fibroblasti C63 di controllo o silenziati per la TK2. In (A) vengono riportati i valori ottenuti mediante real-time PCR. I valori di espressione nelle cellule quiescenti di controllo e nelle cellule quiescenti dove la TK2 è stata silenziata vengono riferiti ai valori ottenuti nelle cellule C63 proliferanti. In (B) viene riportato il risultato di un western blot per la determinazione della quantità di p53R2 in C63 proliferanti (a), quiescenti (b), quiescenti trasfettate con siRNA di controllo (c) o per il silenziamento della TK2 (d). La β-actina è stata usata come controllo interno

Nelle cellule di controllo, in accordo con l'aumento di attività della TK2 osservato durante la quiescenza nel paragrafo 4.1.2, si nota un incremento del messaggero della TK2 rispetto alle cellule ciclanti mentre, nelle cellule dove la TK2 è stata silenziata la quantità di mRNA è inferiore al 50% rispetto alle cellule proliferanti. Oltre che dalla riduzione del messaggero il buon silenziamento della

TK2 è stato confermato dalla riduzione dell'attività dell'enzima. Infatti, in seguito allo spegnimento della TK2 la sua attività (0.17 ± 0.03 pmol/min/mg) è ridotta all'8% del valore osservato nei controlli non silenziati (2.96 ± 0.26 pmol/min/mg). Con il passaggio dallo stato di proliferazione allo stato di quiescenza il contenuto di messaggero di p53 e delle tre subunità della RNR rispecchia quanto ottenuto con il western blot in fig. 16, con la scomparsa di R2, la riduzione di R1 e l'induzione di p53 e p53R2. I fibroblasti di controllo e silenziati per la TK2 si comportano allo stesso modo rispetto alle cellule ciclanti a parte che per il contenuto di mRNA di p53R2 che in seguito al silenziamento è superiore di circa due volte rispetto al controllo.

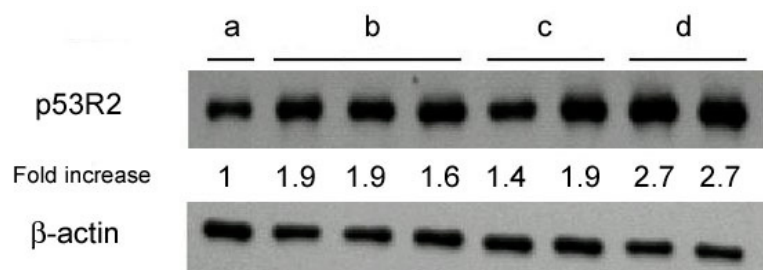


Fig. 19 Quantità di p53R2 in C63 proliferanti (a), quiescenti (b), quiescenti trasfettate con siRNA di controllo (c) o per il silenziamento della TK2 (d) determinate mediante western blot. La β-actina è stata usata come controllo interno

Questa osservazione è stata confermata anche mediante un'analisi western blot (fig. 19) confrontando il contenuto di p53R2 in fibroblasti C63 proliferanti e quiescenti, silenziati o meno per la TK2. Tuttavia sono necessarie ulteriori indagini per stabilire se effettivamente p53R2 viene indotta in seguito al silenziamento della TK2 e individuare il meccanismo di tale induzione.

Per esaminare il contributo relativo della TK2 e della via *de novo* nella sintesi del dTTP in fibroblasti quiescenti all'interno del network che comprende anche TP e deossinucleotidasi e valutare l'influenza della disponibilità di timidina abbiamo applicato il seguente protocollo. Cellule C63 sono state mantenute in quiescenza per dieci giorni in presenza degli siRNA di controllo o per il silenziamento della TK2. Il giorno dell'esperimento ad entrambi i gruppi di cellule è stato sostituito il medium con terreno fresco contenente lo 0.1% di siero dializzato e, dopo 30 minuti, sono stati effettuati diversi trattamenti. Le cellule sono state suddivise in

quattro gruppi: i controlli che non hanno ricevuto alcun trattamento, le cellule che sono state trattate con 3 mM HU o 100 μ M 5BU e quelle che hanno ricevuto entrambi gli inibitori. Dopo 30 o 45 minuti al terreno è stata aggiunta ^3H -TdR 25 nM per ulteriori 5 o 20 minuti. In questo modo tutte le cellule incubate con gli inibitori hanno subito il trattamento per lo stesso periodo di tempo (50 minuti). Sia tra le cellule silenziate che di controllo due gruppi, uno inibito con la sola HU ed uno privo di trattamenti, non sono stati incubati con ^3H -TdR per determinare le dimensioni del pool del dTTP in assenza di timidina esogena. Dopo aver estratto i pool nucleotidici cellulari è stato misurato il pool del dTTP e la sua radioattività specifica (fig.20).

Tra le cellule dove la TK2 è stata silenziata e le cellule di controllo si osserva una netta differenza. Infatti, le dimensioni del pool del dTTP per tutte le condizioni sono più basse quando la TK2 è stata silenziata rispetto ai controlli (fig. 20A) ed è ridotta anche l'incorporazione di ^3H -TdR esogena (fig. 20B). In assenza di timidina e di inibitori le dimensioni del pool del dTTP nelle cellule silenziate sono inferiori solo del 10% rispetto ai controlli. Quando nel terreno viene aggiunta la timidina le cellule non silenziate aumentano il loro contenuto di dTTP più efficientemente di quelle silenziate. Infatti dall'incremento delle dimensioni del pool dopo 20 minuti di incubazione con ^3H -TdR abbiamo calcolato che il pool aumenta nei controlli ad una velocità di 0.03 pmol/minuto e che nelle cellule silenziate la velocità è dimezzata (0.016 pmol/min). Questo comportamento si osserva anche in presenza di 5BU con una velocità di incorporazione che arriva a 0.08 pmol/minuto nei controlli e a sole 0.025 pmol/minuto in seguito al silenziamento della TK2 (fig. 20A).

Questi risultati indicano inoltre che, anche se di molto ridotta, l'attività della TK2 non è stata completamente persa con il silenziamento. Inibendo la sintesi *de novo* con HU il pool del dTTP si riduce del 50% nelle cellule silenziate e del 30% nei controlli rispetto alle dimensioni dei pool in assenza di timidina e di 5BU (fig. 20A). Inoltre, se le cellule di controllo importano e fosforilano la ^3H -TdR compensando l'inibizione dell'attività ribonucleotide reduttasica causata dall'HU, ciò non accade nelle cellule in cui l'attività della TK2 è ridotta in seguito al silenziamento. Ciò è ancora più evidente in presenza di 5BU infatti, nelle cellule di controllo in presenza di HU e 5BU il pool del dTTP supera le dimensioni di

partenza mentre, quando la TK2 è silenziata non vengono raggiunte nemmeno le dimensioni originarie del pool e la sua quantità è solo il 60% di quella ottenuta nei controlli non silenziati (fig. 20A).

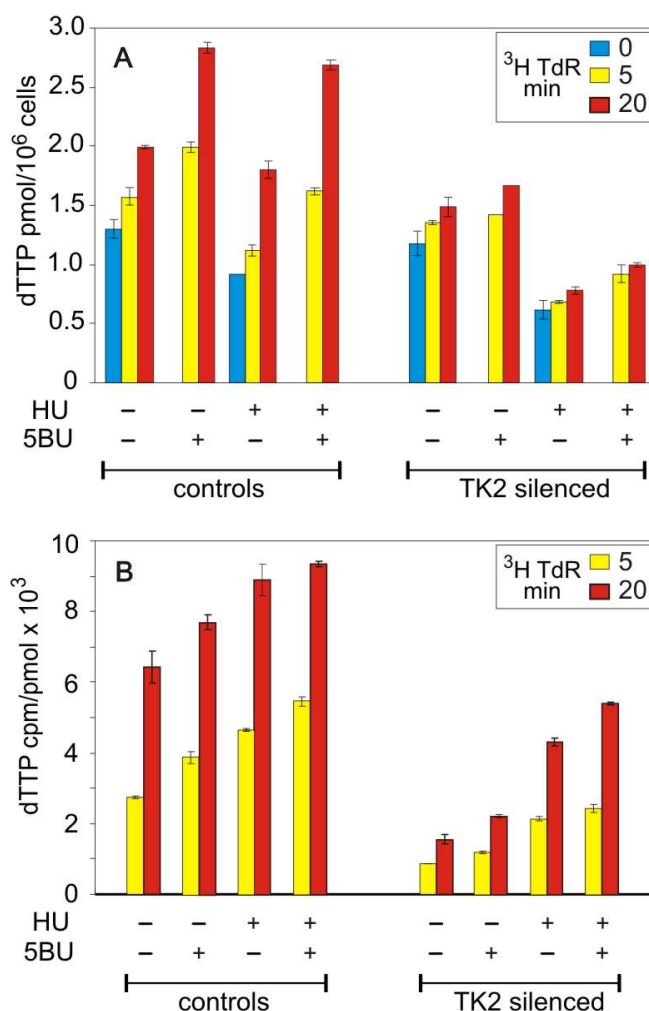


Fig. 20 Influenza della timidina esogena nella diminuzione del pool del dTTP in cellule C63 quiescenti in seguito al silenziamento della TK2, all'inibizione della TP (con 100 μ M 5BU) o della sintesi *de novo* (con 3 mM HU). In (A) vengono riportate le dimensioni del pool del dTTP mentre in (B) la radioattività specifica del dTTP in seguito all'incubazione con 25 nM ³H-TdR 20000 cpm/pmol

Questo risultato è stato ottenuto anche nel pool mitocondriale di due colture che hanno subito lo stesso trattamento con HU e 5BU: il pool mitocondriale del dTTP è di 0.05 pmol/10⁶ cellule nei fibroblasti silenziati e 0.14 pmol/10⁶ cellule nei controlli (dati non mostrati). Le variazioni contemporanee del pool mitocondriale e citosolico riflettono l'esistenza di comunicazione tra i due pool di dNTP.

La radioattività specifica del dTTP sia nei controlli che nelle cellule silenziate

è sempre inferiore a quella della ^3H -TdR di partenza (20000 cpm/pmol) indicando che in tutte le condizioni il dTTP viene sintetizzato in parte dalla sintesi di recupero dipendente dalla TK2 e, per la restante parte, attraverso la sintesi *de novo* (fig. 20B). Dopo 20 minuti di incubazione con ^3H -TdR la radioattività del dTTP nelle cellule di controllo è il 30% di quella della ^3H -TdR, indicando che il rimanente 70% di dTTP è sintetizzato *de novo*. Nelle cellule dove la TK2 è stata silenziata, la quantità di dTTP sintetizzato attraverso la via di recupero si riduce all'8% (fig. 20B). Inibendo la timidina fosforilasi mediante 5BU le percentuali della sintesi di recupero aumentano al 40% e all'11% rispettivamente nelle cellule di controllo e silenziate, mentre con l'inibizione della ribonucleotide reductasi dovuta all'HU si arriva rispettivamente al 45% e al 25% di contributo della TK2, confermando l'ipotesi che la TK2, se attiva, è in grado di compensare l'inibizione della via *de novo* per il mantenimento del pool del dTTP (fig. 20B).

Con questi esperimenti abbiamo dimostrato che nei fibroblasti in quiescenza le dimensioni del pool del dTTP sono determinate dall'azione integrata di R1/p53R2 nella sintesi *de novo* e della TK2 nella sintesi di recupero e che l'attività della TK2 è influenzata sia dalla disponibilità di timidina che dalla competizione con la timidina fosforilasi (Rampazzo et al., 2007). Il contenuto relativo di ciascun componente di questa rete enzimatica probabilmente varia nei diversi tessuti, ad esempio nel muscolo scheletrico la timidina fosforilasi non è rilevabile ed il contenuto di TK2 è notevolmente ridotto rispetto ai fibroblasti. Per comprendere quindi quali meccanismi metabolici intervengono nella determinazione del fenotipo causato dalla perdita di uno dei componenti della rete enzimatica è necessario analizzare l'intero insieme dei fattori coinvolti.

4.2.4 Metabolismo della timidina in due linee di fibroblasti con la timidina chinasi mitocondriale mutata

La mutazione della TK2, originariamente associata ad una severa miopatia, è associata in realtà ad uno spettro più ampio di fenotipi patologici inoltre i tempi di progressione della malattia possono differire in base alla tipologia della mutazione. Due pazienti affetti da MDS miopatica presentano nel gene della TK2 mutazioni in eterozigosi (T77M/R161K descritta in Wang et al., 2005, R152G/K171del descritta in Vilà et al., 2003) che determinano danni muscolari e al sistema nervoso centrale con caratteristiche diverse nei due casi. Questi due pazienti sono tra i pochi in cui la malattia ha un decorso più lento, i due soggetti hanno infatti raggiunto l'adolescenza, e presentano deplezione del mtDNA nel muscolo scheletrico. Nei pazienti affetti da MDS miopatica la deplezione del mtDNA non interessa invece altri tessuti quali cuore, reni e fibroblasti (Moraes et al., 1991). Abbiamo voluto investigare se nei fibroblasti di pelle di questi due pazienti (Pa e Pb) il network degli enzimi coinvolti nella sintesi del dTTP si sia adattato, per esempio modificando i livelli di espressione di alcuni dei suoi componenti, per compensare le mutazioni della TK2. Negli estratti proteici dei fibroblasti quiescenti dei due pazienti la TK2 mantiene solo il 10-40% di attività rispetto ai fibroblasti di controllo C63 e C72. Abbiamo misurato le dimensioni dei pool di dNTP cellulari e mitocondriali estratti dai fibroblasti in quiescenza da dieci giorni sia dei due pazienti che delle linee cellulari di controllo. Il pool cellulare totale del dTTP è risultato invariato nei tre casi, cioè 1.72 ± 0.2 pmol/ 10^6 cellule nei controlli, 1.67 ± 0.3 nel paziente Pa e 1.33 ± 0.2 nel paziente Pb. Allo stesso modo anche il pool mitocondriale del dTTP non varia tra controlli e pazienti: 0.11 ± 0.03 pmol/ 10^6 cellule nei controlli e 0.08 ± 0.03 pmol/ 10^6 cellule nei pazienti. Per comprendere la ragione di questo mantenimento delle dimensioni del pool del dTTP anche in presenza di mutazioni alla TK2 che ne compromettono l'attività, abbiamo indagato il grado di sintesi *de novo* e l'attività catabolica delle 5'-deossinucleotidasi e della TP nei fibroblasti di controllo e in quelli dei pazienti Pa e Pb. Un aumento dell'attività ribonucleotide reduttasica potrebbe infatti compensare la carenza di dTTP sintetizzato attraverso la via di recupero e d'altra parte, una riduzione della degradazione del dTMP e della timidina potrebbe agevolare l'attività timidino chinasi. Non avendo

riscontrato differenze tra controlli e pazienti anche in questi fattori (dati non mostrati), abbiamo dedotto che nei pazienti affetti da MDS miopatica i fibroblasti di pelle non attivano un meccanismo di compensazione che li rende immuni alla patologia. Abbiamo concluso che i fibroblasti di controllo possiedono un eccesso di TK2 la cui attività non viene completamente sfruttata in condizioni di normalità. Infatti misurando la sintesi di recupero *in situ* nei due tipi di fibroblasti abbiamo riscontrato lo stesso tasso di sintesi nei fibroblasti di controllo e in quelli dei pazienti (Frangini et *al.*, 2009). La bassa attività residua della TK2 nei mutanti è quindi sufficiente a mantenere a livelli normali il pool del dTTP nei fibroblasti quiescenti. Ciò spiegherebbe l'assenza di deplezione del mtDNA nei fibroblasti di pazienti con mutazioni della TK2 (Moraes et *al.*, 1991).

4.3 Analisi funzionale di due ipotetici trasportatori mitocondriali di nucleotidi

Con il lavoro precedentemente descritto abbiamo dimostrato che per il mantenimento del pool mitocondriale del dTTP è necessaria la comunicazione tra il citoplasma ed i mitocondri. Tra i due compartimenti lo scambio di timidina potrebbe avvenire attraverso il trasportatore equilibrativo hENT1 mentre, per quanto concerne i nucleotidi timidinici, e più in generale pirimidinici, le conoscenze sul loro trasporto sono molto limitate. Nel nostro laboratorio è stato dimostrato, in esperimenti con mitocondri isolati da fegato di topo, che esiste uno scambio di fosfati timidinici tra i due compartimenti che avviene grazie all'importo di dTMP all'interno dei mitocondri (Ferraro et *al.*, 2006). Un altro gruppo di ricerca ha invece riscontrato l'esistenza di un trasportatore specifico per il dCTP nel mitocondrio, la cui natura molecolare tuttavia non è ancora stata identificata (Bridges et *al.*, 1999). Come spiegato nel paragrafo 1.5 nell'uomo esiste un gruppo di geni, *slc25*, le cui proteine costituiscono la super-famiglia di trasportatori mitocondriali (MCF). Molti di questi trasportatori tuttavia non sono ancora stati caratterizzati da un punto di vista funzionale ed i loro substrati rimangono ancora ignoti. Abbiamo preso in considerazione due geni che codificano due proteine non caratterizzate funzionalmente, SLC25A33 e SLC25A36, che oltre ad essere molto simili tra loro mostrano un'identità di sequenza elevata con Rim2p, che in lievito è stato identificato come il

trasportatore di nucleotidi pirimidinici (Marobbio et *al.*, 2006). Di recente è stato proposto che SLC25A33 sia responsabile del trasporto di UTP attraverso la membrana mitocondriale interna. I dati a supporto di questa ipotesi derivano da esperimenti condotti con la proteina ricombinante inserita in liposomi, analizzando il trasporto di concentrazioni millimolari e quindi non fisiologiche di substrato (Floyd et *al.*, 2007). Durante il mio dottorato abbiamo invece analizzato funzionalmente le due proteine in cellule integre per indagare il loro possibile coinvolgimento nel trasporto di nucleotidi attraverso la membrana mitocondriale interna. Poiché SLC25A33 presenta livelli di espressione elevati in molte linee cellulari tumorali (Floyd et *al.*, 2007), abbiamo impiegato le cellule HEK 293 per effettuare degli esperimenti di silenziamento delle due proteine ed analizzarne le conseguenze sulla distribuzione dei pool nucleotidici tra citosol e mitocondri.

*4.3.1 Silenziamento genico di *slc25a33* e *slc25a36**

Per silenziare ciascuno dei due ipotetici trasportatori abbiamo trasfettato le cellule HEK 293 con quattro diversi plasmidi forniti dalla ditta OriGene mentre, come controllo le cellule sono state trasfettate con il plasmide vuoto. Abbiamo quindi estratto dalle colture policlonali trasfettate l'RNA per quantificare mediante real-time PCR il livello di silenziamento raggiunto per ciascun gene. Mediante questa analisi abbiamo ristretto la gamma dei plasmidi disponibili a due per gene: i plasmidi 483 e 484 che inducevano una riduzione dell'mRNA di *slc25a33* rispettivamente del 60% e del 15% e i plasmidi 497 e 500 che riducevano l'espressione di *slc25a36* rispettivamente del 35% e del 55%. Nel tentativo di silenziare contemporaneamente entrambi i geni abbiamo inoltre allestito una coltura policlonale di cellule HEK 293 co-trasfettate con i plasmidi 484 e 497, tuttavia con questa metodica nessuno dei due geni è stato spento in misura soddisfacente. Considerando il buon livello di silenziamento ottenuto con i plasmidi 483 per *slc25a33* e 500 per *slc25a36* abbiamo allestito sub-colture delle cellule trasfettate dalle quali abbiamo isolato 17 cloni trasfettati con il plasmide 483 e 30 contenenti il plasmide 500 oltre a 6 cloni di controllo trasfettati con il plasmide vuoto. Le analisi di real-time PCR hanno rivelato che in nessuno dei cloni isolati contenenti il plasmide 500 era stato indotto un buon silenziamento di *slc25a36* infatti, i livelli di mRNA residuo erano sempre superiori al 50%

rispetto ai controlli non silenziati. Nel caso delle cellule trasfettate per silenziare *slc25a33* abbiamo invece scelto per le successive analisi tre cloni denominati 483 3, 483 4 e 483 11 che mostravano circa l'80% di silenziamento del gene (fig. 21). Come controllo sono stati isolati cinque cloni denominati C 6, 14, 16, 17 e 20.

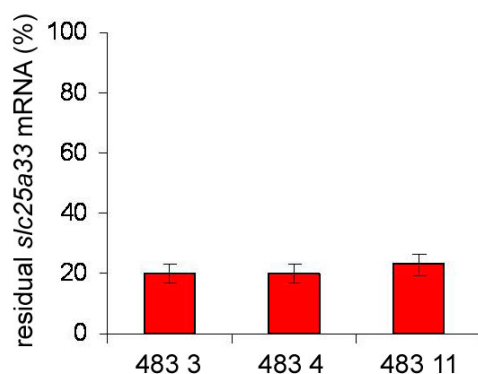


Fig. 21 Percentuale di mRNA residuo per il gene *slc25a33* in tre cloni dove l'espressione del gene è stata silenziata stabilmente. Le barre di errore si riferiscono ai valori calcolati in riferimento a due diversi controlli non silenziati

Nelle cellule di mammifero molti enzimi coinvolti nella sintesi dei precursori del DNA, come la TK1 e le subunità R1 e R2 della RNR, sono regolati in base alla progressione lungo il ciclo cellulare e presentano un picco di attività durante la fase S. Di conseguenza le dimensioni dei pool dei dNTP citosolici e mitocondriali variano durante le fasi di crescita cellulare. Per poter programmare gli esperimenti di estrazione dei pool nucleotidici in modo da avere cellule in attiva proliferazione, abbiamo allestito delle curve di crescita per i cloni 483 3, 4 e 11 e per il clone di controllo C 6. Gli altri cloni di controllo non sono stati analizzati in quanto crescevano in modo paragonabile a C 6.

Dal grafico ottenuto (fig. 22) si nota che le cellule si trovano in fase di crescita esponenziale al giorno 3, quando la percentuale di fase S varia tra il 32% e il 44% (tab. 12). In base a queste osservazioni abbiamo programmato gli esperimenti successivi.

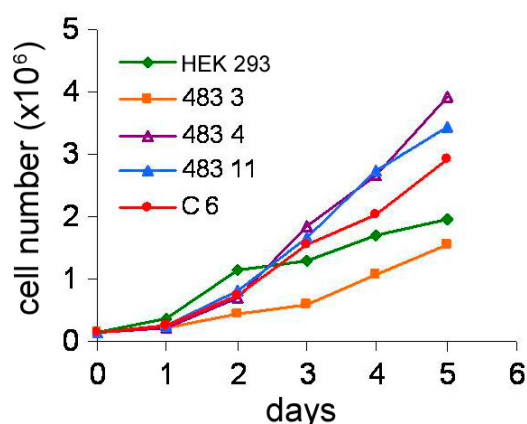


Fig. 22 Curve di crescita in tre cloni con *slc25a33* stabilmente silenziato, in un clone di controllo e in HEK 293 normali

clone	% di fase S	
	Giorno 3	Giorno 4
483 3	44	37
483 4	37	19
483 11	32	12
C 6	32	20

Tab. 12 Percentuale di fase S dei rispettivi cloni ottenute nei giorni 3 e 4 della curva di crescita

4.3.2 Silenziamento genico transiente di *slc25a36*

Non essendo stato possibile isolare cloni stabili per il silenziamento di *slc25a36* abbiamo optato per il silenziamento in modo transiente. Considerando che l'elevata similarità di sequenza tra le due proteine potrebbe riflettere una funzione ridondante all'interno della cellula, abbiamo ritenuto opportuno silenziarle contemporaneamente. A questo scopo il clone 483 11, che cresce meglio degli altri due cloni esaminati, è stato trasfettato con una miscela di 4 siRNA specifici per *slc25a36*. Invece, come riferimento non silenziato è stato trasfettato il clone di controllo C 6 con una miscela di siRNA non aventi alcun gene bersaglio. Il protocollo di trasfezione riportato nei materiali e metodi al paragrafo 3.3.2, è stato sviluppato per consentire un silenziamento sufficientemente prolungato per diminuire i livelli di proteina SLC25A36 che, essendo di membrana, si presume sia dotata di un lento turnover. Questo protocollo consente di usufruire, al momento degli esperimenti di estrazione dei pool nucleotidici, di cellule con una buona percentuale di fase S. Con gli esperimenti preliminari per la messa a punto delle condizioni di trasfezione, il clone 483 11 dopo 96 ore in presenza degli siRNA per *slc25a36* presentava una percentuale di mRNA residuo del gene pari al 3% di quella osservata in presenza degli siRNA di controllo. E' stato inoltre osservato che in seguito al silenziamento di entrambi i geni le cellule apparivano più grandi rispetto alle dimensioni del clone C 6 trasfettato con gli siRNA di

controllo e del clone 483 11 non trasfettato.

*4.3.3 Crescita cellulare, dimensioni cellulari, massa mitocondriale e mtDNA nelle cellule *slc25a33-RNAi* e *slc25a33-slc25a36-RNAi**

Le analisi dei pool nucleotidici vengono effettuate normalizzando il numero di pmoli di ciascun nucleotide per il numero di cellule da cui il pool è stato estratto. Tuttavia, se le dimensioni cellulari o la massa mitocondriale non sono paragonabili tra le linee cellulari a confronto, la normalizzazione delle dimensioni dei pool nucleotidici dovrà essere effettuata in base ad un parametro che comprenda la variabilità osservata. Considerando l'apparente aumento delle dimensioni cellulari nelle cellule co-silenziati, abbiamo confrontato le dimensioni cellulari e la massa mitocondriale in cellule di controllo, in cellule dove è stato silenziato solamente *slc25a33* e dove invece sono stati silenziati entrambi i geni.

A questo scopo abbiamo impiegato il clone di controllo C 6 e il clone 483 11 stabilmente silenziato per il gene *slc25a33*. Entrambe le linee hanno subito le stesse manipolazioni trasfettando il clone C 6 con gli siRNA di controllo e il clone 483 11 o con gli siRNA di controllo o con gli siRNA per *slc25a36*. Le cellule sono quindi state lasciate in presenza degli siRNA per 72, 96 e 120 ore (3, 4 e 5 giorni). Nei tre giorni di analisi il silenziamento di *slc25a33* nelle cellule singole e doppie silenziate era circa dell'87% rispetto al controllo e quello di *slc25a36*, nelle doppie silenziate, era circa del 99%. A ciascun tempo le cellule sono state contate ed è stata valutata la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare analizzandole al citofluorimetro (fig. 23). Le cellule di controllo e quelle silenziate solo per *slc25a33* hanno continuato a crescere durante i tre giorni di analisi e la distribuzione lungo il ciclo cellulare è molto simile tra loro e rispecchia il raggiungimento della confluenza tra il quarto e il quinto giorno. Le cellule in cui sono stati silenziati entrambi i geni appaiono invece bloccate infatti, durante i tre giorni, non aumentano di numero nonostante la buona percentuale di fase S e mantengono invariata la loro posizione nel ciclo cellulare.

Per analizzare la massa mitocondriale le cellule sono state incubate con il colorante MitoTracker Green FM che si accumula all'interno dei mitocondri seguendo la differenza di potenziale attraverso la membrana mitocondriale interna. Nelle tabelle in figura 24 vengono riportati i valori della statistica

calcolati dal programma Cell Quest sulla componente principale delle tre colture (M2).

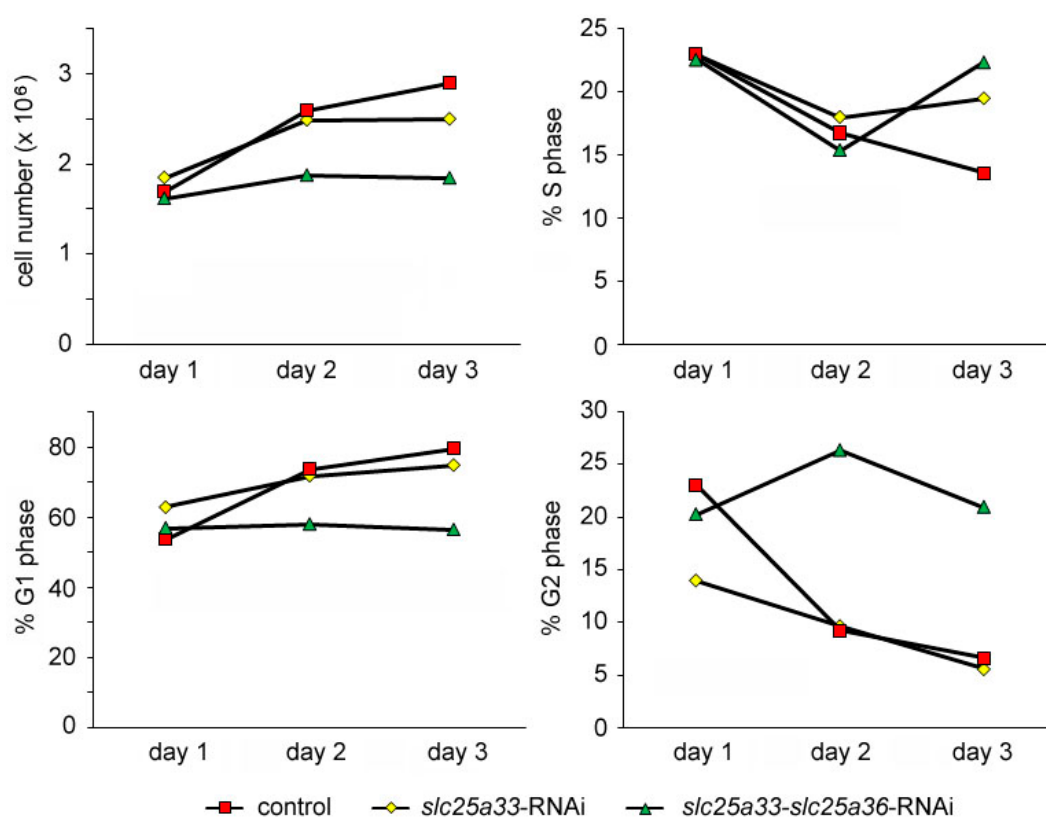


Fig. 23 Distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare e numero di cellule riscontrato in cellule di controllo, cellule *slc25a33*-RNAi e *slc25a33-slc25a36*-RNAi durante tre giorni di analisi

Nei grafici è invece rappresentato l'andamento dell'assorbimento del colorante mitocondriale da parte dell'intera popolazione cellulare analizzata per ciascuna condizione. In ogni coltura, tenendo conto del numero di cellule che costituiscono la componente principale e dei valori medi di quest'ultima si può concludere che le cellule silenziate per *slc25a33-slc25a36* presentano una massa mitocondriale maggiore rispetto ai controlli e alle singole silenziate dove invece è simile (fig. 24). Inoltre, in seguito al doppio silenziamento un numero maggiore di cellule ricade nell'area del grafico corrispondente al background di fluorescenza indicando che un numero maggiore di cellule non hanno incorporato il colorante mitocondriale probabilmente a causa di alterazioni nel potenziale mitocondriale. In tutte le tre linee cellulari la fluorescenza media è maggiore al giorno 3 mentre nei successivi due giorni si stabilizza a valori diminuiti del 15-20%.

Analisi della massa mitocondriale

Giorno 3		
RNAi	% cellule in M2	Media M2
Controlli	98	229
<i>slc25a33</i>	95	262
<i>slc25a33-slc25a36</i>	92	288

Giorno 4		
RNAi	% cellule in M2	Media M2
controlli	95	196
<i>slc25a33</i>	96	204
<i>slc25a33-slc25a36</i>	82	279

Giorno 5		
RNAi	% cellule in M2	Media M2
controlli	95	197
<i>slc25a33</i>	96	215
<i>slc25a33-slc25a36</i>	78	293

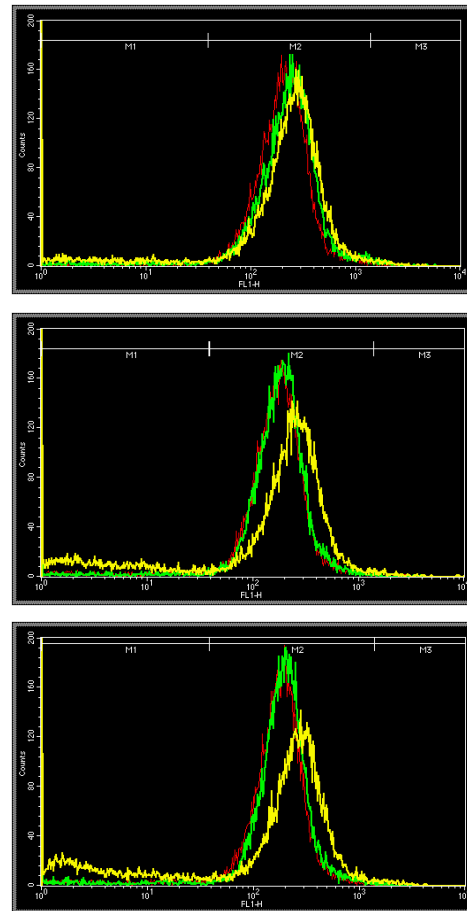


Fig. 24 Analisi della massa mitocondriale in cellule di controllo (rosso), cellule *slc25a33*-RNAi (verde) e *slc25a33-slc25a36*-RNAi (giallo). Nelle tabelle vengono riportati i valori della statistica calcolata sulla componente principale (M2) della popolazione cellulare analizzata. I valori medi sono indicativi della massa mitocondriale della popolazione M2 nei giorni 3, 4 e 5 di trasfezione. Nei grafici nell'asse delle ordinate viene indicato il numero di cellule e in quello delle ascisse i picchi di assorbimento del MitoTracker Green FM in scala logaritmica

Durante la valutazione della massa mitocondriale abbiamo analizzato anche le dimensioni cellulari negli stessi campioni.

Analisi delle dimensioni cellulari

Giorno 3		
RNAi	% cellule in M2	Media M2
controlli	89	454
<i>slc25a33</i>	82	467
<i>slc25a33-slc25a36</i>	79	554

Giorno 4		
RNAi	% cellule in M2	Media M2
controlli	82	489
<i>slc25a33</i>	82	517
<i>slc25a33-slc25a36</i>	66	605

Giorno 5		
RNAi	% cellule in M2	Media M2
controlli	84	475
<i>slc25a33</i>	85	517
<i>slc25a33-slc25a36</i>	66	575

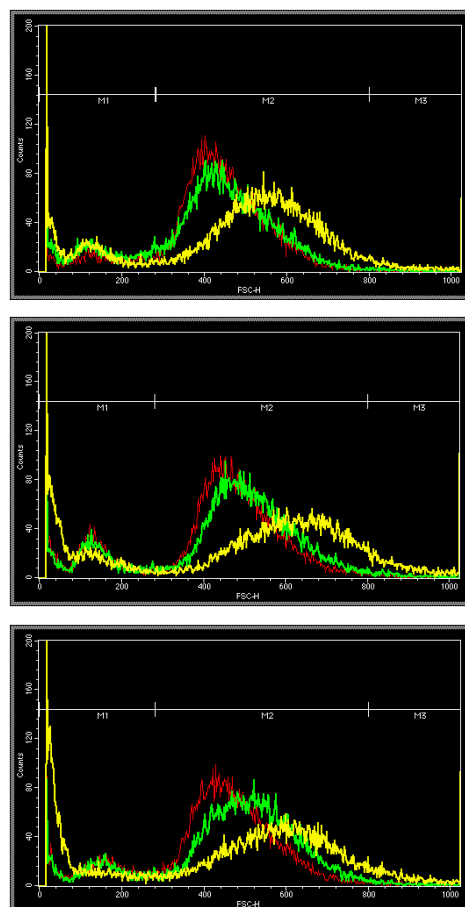


Fig. 25 Analisi delle dimensioni cellulari in cellule di controllo (rosso), cellule *slc25a33*-RNAi (verde) e *slc25a33-slc25a36*-RNAi (giallo). Nelle tabelle vengono riportati i valori della statistica calcolata sulla componente principale (M2) della popolazione cellulare analizzata. I valori medi sono indicativi delle dimensioni cellulari della popolazione M2 nei giorni 3, 4 e 5 di trasfezione. Nei grafici nell'asse delle ordinate viene indicato il numero di cellule e in quello delle ascisse i valori di forward scatter correlati alle dimensioni cellulari

Nelle tabelle in figura 25 vengono riportati i valori della statistica calcolati dal programma Cell Quest sulla componente principale della popolazione (M2) delle tre colture. Nei grafici viene invece illustrato l'andamento del parametro di forward scatter, che è indicativo delle dimensioni cellulari, nell'intera popolazione analizzata per ciascuna delle tre colture (fig. 25). Nel lavoro di Floyd et al. (2007), in seguito al silenziamento di *slc25a33*, era stata riscontrata la diminuzione delle dimensioni cellulari. Con le nostre analisi invece, in seguito al silenziamento dello stesso gene, non abbiamo riscontrato questa diminuzione in quanto le dimensioni cellulari sono simili a quelle della linea di controllo. Nelle cellule in cui

entrambi i geni sono stati silenziati abbiamo invece osservato un aumento della dimensione cellulare nella popolazione principale M2 e un aumento progressivo del numero di cellule piccole (popolazione M1) che al giorno 5 sono circa il doppio rispetto alle altre due linee (tab. 13).

% cellule nella popolazione M1			
	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 5
Controllo	11	18	16
<i>slc25a33</i> -RNAi	18	16	14
<i>slc25a33-slc25a36</i> -RNAi	18	25	28

Tab. 13 Percentuale di cellule delle tre popolazioni che costituiscono la componente delle cellule più piccole (M1) nei tre giorni di trasfezione

In molte patologie mitocondriali lo sbilanciamento delle dimensioni dei pool nucleotidici provoca deplezione del DNA mitocondriale. Per verificare se il silenziamento di uno o di entrambi gli ipotetici trasportatori influenza il contenuto di mtDNA, ai giorni 4 e 5 dell'esperimento abbiamo estratto il DNA genomico dalle tre linee per analizzare il contenuto del mtDNA mediante real-time PCR quantitativa. I risultati riportati in tabella 14 mostrano tuttavia che nei due giorni considerati il rapporto tra il contenuto di mtDNA e di DNA nucleare non varia con il silenziamento di *slc25a33* o di *slc25a33-slc25a36* rispetto ai controlli non silenziati (tab. 14).

mtDNA/nDNA		
	Giorno 4	Giorno 5
Controlli	293	244
<i>slc25a33</i> -RNAi	304	255
<i>slc25a33-slc25a36</i> -RNAi	303	257

Tab. 14 Contenuto di mtDNA in ciascuna delle tre popolazioni dopo 4 e 5 giorni di trasfezione con siRNA. I valori sono stati ottenuti mediante real-time quantitativa e sono normalizzati per il contenuto di DNA nucleare

4.3.4 Analisi dei pool citosolici e mitocondriali dei ribo- e dei deossiribonucleotidi in cellule *slc25a33*-RNAi

Per verificare se il silenziamento del gene *slc25a33* interferisce con il normale scambio di nucleotidi tra mitocondri e citosol abbiamo estratto i pool nucleotidici mitocondriali e citosolici dai 3 cloni 483 3, 4 e 11 stabilmente silenziati per l'espressione del gene *slc25a33* e li abbiamo confrontati con i pool estratti da 5 cloni di controllo. Al momento dell'esperimento la percentuale di cellule in fase S era compresa tra il 36% ed il 49% e nei tre cloni 483 il grado di silenziamento di *slc25a33* era superiore al 60%. Le quantità dei nucleotidi sono state espresse normalizzando i valori di pmol/10⁶ cellule per il contenuto di ATP rispettivamente nei pool mitocondriali o citosolici (fig. 26). Il contenuto di ATP misurato in entrambi i compartimenti viene riportato in tabella 15. Il contenuto di ATP è un indicatore dello stato metabolico delle cellule e della bontà del procedimento di estrazione del pool. Normalizzando in base al contenuto di ATP si riducono quindi le probabilità che eventuali differenze tra i campioni analizzati siano artefatti e dipendano da variabilità introdotta durante la manipolazione dei campioni e l'estrazione dei pool nucleotidici. Poiché l'ATP è il nucleotide più abbondante, in seguito alla normalizzazione i valori ottenuti diventano notevolmente bassi, abbiamo espresso i valori normalizzati come percentuali rispetto al contenuto di ATP.

I pool dei deossinucleosidi trifosfati sono stati misurati mediante saggio enzimatico e in entrambi i compartimenti non sono state identificate differenze significative tra i cloni di controllo e i cloni silenziati per *slc25a33*. Le dimensioni dei quattro pool e la loro proporzione relativa sono in accordo con quelle osservate in precedenza nel nostro laboratorio in cellule proliferanti, dove i pool purinici sono inferiori a quelli pirimidinici in entrambi i compartimenti (Rampazzo et al., 2004). I pool dei ribonucleotidi ADP, ATP, UTP, CTP e GTP sono stati invece quantificati mediante HPLC. Anche in questo caso non abbiamo riscontrato variazioni nella loro quantità e nella distribuzione tra citosol e mitocondri in seguito al silenziamento di *slc25a33*.

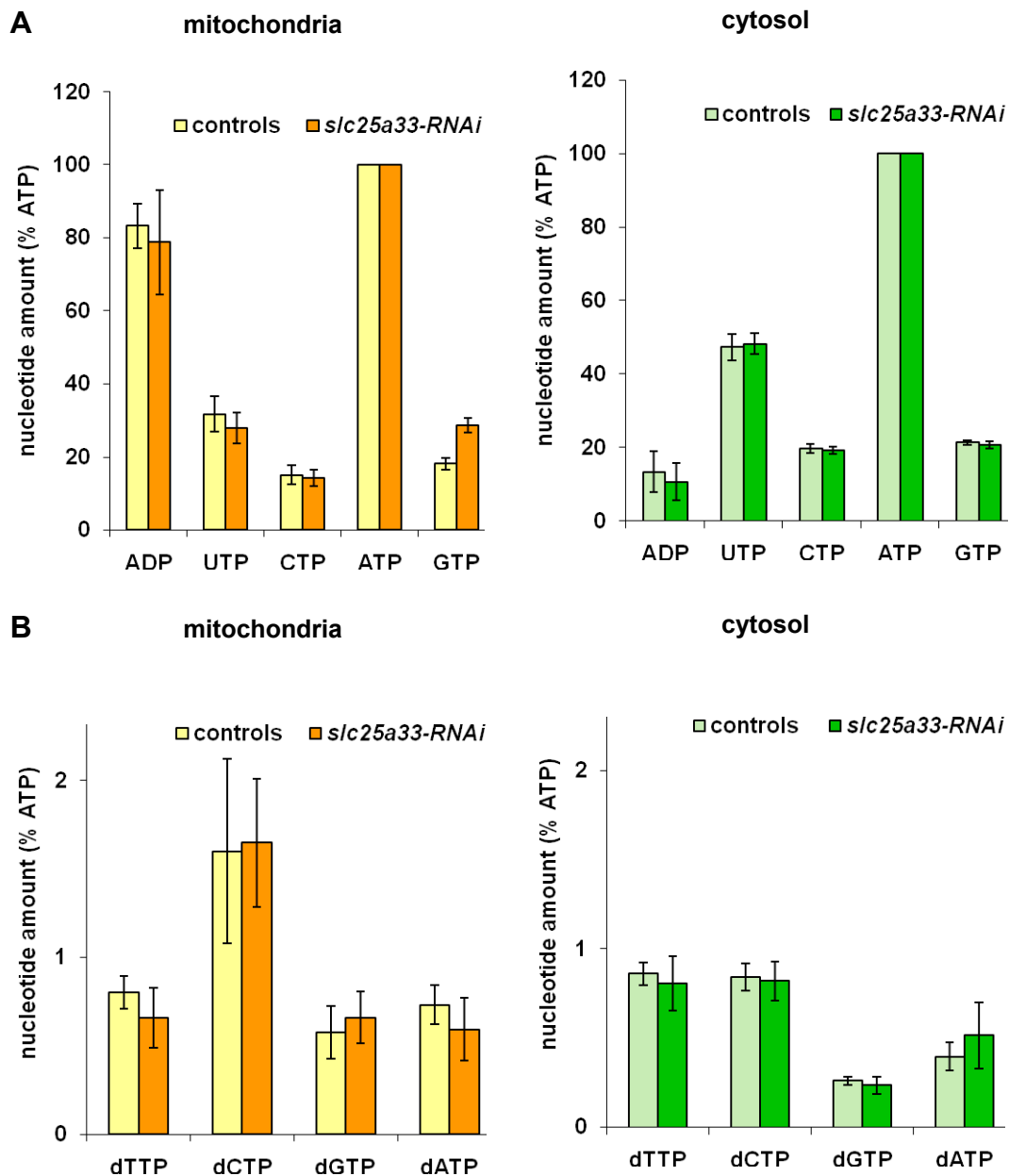


Fig. 26 Dimensioni dei pool di deossiribonucleotidi (A) e dei ribonucleotidi (B) mitocondriali e citosolici espressi come percentuale rispetto al contenuto di ATP rispettivamente nel pool citosolico e mitocondriale. Vengono riportati i valori medi ottenuti in tre cloni stabilmente silenziati per *slc25a33* e in cinque controlli. Le barre indicano le rispettive deviazioni standard

Il rapporto ottenuto tra le quantità di ATP ed ADP (tab. 15) rispecchia quello riportato in letteratura (Pontarin et al., 2003) mentre, al contrario di quanto osservato da Floyd et al. (2007), non abbiamo riscontrato una diminuzione nella quantità di UTP nei mitocondri nelle cellule *slc25a33-RNAi* rispetto ai controlli.

Tuttavia i nostri risultati sembrano più affidabili in quanto il rapporto tra ATP/ADP da noi ottenuto nei pool mitocondriali è superiore a quello riportato nel lavoro di Floyd (0.24 nei controlli e 0.17 nei cloni *slc25a33*-RNAi), riflettendo una migliore qualità dei campioni.

Contenuto di ATP nei pool citosolici e mitocondriali di cellule *slc25a33*-RNAi e di controllo

Cloni	pmol/10 ⁶ cellule			
	pool mitocondriali		pool citosolici	
	ATP	ATP/ADP	ATP	ATP/ADP
483 3	323	1.45	13758	15.78
483 4	104	1.01	6907	5.63
483 11	120	1.46	5313	12.86
C 6	171	1.17	7721	10.58
C 14	141	1.08	7499	4.22
C 16	165	1.32	6943	7.33
C 17	226	1.30	6491	11.91
C 20	136	1.16	7485	8.55

Tab. 15 Dimensioni dei pool dell'ATP espresso in pmol/10⁶ cellule e rapporto tra il contenuto di ATP e ADP nei pool mitocondriali e citosolici di 4 cloni 483 silenziati per *slc25a33* e 5 cloni di controllo

Pur non avendo riscontrato differenze nella distribuzione dei pool mitocondriali e citosolici conseguenti allo spegnimento genico di *slc25a33*, non possiamo escludere il suo coinvolgimento nel trasporto di nucleotidi attraverso la membrana mitocondriale. Infatti, in queste cellule è ancora espresso *slc25a36* che potrebbe compensare la ridotta espressione di *slc25a33*.

4.3.5 Analisi dei pool citosolici e mitocondriali dei ribo- e dei deossiribonucleotidi in cellule con doppio silenziamento di *slc25a33*-*slc25a36*-RNAi

Per verificare se il silenziamento contemporaneo di *slc25a33* ed *slc25a36* compromette la normale distribuzione di nucleotidi attraverso la membrana mitocondriale, abbiamo silenziato in modo transiente *slc25a36* nel clone 483 11 stabilmente silenziato per *slc25a33*. Come controllo è stato impiegato lo stesso

clone trasfettato con siRNA di controllo che non hanno alcun gene bersaglio. In un primo esperimento uno stesso numero di cellule 483 11 sono state trasfettate con gli siRNA di controllo o per lo spegnimento di *slc25a36*. Dopo 4 giorni di trasfezione oltre a verificare il silenziamento abbiamo contato le cellule e determinato la percentuale di fase S nelle due popolazioni (tab. 16). Abbiamo notato che il numero di cellule silenziate solo per *slc25a33* era doppio rispetto a quelle doppie silenziate nonostante la percentuale di fase S fosse superiore nella seconda popolazione. Questo risultato è in accordo con quanto osservato nel paragrafo 4.3.3. Abbiamo comunque estratto i pool nucleotidici mitocondriali e citosolici le cui analisi vengono riportate in seguito.

	Numero di cellule	% di fase S
<i>slc25a33</i> -RNAi	8.4 x 10 ⁶	11
<i>slc25a33-slc25a36</i> -RNAi	4.2 x 10 ⁶	17

Tab. 16 Numero di cellule e percentuale di fase S misurate nelle due popolazioni dopo quattro giorni di trasfezione con gli siRNA

In un secondo esperimento nel tentativo di ottenere una percentuale di fase S superiore e quanto più simile tra le cellule singole e doppie silenziate, abbiamo trasfettato un numero inferiore di cellule rispetto all'esperimento precedente per la trasfezione con gli siRNA di controllo e un ugual numero di cellule per il silenziamento di *slc25a36*. In questo esperimento abbiamo seguito l'andamento della percentuale di fase S al giorno 3 e 4 di trasfezione e negli stessi intervalli di tempo abbiamo inoltre valutato lo stato dei mitocondri in seguito al silenziamento saggiando l'attività dell'enzima mitocondriale citrato sintasi. Il grado di silenziamento sia nel primo che nel secondo esperimento è stato valutato mediante real-time PCR e in entrambi i giorni di trasfezione il silenziamento di *slc25a33* era superiore all'80% sia nelle cellule singole che doppie silenziate, mentre l'mRNA di *slc25a36* era ridotto di oltre il 90% rispetto alle cellule trasfettate con gli siRNA di controllo. In tabella 17 sono stati riportati i valori di attività della citrato sintasi, la percentuale di fase S e il numero di cellule contate nei giorni 3 e 4 di trasfezione. Nonostante le cellule trasfettate con gli siRNA di controllo fossero state seminate in numero minore rispetto a quelle trasfettate per silenziare *slc25a36*, le prime sono cresciute più velocemente e al terzo giorno di trasfezione

abbiamo ottenuto un ugual numero di cellule nelle due condizioni, con una percentuale di fase S uguale pari al 23%. Al giorno 4, come osservato in precedenza, le cellule *slc25a33-slc25a36*-RNAi sembrano bloccate in quanto non sono aumentate di numero e la loro percentuale di fase S è diminuita solo al 17%. Al contrario il clone 483 11 trasfettato con gli siRNA di controllo ha continuato a proliferare ed esaurendo lo spazio a disposizione nella piastra la sua fase S è notevolmente diminuita (tab. 17).

	giorno	Numero di cellule	% di fase S	A.S. citrato sintasi
<i>slc25a33</i> -RNAi	3	4.6×10^6	23	0.06
	4	7.8×10^6	8.1	0.06
<i>slc25a33-slc25a36</i> -RNAi	3	4.4×10^6	23	0.08
	4	4.3×10^6	17	0.10

Tab. 17 Numero di cellule, percentuale di fase S e attività della citrato sintasi espressa in U/mg misurate nelle due popolazioni dopo tre o quattro giorni di trasfezione con gli siRNA

Il saggio della citrato sintasi ha rivelato un leggero aumento di attività dell'enzima nelle cellule *slc25a33-slc25a36*-RNAi rispetto alle singole silenziate in entrambi i giorni di analisi (tab. 17). Questo risultato può dipendere da un aumento del numero o delle dimensioni dei mitocondri in queste cellule e sembra confermare quanto osservato nel paragrafo 4.3.3 dove abbiamo riscontrato un aumento della massa mitocondriale in seguito al doppio silenziamento dei due ipotetici trasportatori. In questo esperimento abbiamo estratto i pool nucleotidici sia al giorno 3 che al giorno 4. I risultati delle analisi dei pool sia del primo che del secondo esperimento sono riportati in tabella 18 e in figura 27. Esprimendo le dimensioni dei pool in pmol/ 10^6 cellule abbiamo osservato un aumento nei pool estratti dalle cellule dove entrambi i geni sono stati silenziati. Questo incremento, del 10-30% al giorno 3, è più sensibile al giorno 4 ma nonostante ciò non abbiamo riscontrato l'accumulo di un particolare nucleotide in uno dei due compartimenti. Tuttavia, normalizzando le dimensioni dei pool in base al contenuto di ATP nei rispettivi compartimenti, queste differenze si annullano indicando che probabilmente sono determinate dall'aumento delle dimensioni cellulari e della

massa mitocondriale.

Pool dei deossi- e dei ribonucleotidi in cellule *slc25a33*-RNAi e *slc25a33-slc25a36*-RNAi

A		<i>slc25a33</i> -RNAi		<i>slc25a33-slc25a36</i> -RNAi	
		mitocondri	citosol	mitocondri	citosol
Giorno 3	dTTP	0.7	41	0.9	42
	dCTP	1.5	47.6	2.2	47.8
	dGTP	0.6	14	0.7	19
	dATP	0.8	12	0.7	11
Giorno 4	dTTP	0.4 ± 0.1	23 ± 1	0.8 ± 0.1	34 ± 10
	dCTP	1.4 ± 0.1	32 ± 8	2.9 ± 0.1	45 ± 12
	dGTP	0.4 ± 0.1	11 ± 2	0.7 ± 0.1	19 ± 1
	dATP	0.5 ± 0.03	7 ± 0.3	0.8 ± 0.1	11 ± 1

B		<i>slc25a33</i> -RNAi		<i>slc25a33-slc25a36</i> -RNAi	
		mitocondri	citosol	mitocondri	citosol
Giorno 3	ADP	90	693	125	794
	UTP	19	2296	25	2474
	CTP	9	996	14	1190
	ATP	93	5140	150	6206
	GTP	24	1084	19	1194
Giorno 4	ADP	73 ± 11	659 ± 59	151 ± 17	889 ± 127
	UTP	15 ± 2	2146 ± 352	34 ± 2	2766 ± 374
	CTP	10 ± 0.1	936 ± 39	26 ± 9	1519 ± 65
	ATP	85 ± 3	5753 ± 814	158 ± 3	8333 ± 35
	GTP	22 ± 6	1163 ± 283	31 ± 7	1772 ± 173

Tab. 18 Dimensioni dei pool di deossiribonucleotidi (A) e dei ribonucleotidi (B) mitocondriali e citosolici espressi in pmol/10⁶ cellule. Vengono riportati i valori ottenuti al giorno 3 e i valori medi ottenuti nei due esperimenti al giorno 4 di trasfezione con la relativa deviazione standard

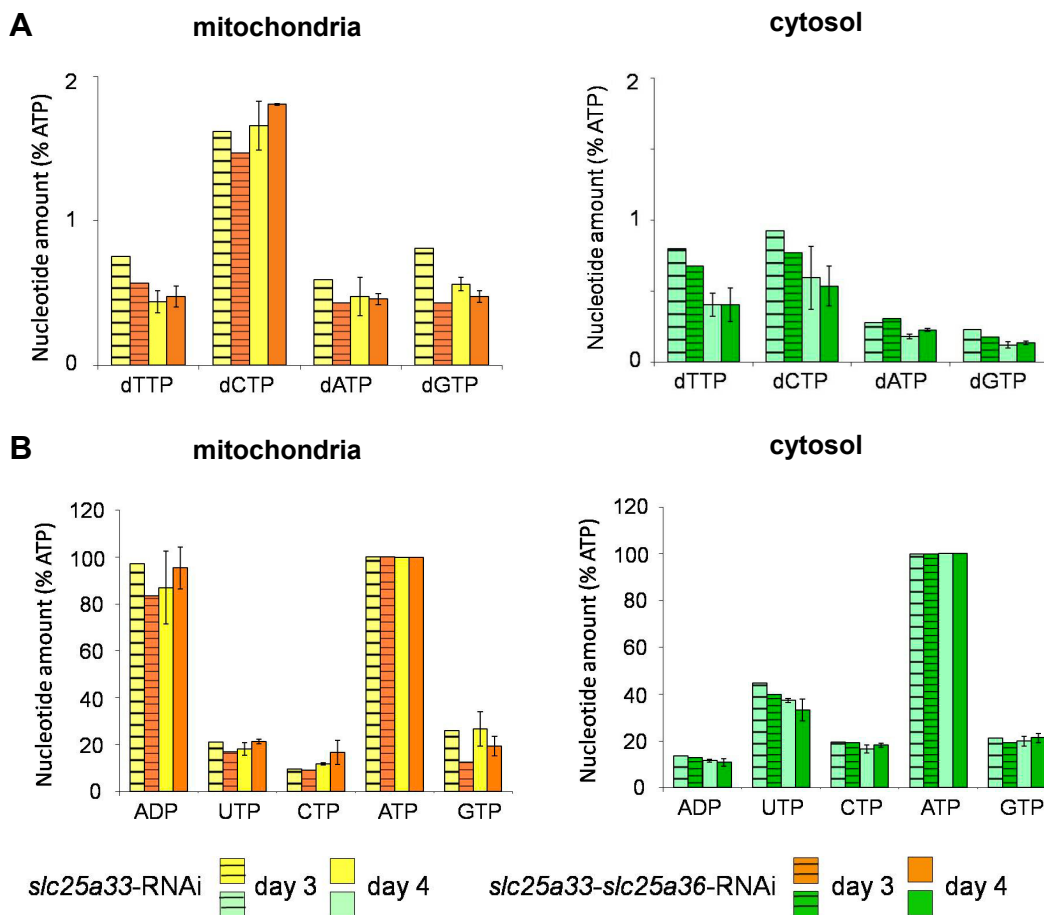


Fig. 27 Dimensioni dei pool di deossiribonucleotidi (A) e dei ribonucleotidi (B) mitocondriali e citosolici espressi come percentuale rispetto al contenuto di ATP rispettivamente nel pool citosolico e mitocondriale. Vengono riportati i valori ottenuti al giorno 3 e i valori medi ottenuti nei due esperimenti al giorno 4 di trasfezione con la relativa deviazione standard

Possiamo concludere che gli esperimenti eseguiti fin ora non consentono di affermare che SLC25A33 e SLC25A36 sono dei trasportatori nucleotidici anche se gli effetti osservati in seguito al doppio silenziamento suggeriscono un ruolo delle due proteine, ma soprattutto di SLC25A36, nella proliferazione cellulare. Sono quindi necessarie ulteriori indagini.

5. CONCLUSIONI

La timidina chinasi mitocondriale è un enzima chiave per la sintesi del dTTP nelle cellule eucariotiche. A differenza della timidina chinasi citosolica la TK2 è attiva durante tutto il ciclo cellulare e fosforila la timidina, la deossiuridina e la deossicitidina nelle forme monofosfato. La TK2 presenta una specificità inferiore rispetto alla TK1 e alla dCK per i substrati comuni con i due enzimi. Ciò ha reso difficile determinare l'attività della TK2 in estratti proteici cellulari dove i tre enzimi coesistono. Durante il mio lavoro ho messo a punto un nuovo saggio enzimatico che consente di misurare in modo diretto e specifico l'attività della TK2 *in vitro* anche in presenza della TK1 e della dCK. A questo scopo è stato fondamentale avere la disponibilità di cellule prive della TK1 (OST TK1⁻), e dell'inibitore non competitivo KIN109 specifico per la TK2. Come substrato abbiamo impiegato l'analogo nucleosidico BVDU marcato isotopicamente, che mostra un'affinità per la TK2 abbastanza elevata per poter essere impiegato a basse concentrazioni, senza che la TK1 interferisca. In cellule TK1⁻ confrontando la fosforilazione della BVDU con quella della timidina e servendoci dell'inibitore KIN109, abbiamo verificato che la fosforilazione della BVDU è quasi completamente attribuibile alla TK2. Abbiamo quindi provato che anche in cellule TK1⁺ (HOS TK1⁺) è possibile misurare l'attività della TK2 con dosi sub-micromolari di BVDU senza che la TK1 influenzi la reazione. L'impiego della BVDU come substrato rende il saggio enzimatico molto più sensibile rispetto ai saggi con substrati naturali o analoghi nucleosidici usati finora, che presentano una specificità decisamente inferiore. Con il nuovo protocollo abbiamo dimostrato che l'attività della TK2 aumenta nelle cellule con il passaggio dalla proliferazione alla quiescenza. Fino a qualche anno fa si riteneva che la TK2 fosse l'unico enzima attivo nelle cellule quiescenti in grado di sintetizzare il dTTP per la replicazione del DNA mitocondriale. L'induzione della TK2 da noi rilevata appariva quindi come un adattamento delle cellule quiescenti all'inattività della TK1 e del complesso R1/R2 della ribonucleotide reduttasi. La scoperta della subunità p53R2 ha tuttavia rivoluzionato la concezione del metabolismo dei dNTP in cellule post-mitotiche. Questa subunità può legarsi con R1 a costituire una

ribonucleotide reductasi attiva anche oltre la fase S in quanto p53R2 è espressa costitutivamente lungo il ciclo cellulare e indotta durante la quiescenza. Quindi, anche nelle cellule quiescenti, il dTTP potrebbe originare dalla collaborazione tra la sintesi *de novo* e di recupero.

In questo contesto abbiamo voluto indagare come viene regolato il pool del dTTP nelle cellule quiescenti, considerando che deficienze della TK2 e di p53R2 causano gravi patologie che interessano tessuti specifici differenziati dove si osserva deplezione del mtDNA. Ci siamo concentrati soprattutto sul ruolo della TK2 per comprendere in quali condizioni la sua attività diviene indispensabile per la sintesi del dTTP e di conseguenza quali fattori portano alla deplezione del mtDNA quando la TK2 è mutata. Nelle cellule proliferanti la TK2 non è indispensabile, infatti il dTMP per la sintesi del mtDNA può essere importato nei mitocondri dal citoplasma dove viene sintetizzato grazie all'attività della TK1 e della RNR. Per comprendere come viene regolato il pool del dTTP nelle cellule non proliferanti presenti nei tessuti differenziati, abbiamo analizzato gli effetti del silenziamento della TK2 in fibroblasti di pelle quiescenti e ridotto l'attività della timidina fosforilasi e la sintesi *de novo* con inibitori chimici. Con esperimenti di flusso isotopico abbiamo dimostrato che nelle cellule quiescenti il dTTP può essere sintetizzato anche *de novo* e che l'attività della TK2 viene regolata dalla disponibilità di timidina e dall'attività della timidina fosforilasi. Nelle cellule quiescenti la concentrazione del dTTP viene quindi modulata da un insieme di enzimi che collaborano in un network enzimatico influenzato dalla disponibilità di timidina nell'ambiente extracellulare (fig. 28).

In tessuti diversi i livelli di espressione di ciascun enzima possono variare come anche la concentrazione di timidina. Nel muscolo scheletrico, principale bersaglio della MDS miopatica, la TK2 è molto meno espressa che nei fibroblasti e la timidina fosforilasi non è rilevabile. Per comprendere la tessuto-specificità delle patologie causate dalla perdita di uno degli enzimi qui considerati, è quindi necessario analizzare l'intero network enzimatico. In base a questa considerazione ci siamo proposti di comprendere perché i fibroblasti di pazienti affetti da MDS miopatica legata a mutazioni della TK2 non manifestano alterazioni del mtDNA.

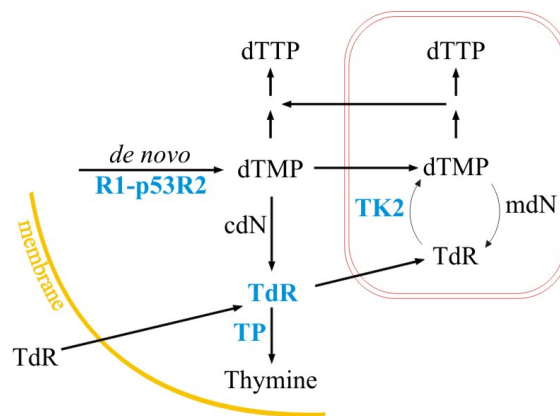


Fig. 28 Il network enzimatico per la regolazione del dTTP in cellule quiescenti

Nel nostro laboratorio sono disponibili dei fibroblasti di pelle provenienti da due pazienti eterozigoti composti per diverse mutazioni della TK2 che presentano forme di MDS miopatica, caratterizzate da insorgenza tardiva e progressione lenta. Questi fenotipi insoliti suggeriscono che il metabolismo del dTTP abbia subito degli adattamenti per compensare la ridotta attività della TK2. Abbiamo quindi confrontato le attività dei diversi enzimi coinvolti nella regolazione del dTTP in fibroblasti di pelle quiescenti normali e dei due pazienti per identificare l'eventuale meccanismo di compensazione. L'attività della TK2 misurata nel saggio *in vitro* è notevolmente ridotta negli estratti proteici dei fibroblasti dei pazienti, mentre il pool del dTTP citosolico e mitocondriale, i livelli di sintesi *de novo* e l'attività degli enzimi degradativi e della stessa TK2 *in situ* non sono alterati rispetto ai controlli. Ciò ci ha fatto concludere che nei fibroblasti selvatici l'espressione della TK2 è largamente superiore alle necessità e soltanto una parte dell'enzima presente è effettivamente attivo ma è comunque sufficiente al mantenimento del dTTP durante la quiescenza. Nei mutanti la bassa attività residua della TK2 sembra soddisfare le necessità della sintesi del dTTP e il fenotipo metabolico resta inalterato così come il livello di mtDNA.

Per regolare la concentrazione del dTTP all'interno della cellula abbiamo visto come siano importanti gli scambi tra citosol e mitocondri. Le proteine responsabili di questi scambi non sono ancora state identificate con sicurezza nei mammiferi. Abbiamo preso in esame l'ipotesi che le due proteine SLC25A33 ed SLC25A36 siano responsabili del trasporto di nucleotidi pirimidinici tra i due

compartimenti. Queste due proteine appartengono infatti alla famiglia dei trasportatori mitocondriali ma il loro substrato non è ancora noto. Floyd et al. (2007) ricostituendo SLC25A33 in liposomi e saggiando il trasporto di numerosi substrati hanno suggerito che SLC25A33 sia il responsabile del trasporto dell'UTP. Considerando che queste due proteine sono molto simili tra loro e sono ortologhe del trasportatore pirimidinico di lievito Rim2p, noi abbiamo indagato la loro funzione *in situ* in cellule umane. Dopo aver silenziato l'espressione di una o di entrambe le proteine abbiamo estratto ed analizzato i diversi pool ribo- e deossinucleotidici. Nel caso queste proteine siano dei trasportatori di nucleotidi in seguito al silenziamento ci aspettavamo di osservare una variazione di concentrazione di uno o più nucleotidi tra i due compartimenti. Nei nostri esperimenti i livelli di mRNA di entrambe le proteine hanno indicato un buon grado di silenziamento ma, in mancanza di anticorpi sufficientemente sensibili, non è stato possibile valutare i livelli di espressione delle proteine endogene. Il confronto delle dimensioni dei pool nucleotidici citoplasmatici e mitocondriali nelle cellule silenziate non ha rivelato differenze rispetto alle cellule di controllo, nemmeno per l'UTP. Questi risultati non consentono finora di affermare che SLC25A33 e SLC25A36 siano dei trasportatori mitocondriali di nucleotidi. Tuttavia le conseguenze osservate in seguito al silenziamento di entrambe le proteine indica che la loro funzione è importante per la crescita cellulare. Infatti, le cellule in cui abbiamo silenziato sia SLC25A33 che SLC25A36 presentano un blocco del ciclo cellulare, smettono di crescere, aumentano di dimensione e di massa mitocondriale. I meccanismi responsabili di questo fenotipo devono ancora essere identificati e necessitano di ulteriori indagini.

6. PROSPETTIVE FUTURE

Nello studio di SLC25A33 e SLC25A36 le analisi quantitative effettuate finora forniscono un'immagine statica dei pool nucleotidici mitocondriali e citosolici. Per ottenere delle informazioni dinamiche sulla distribuzione dei nucleotidi ci proponiamo di effettuare degli esperimenti di flusso isotopico. Questa metodica, applicata negli esperimenti sul ruolo della TK2, consente di valutare la velocità delle reazioni biosintetiche e cataboliche nel metabolismo dei deossiribonucleotidi e gli scambi attraverso la membrana mitocondriale. Essa potrebbe fornire informazioni utili per comprendere se l'efficienza della comunicazione tra mitocondri e citosol cambia in seguito allo spegnimento dei due geni. Allo stesso scopo stiamo inoltre individuando le condizioni sperimentali per isolare i mitocondri dalle cellule dove i due ipotetici trasportatori sono stati silenziati per poter condurre esperimenti di trasporto dei possibili substrati nel sistema naturale dove i trasportatori sono inseriti. Ad oggi stiamo migliorando il protocollo di estrazione e purificazione dei mitocondri dalle cellule HEK 293 normali. Un esperimento preliminare in cui i mitocondri purificati sono stati incubati in presenza di ^3H -dTTP nel mezzo di incubazione hanno fornito risultati incoraggianti in quanto corrispondenti a quelli ottenuti da Ferraro *et al.* (2006) con mitocondri isolati da fegato di topo.

7. RIASSUNTO

Le MDS, sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (mtDNA), sono malattie autosomiche recessive caratterizzate dalla riduzione del numero di copie del mtDNA e sono causate da mutazioni in geni nucleari codificanti proteine coinvolte nel metabolismo dei dNTP o nella replicazione del mtDNA. Alcune MDS hanno una elevata tessuto-specificità e interessano tessuti differenziati dove le cellule non sono in attiva proliferazione. Mutazioni nel gene nucleare della timidina chinasi mitocondriale (TK2) causano la forma miopatica di MDS il cui fenotipo è stato attribuito alla mancanza di dTTP nel muscolo scheletrico. Gli individui affetti da MDS miopatica durante i primi anni di vita sviluppano una grave ipotonia muscolare che conduce alla perdita dell'attività spontanea e nelle forme più gravi alla morte precoce durante l'infanzia. La gravità di questa sindrome dimostra l'importanza di mantenere regolato il pool del dTTP nel mitocondrio. In questo scenario il ruolo della TK2 in cellule proliferanti o quiescenti non è tuttavia ancora chiaro.

La replicazione del mtDNA non è limitata alla sola fase S come quella del DNA nucleare, ma avviene per tutta la durata del ciclo cellulare nelle cellule proliferanti e anche nelle cellule quiescenti e differenziate. Perché la sintesi e la riparazione del DNA si svolgano con precisione le cellule devono disporre di dNTP in quantità adeguate e proporzioni corrette. Nelle cellule eucariotiche esistono due pool di dNTP separati ma comunicanti, uno citoplasmatico ed uno mitocondriale e il loro mantenimento avviene attraverso due vie: la sintesi *de novo* citoplasmatica e le sintesi di recupero citosolica e mitocondriale. Nelle cellule proliferanti il dTTP è sintetizzato sia attraverso la sintesi *de novo* il cui enzima chiave è la ribonucleotide reduttasi (RNR), sia attraverso le vie citosolica e mitocondriale di recupero dei deossiribonucleosidi, dove la timidina viene fosforilata a dTMP rispettivamente dalla timidina chinasi citosolica (TK1) e dalla TK2. Il mantenimento del pool mitocondriale del dTTP è garantito sia dall'importo di fosfati timidinici sintetizzati *de novo* nel citoplasma sia dalla fosforilazione della timidina nell'organello. La TK2 codificata nel genoma nucleare, è espressa costitutivamente e nella matrice mitocondriale media la fosforilazione della

timidina, della deossiuridina e della deossicitidina nelle rispettive forme monofosfato. Nel citoplasma invece, la TK1 è in grado di fosforilare la timidina e la deossiuridina con un'attività cento volte superiore a quella della TK2, ma è attiva solo durante la fase S del ciclo cellulare. Per questo motivo in cellule differenziate l'attività timidina chinasi residua viene attribuita alla sola TK2. Per lungo tempo si è ritenuto che nelle cellule quiescenti l'unica fonte di dTTP per garantire la replicazione del mtDNA fosse la via di recupero mitocondriale. Infatti, oltre alla TK1 anche la RNR è attiva solamente in fase S poiché una delle subunità che la costituiscono (R2) viene rapidamente degradata durante la mitosi. Di recente è stata dimostrata l'esistenza di una subunità R2 indotta da p53 in seguito a danni al DNA e perciò denominata p53R2. E' stato verificato che questa subunità è normalmente presente in cellule proliferanti e che in cellule quiescenti garantisce la sintesi *de novo* dei dNTP anche se ridotta di circa 40 volte rispetto a quella osservata in cellule proliferanti.

Lo scopo di questo lavoro di dottorato è chiarire i meccanismi coinvolti nel metabolismo del pool del dTTP in cellule umane, ponendo particolare attenzione all'attività enzimatica della TK2 in cellule quiescenti, dove la TK1 non è attiva e all'identificazione del trasportatore responsabile dello scambio dei precursori pirimidinici tra citosol e mitocondri.

Per indagare il ruolo della TK2 nella sintesi del dTTP è stata applicata la tecnica dell'RNA interference. Il grado di silenziamento genico è stato valutato mediante real-time PCR, ma per verificare che la diminuzione dell'mRNA corrispondesse alla diminuzione dell'attività enzimatica è emersa la necessità di sviluppare un saggio affidabile per misurare l'attività della TK2. In letteratura sono infatti riportati dei protocolli che prevedono l'uso dei substrati naturali della TK2 per misurarne l'attività enzimatica in estratti proteici cellulari. In queste condizioni tuttavia la presenza della TK1 e della deossicitidina chinasi (dCK) nell'estratto mascherano l'attività della TK2 che è di molto inferiore. Da prima è stato quindi messo a punto un saggio enzimatico che consente di misurare in modo diretto l'attività della TK2 discriminandola da quella degli enzimi citosolici. E' stato impiegato un analogo della timidina, la (E)-5-(2-bromovinil)-2'-deossiuridina (BVDU) marcata isotopicamente che viene fosforilata specificamente dalla TK2. Le condizioni di reazione sono state individuate in cellule OST prive della TK1 e

in cellule HOS TK1⁺, avvalendosi dell'inibitore specifico della TK2 (KIN109) per verificare l'affidabilità dei risultati. Quindi è stata misurata l'attività specifica della TK2 negli estratti proteici di una linea cellulare umana di fibroblasti di polmone (CCD-Lu34) proliferanti e quiescenti. Ciò ha consentito di riscontrare una relazione tra l'attività dell'enzima e il ciclo cellulare infatti, passando dallo stato di proliferazione a quello di quiescenza l'attività della TK2 aumenta di circa tre volte.

Nel nostro laboratorio era stato in precedenza dimostrato che in cellule proliferanti il silenziamento della TK2 non causa variazioni del pool del dTTP rispetto ai controlli. E' stato quindi concluso che la TK2 non è indispensabile in cellule proliferanti dove il dTTP può essere sintetizzato oltre che attraverso la sintesi *de novo* anche attraverso la via di recupero citoplasmatica. Nel corso del mio dottorato ho proseguito lo studio incentrando l'attenzione su cellule quiescenti.

Come modello sperimentale sono state impiegate due linee cellulari di fibroblasti di pelle umani (C63 e C72) indotti alla quiescenza per inibizione da contatto e mantenuti in tale fase diminuendo allo 0.1% il contenuto di siero nel terreno di coltura. E' stata quindi considerata l'influenza di quattro fattori nella regolazione del pool del dTTP in fibroblasti quiescenti: la disponibilità di timidina, l'attività della TK2 e della timidina fosforilasi (TP) e la sintesi *de novo* catalizzata dalla ribonucleotide reductasi contenente la subunità p53R2.

Fornendo ³H-timidina ai fibroblasti in quiescenza è stato osservato che anche piccole quantità (10 nM) di timidina esogena sono sufficienti a far espandere il pool del dTTP mediante l'azione della TK2. Un'espansione del pool si ottiene inibendo con 100 µM 5-bromouracile la TP che contrasta l'attività della TK2 degradando nel citosol la timidina in timina.

Per comprendere quale delle due vie di sintesi, la via *de novo* o quella di recupero, prevalga nei fibroblasti quiescenti, è stata silenziata mediante RNA interference la TK2 e inibita la sintesi *de novo* o la TP con inibitori chimici. In assenza di timidina il silenziamento della TK2 ha determinato un leggero abbassamento delle dimensioni del pool del dTTP ma inferiore a quello ottenuto inibendo la RNR. In presenza di timidina esogena nel terreno di coltura la TK2 ha compensato l'inibizione della sintesi *de novo* mantenendo invariate le dimensioni del pool del dTTP. Ciò non si è verificato nelle cellule in cui la TK2 è stata silenziata.

Abbiamo quindi dimostrato come la sintesi *de novo* e la TK2 collaborino nella sintesi del dTTP in cellule quiescenti e come l'attività di questa chinasi sia modulata sia dalla disponibilità di timidina che dall'attività degli enzimi degradativi. Nel cercare di chiarire la tessuto specificità di patologie quali la MDS miopatica è quindi necessario considerare l'insieme dei meccanismi metabolici coinvolti e i livelli di espressione relativa degli enzimi qui considerati.

Per garantire un corretto apporto di dTTP per la sintesi del mtDNA in cellule non proliferanti c'è collaborazione tra le attività di enzimi citosolici e mitocondriali. Perciò, per il mantenimento dei pool mitocondriali dei dNTP è necessario lo scambio di nucleosidi e nucleotidi tra citoplasma e mitocondri. Nell'ultima parte del mio dottorato ho iniziato un progetto che mira a individuare il trasportatore di membrana responsabile dell'importo del dTMP nel mitocondrio. Infatti, per quanto concerne il trasporto dei nucleotidi pirimidinici le conoscenze sono molto scarse. E' stato dimostrato che esiste un trasportatore del dCTP che tuttavia non è stato ancora individuato e che vi è importo di dTMP all'interno dei mitocondri.

Mediante RNA interference sono stati silenziati due geni (*slc25a33* ed *slc25a36*) ortologhi di Rim2p che in *S. cerevisiae* media il trasporto di nucleotidi pirimidinici attraverso la membrana mitocondriale interna e che mutando causa la deplezione del mtDNA. Le sequenze silenziate codificano per due proteine appartenenti alla super-famiglia dei "mitochondrial carrier" (MCF) e presentano un'elevata similarità che suggerisce una funzione tra loro ridondante. Abbiamo quindi deciso di analizzare da prima gli effetti del silenziamento di *slc25a33* e poi del silenziamento contemporaneo dei due geni sugli scambi di nucleotidi tra mitocondri e citosol. A tal fine sono stati isolati cloni stabili per il silenziamento di *slc25a33*, nei quali il secondo ipotetico trasportatore viene silenziato con trasfezione di siRNA. Le analisi dei pool mitocondriali e citosolici dei deossi- e ribonucleotidi non hanno mostrato variazioni delle dimensioni dei pool analizzati sia nelle cellule singole che doppie silenziate. Il silenziamento non causa inoltre deplezione del mtDNA, tuttavia il blocco della crescita cellulare e l'espansione della massa cellulare nelle cellule dove entrambi i geni sono stati silenziati indicano la presenza di una condizione di stress che necessita di ulteriori indagini.

8. SUMMARY

Mitochondrial DNA depletion syndrome (MDS) is an autosomal recessive group of disorders that have in common a quantitative defect of mtDNA caused by mutation in genes involved in mtDNA replication or dNTP metabolism. Some MDS have a tissue-specific phenotype and affect differentiated tissues where the cells are not dividing. The myopathic form of MDS has been ascribed to mutations in the mitochondrial thymidine kinase (TK2) gene and is attributed to reduction of dTTP in skeletal muscle. Most of the affected persons present with severe muscle weakness, loss of spontaneous activity and fatal outcome during their first year of life. These considerations have highlighted the importance of mitochondrial dTTP pool metabolism and the lack of information on the physiological function of TK2.

MtDNA replication is not limited to the S phase of the cell cycle but takes place also in differentiated cells where nuclear DNA replication has stopped. The cell needs a balanced supply of the four deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP) to replicate and repair its DNA properly. Eukaryotic cells contain two separate pools of dNTPs, a cytosolic-nuclear pool and a mitochondrial pool which are synthesized through two pathways: the cytosolic *de novo* synthesis and the two salvage pathways. In proliferating cultured cells the canonical cytosolic ribonucleotide reductase (RNR) is the prominent synthetic enzyme that by *de novo* synthesis provides most of dTTP. Otherwise dTTP can be synthesized by phosphorylation of thymidine to dTMP via the mitochondrial and the cytosolic salvage pathway catalyzed respectively by TK2 and the cytosolic thymidine kinase (TK1). Mitochondrial dTTP derive from the salvage of thymidine inside the matrix and from import of thymidine phosphates produced in the cytosol. TK2 is a nuclear codified enzyme constitutively expressed, which phosphorylates thymidine, deoxycytidine and deoxyuridine in the mitochondrial matrix. In the cytosol TK1 phosphorylates thymidine and deoxyuridine with an activity about 100 fold higher than TK2, but it is cell-cycle regulated and so it is active only during the S phase. For this reason TK2 is the only thymidine kinase in non cycling cells.

For a long time the constitutively active mitochondrial salvage pathway has been considered the only source of dTTP for the mtDNA replication in resting cells. Indeed, both TK1 and the small subunit of RNR (R2) are degraded at the exit of mitosis. Recently a second stable R2 subunit has been discovered after DNA damage and named p53R2 because its expression is regulated by the tumor suppressor p53 transcription factor. However, p53R2 is present at low level also in undamaged cycling cells and is the only small subunit of RNR present in quiescent fibroblast where it carries out some *de novo* synthesis of deoxynucleotides even if at a 40 times lower level compared to that in cycling cells.

The aim of this work is to clarify the mechanisms involved in dTTP pool metabolism in human cells, focusing on the role of TK2 in quiescent cells. We also investigate the mitochondrial carrier responsible for the exchange of pyrimidine precursors exchange between cytosol and mitochondria.

The approach was that of silencing TK2 expression by RNA interference. The extent of silencing has been evaluated by real-time PCR, but to verify if a lower amount of mRNA corresponds to the decrease of TK2 activity, we needed a method to accurately measure TK2 activity in cell extracts. In the literature some authors measure TK2 activity in cell extracts by phosphorylation of its natural substrates. However, all these protocols suffer from the fact that in cell extracts TK1 and deoxycytidine kinase (dCK) are generally more active than TK2 masking phosphorylation by TK2. So at first we set up the condition for an enzymatic assay to directly measure TK2 activity also in the presence of large excess of TK1 and dCK. We used the radioactive form of the thymidine analog (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) as a specific TK2 substrate. We validated the assay in TK1-deficient OST cells and in HOS TK1⁺ cells, using a specific TK2 inhibitor (KIN109) in order to demonstrate that the procedure allows to specifically measure TK2 activity. Then we applied the same assay in extracts from proliferating and quiescent cultures of human lung fibroblasts (CCD-Lu34). Thus it has been possible to demonstrate that TK2 activity is cell-cycle related. In fact, the level of TK2 increases three times passing from the proliferative to the quiescent state.

In our laboratory, during the investigation on TK2 role in dTTP pool metabolism, it had already been shown that TK2 silencing has no effect on dTTP pool amount in proliferating cells. Thus we concluded that TK2 is dispensable in cycling cells where dTTP can be synthesized through the cytosolic *de novo* and salvage pathways. During my PhD I carried on with this project moving to quiescent cells. As experimental model we chose two lines of non-transformed skin fibroblasts (C63 and C72) contact inhibited and kept quiescent for extended periods of time in the presence of 0.1% of serum.

In quiescent fibroblasts we dissected the functional interaction of four factors: the availability of thymidine, the TK2 and thymidine phosphorylase (TP) activity and the *de novo* synthesis catalyzed by p53R2-containing RNR. Labeling quiescent skin fibroblasts with ³H-thymidine we demonstrated that even 10 nM thymidine suffice to expand the dTTP pool by TK2-mediated salvage. TP balances TK2 action degrading thymidine into thymine in the cytosol. We obtained the dTTP pool expansion also inhibiting TP by 100 μM 5-bromouracil, a specific TP inhibitor. To address the question of which of the two pathways, *de novo* synthesis or salvage, influences the size of the dTTP pool most in quiescent fibroblasts, we inhibited, separately or in combination, TK2 by RNA interference and *de novo* synthesis and TP by chemical inhibitors. When no thymidine was added to the medium, silencing of TK2 caused a smaller decrease of the dTTP pool than inhibition of ribonucleotide reductase. When thymidine was added to the medium, TK2-mediated salvage compensated for the inhibition of *de novo* synthesis maintaining dTTP pool dimension unchanged. This compensation was not visible in TK2 silenced cells.

We have thus demonstrated that *de novo* synthesis and TK2 collaborate in dTTP synthesis in quiescent cells and that TK2 activity is modulated both by the availability of thymidine and by TP activity. To understand the metabolic mechanism underlying the tissue-specific phenotypes caused by genetic loss of enzymes in the network, as in myopathic MDS, it is necessary to consider and investigate the whole network.

To assure a proper amount of dTTP for mtDNA maintenance in non-cycling cells cytosolic and mitochondrial enzymes collaborate. It is thus necessary an exchange of nucleosides and nucleotides between the cytosolic and mitochondrial

compartments. In the last part of my PhD I have started a new project to identify the mitochondrial carrier which mediates dTMP import into the mitochondria. There is a lack of information on pyrimidine nucleotides carriers in mammals. The existence of a mitochondrial carrier for dCTP has been proved but the protein is not yet known. Also the mitochondrial import of dTMP is still not attributed to a specific carrier.

We have silenced by RNA interference two genes (*slc25a33* and *slc25a36*) orthologous of Rim2p that is a mitochondrial pyrimidine transporter in *S. cerevisiae*. Mutation in Rim2p caused mtDNA depletion in yeast. The proteins codified by *slc25a33* and *slc25a36* are members of the mitochondrial carrier super-family (MCF) and the high sequence identity between them suggests a redundant function.

Thus we have analyzed both the effects of single and double silencing of the genes in the exchange of nucleotides between cytosol and mitochondria. We have isolated constitutively *slc25a33* silenced clones where the contemporary *slc25a36* silencing is induced transfecting with siRNA. Both in the single- and double-silenced cells the amounts of the mitochondrial and cytosolic ribo- and deoxyribonucleotides did not change compared to the non-silenced controls. Moreover the silencing of the two genes does not induce mtDNA depletion. But, in the double-silenced cells we noted that the cells stop growing and increase their mitochondrial mass. This behavior indicates the existence of a stressful condition for the cells which requires further investigations.

9. BIBLIOGRAFIA

- Akman HO, Dorado B, López LC, García-Cazorla A, Vilà MR, Tanabe LM, Dauer WT, Bonilla E, Tanji K, Hirano M. *Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance*. Hum Mol Genet. 2008; 17 (16): 2433-40.
- Arco AD, Satrustegui J. *New mitochondrial carriers: an overview*. Cell Mol Life Sci. 2005; 62 (19-20): 2204-27.
- Arnér ES, Spasokoukotskaja T, Eriksson S. *Selective assays for thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase and their activities in extracts from human cells and tissues*. Biochem Biophys Res Commun. 1992; 188 (2): 712-8.
- Arnér ES, Eriksson S. *Mammalian deoxyribonucleoside kinases*. Pharmacol Ther. 1995; 67 (2): 155-86.
- Balzarini J, Zhu C, De Clercq E, Pérez-Pérez MJ, Chamorro C, Camarasa MJ, Karlsson A. *Novel ribofuranosylnucleoside lead compounds for potent and selective inhibitors of mitochondrial thymidine kinase-2*. Biochem J. 2000; 351 (Pt 1): 167-71.
- Bianchi V, Pontis E, Reichard P. *Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis*. J Biol Chem. 1986; 261 (34): 16037-42.
- Bianchi V, Spychala J. *Mammalian 5'-nucleotidases*. J Biol Chem. 2003; 278 (47): 46195-8.
- Bogenhagen D, Clayton DA. *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.
- Bornstein B, Area E, Flanigan KM, Ganesh J, Jayakar P, Swoboda KJ, Coku J, Naini A, Shanske S, Tanji K, Hirano M, DiMauro S. *Mitochondrial DNA depletion syndrome due to mutations in the RRM2B gene*. Neuromuscul Disord. 2008; 18 (6): 453-9.

- 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.
- Bradshaw HD Jr, Deininger PL. *Human thymidine kinase gene: molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA expressible in mammalian cells.* Mol Cell Biol. 1984; 4 (11): 2316-20.
- Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.
- Bridges EG, Jiang Z, Cheng YC. *Characterization of a dCTP transport activity reconstituted from human mitochondria.* J Biol Chem. 1999; 274 (8): 4620-5.
- Byun DS, Chae KS, Ryu BK, Lee MG, Chi SG. *Expression and mutation analyses of P53R2, a newly identified p53 target for DNA repair in human gastric carcinoma.* Int J Cancer. 2002; 98 (5): 718-23.
- Carrozzo R, Bornstein B, Luciola S, Campos Y, de la Pena P, Petit N, Dionisi-Vici C, Vilarinho L, Rizza T, Bertini E, Garesse R, Santorelli FM, Arenas J. *Mutation analysis in 16 patients with mtDNA depletion.* Hum Mutat. 2003; 21 (4): 453-4.
- Chabes A, Thelander L. *Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks.* J Biol Chem. 2000; 275 (23): 17747-53.
- Chen CH, Cheng YC. *The role of cytoplasmic deoxycytidine kinase in the mitochondrial effects of the anti-human immunodeficiency virus compound, 2',3'-dideoxycytidine.* J Biol Chem. 1992; 267 (5): 2856-9.
- Dolce V, Fiermonte G, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE. *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.
- Enríquez JA, Ramos J, Pérez-Martos A, López-Pérez MJ, Montoya J. *Highly efficient DNA synthesis in isolated mitochondria from rat liver.*
Nucleic Acids Res. 1994; 22 (10): 1861-5.
- Eriksson S, Munch-Petersen B, Johansson K, Eklund H. *Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases.*
Cell Mol Life Sci. 2002; 59 (8): 1327-46.
- 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.
- 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.
- Floyd S, Favre C, Lasorsa FM, Leahy M, Trigiant G, Stroebel P, Marx A, Loughran G, O'Callaghan K, Marobbio CM, Slotboom DJ, Kunji ER, 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 MC , Vilà MR, Marti R, Bianchi V. *Unchanged thymidine triphosphate pools and thymidine metabolism in two lines of thymidine kinase 2-mutated fibroblasts.*
FEBS Lett 2009; 276: 1104-13.
- Franzolin E, Rampazzo C, Pérez-Pérez MJ, Hernández AI, Balzarini J, Bianchi V. *Bromovinyl-deoxyuridine: A selective substrate for mitochondrial thymidine kinase in cell extracts.*
Biochem Biophys Res Commun. 2006; 344 (1): 30-6.
- Galbiati S, Bordoni A, Papadimitriou D, Toscano A, Rodolico C, Katsarou E, Sciacco M, Garufi A, Prella A, Aguenouz M, Bonsignore M, Crimi M, Martinuzzi A, Bresolin N, Papadimitriou A, Comi GP. *New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion.*
Pediatr Neurol. 2006; 34 (3): 177-85.

- Gallinaro L, Crovatto K, Rampazzo C, Pontarin G, Ferraro P, Milanesi E, Reichard P, Bianchi V. *Human mitochondrial 5'-deoxyribonucleotidase. Overproduction in cultured cells and functional aspects.* J Biol Chem. 2002; 277 (38): 35080-7.
- Gazziola C, Ferraro P, Moras M, Reichard P, Bianchi V. *Cytosolic high K(m) 5'-nucleotidase and 5'(3')-deoxyribonucleotidase in substrate cycles involved in nucleotide metabolism.* J Biol Chem. 2001; 276 (9): 6185-90.
- Guittet O, Håkansson P, Voevodskaya N, Fridd S, Gräslund A, Arakawa H, Nakamura Y, Thelander L. *Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells.* J Biol Chem. 2001; 276 (44): 40647-51.
- 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.
- 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.
- Höglund L, Pontis E, Reichard P. *Effects of deoxycytidine and thymidine kinase deficiency on substrate cycles between deoxyribonucleosides and their 5'-phosphates.* Cancer Res. 1988; 48 (13): 3681-7.
- Hu CM, Chang ZF. *Mitotic control of dTTP pool: a necessity or coincidence?* J Biomed Sci. 2007; 14 (4): 491-7.
- Itahana K, Dimri GP, Hara E, Itahana Y, Zou Y, Desprez PY, Campisi J. *A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells.* J Biol Chem. 2002; 277 (20): 18206-14.
- Johansson K, Ramaswamy S, Ljungcrantz C, Knecht W, Piskur J, Munch-Petersen B, Eriksson S, Eklund H. *Structural basis for substrate specificities of cellular deoxyribonucleoside kinases.* Nat Struct Biol. 2001; 8 (7): 616-20.

- Johansson M, Karlsson A. *Cloning and expression of human deoxyguanosine kinase cDNA.*
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93 (14): 7258-62.
- Johansson M, Karlsson A. *Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2.*
J Biol Chem. 1997; 272 (13): 8454-8.
- Jordheim LP, Guittet O, Lepoivre M, Galmarini CM, Dumontet C. *Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells.*
Mol Cancer Ther. 2005; 4 (8): 1268-76.
- Kang J, Samuels DC. *The evidence that the DNC (SLC25A19) is not the mitochondrial deoxyribonucleotide carrier.*
Mitochondrion. 2008; 8 (2): 103-8.
- Ke PY, Chang ZF. *Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway.*
Mol Cell Biol. 2004; 24 (2): 514-26.
- Ke PY, Kuo YY, Hu CM, Chang ZF. *Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability.*
Genes Dev. 2005; 19 (16): 1920-33.
- Kimura T, Takeda S, Sagiya Y, Gotoh M, Nakamura Y, Arakawa H. *Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools.*
Nat Genet. 2003; 34 (4): 440-5.
- Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CK, McIntosh EM, Reidy JA. *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability.*
Mutat Res. 1994; 318 (1): 1-64.
- Lai Y, Tse CM, Unadkat JD. *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 YC. *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.
- Lambeth DO, Mehus JG, Ivey MA, Milavetz BI. *Characterization and cloning of a nucleoside-diphosphate kinase targeted to matrix of mitochondria in pigeon.*
J Biol Chem. 1997; 272 (39): 24604-11.
- 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.
- Li CL, Lu CY, Ke PY, Chang ZF. *Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase by substitution of serine-13 with aspartic acid at the mitotic phosphorylation site.*
Biochem Biophys Res Commun. 2004 ; 313 (3): 587-93.
- Lindhurst MJ, Fiermonte G, Song S, Struys E, De Leonardis F, Schwartzberg PL, Chen A, Castegna A, Verhoeven N, Mathews CK, Palmieri F, Biesecker LG. *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.
- Liu X, Zhou B, Xue L, Shih J, Tye K, Qi C, Yen Y. *The ribonucleotide reductase subunit M2B subcellular localization and functional importance for DNA replication in physiological growth of KB cells.*
Biochem Pharmacol. 2005; 70 (9): 1288-97.
- Mancuso M, Filosto M, Bonilla E, Hirano M, Shanske S, Vu TH, DiMauro S. *Mitochondrial myopathy of childhood associated with mitochondrial DNA depletion and a homozygous mutation (T77M) in the TK2 gene.*
Arch Neurol. 2003; 60 (7): 1007-9.
- 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 CM, Di Noia MA, 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.
- Martí R, Spinazzola A, Tadesse S, Nishino I, Nishigaki Y, Hirano M. *Definitive diagnosis of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by biochemical assays.* Clin Chem. 2004; 50 (1): 120-4.
- Milon L, Rousseau-Merck MF, Munier A, Erent M, Lascu I, Capeau J, Lacombe ML. *nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13.* Hum Genet. 1997; 99 (4): 550-7.
- Milon L, Meyer P, Chiadmi M, Munier A, Johansson M, Karlsson A, Lascu I, Capeau J, Janin J, Lacombe ML. *The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase.* J Biol Chem. 2000; 275 (19): 14264-72.
- Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S. *mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases.* Am J Hum Genet. 1991; 48 (3): 492-501.
- Mrass P, Rendl M, Mildner M, Gruber F, Lengauer B, Ballaun C, Eckhart L, Tschachler E. *Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids.* Cancer Res. 2004; 64 (18): 6542-8.
- Munch-Petersen B, Cloos L, Tyrsted G, Eriksson S. *Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides.* J Biol Chem. 1991; 266 (14): 9032-8.
- Munch-Petersen B, Tyrsted G, Cloos L. *Reversible ATP-dependent transition between two forms of human cytosolic thymidine kinase with different enzymatic properties.* J Biol Chem. 1993; 268 (21): 15621-5.
- Nakano K, Bálint E, Ashcroft M, Vousden KH. *A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73.* Oncogene. 2000; 19 (37): 4283-9.

- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. *Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder*. Science. 1999; 283 (5402): 689-92.
- Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, Erazo R, Gurgel-Giannetti J, Krishna S, Bonilla E, De Vivo DC, Shanske S, DiMauro S. *Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene*. Arch Neurol. 2006; 63 (8): 1122-6.
- Palmieri F. *Mitochondrial carrier proteins*. FEBS Lett. 1994; 346 (1): 48-54.
- Pérez-Pérez MJ, Priego EM, Hernández AI, Familiar O, Camarasa MJ, Negri A, Gago F, Balzarini J. *Structure, physiological role, and specific inhibitors of human thymidine kinase 2 (TK2): present and future*. Med Res Rev. 2008; 28 (5): 797-820.
- Pfaffl MW. *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.
- Pontarin G, Ferraro P, Håkansson P, Thelander L, Reichard P, Bianchi V. *p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage*. J Biol Chem. 2007; 282 (23): 16820-8.
- Pontarin G, Fijolek A, Pizzo P, Ferraro P, Rampazzo C, Pozzan T, Thelander L, Reichard PA, Bianchi V. *Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105 (46): 17801-6.
- Rampazzo C, Gallinaro L, Milanesi E, Frigimelica E, Reichard P, Bianchi V. *A deoxyribonucleotidase in mitochondria: involvement in regulation of dNTP pools and possible link to genetic disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97 (15): 8239-44.
- Rampazzo C, Ferraro P, Pontarin G, Fabris S, Reichard P, Bianchi V. *Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation*. J Biol Chem. 2004; 279 (17): 17019-26.

- 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.
- Reichard P. *Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis.* Annu Rev Biochem. 1988; 57: 349-74.
- Rosenberg MJ, Agarwala R, Bouffard G, Davis J, Fiermonte G, Hilliard MS, Koch T, Kalikin LM, Makalowska I, Morton DH, Petty EM, Weber JL, Palmieri F, Kelley RI, Schäffer AA, Biesecker LG. *Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly.* Nat Genet. 2002; 32 (1): 175-9.
- Rylova SN, Albertioni F, Flygh G, Eriksson S. *Activity profiles of deoxynucleoside kinases and 5'-nucleotidases in cultured adipocytes and myoblastic cells: insights into mitochondrial toxicity of nucleoside analogs.* Biochem Pharmacol. 2005; 69 (6): 951-60.
- 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.
- Saada A, Shaag A, Elpeleg O. *mtDNA depletion myopathy: elucidation of the tissue specificity in the mitochondrial thymidine kinase (TK2) deficiency.* Mol Genet Metab. 2003; 79 (1): 1-5.
- Sabini E, Ort S, Monnerjahn C, Konrad M, Lavie A. *Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy.* Nat Struct Biol. 2003; 10 (7): 513-9.
- Salviati L, Sacconi S, Mancuso M, Otaegui D, Camaño P, Marina A, Rabinowitz S, Shiffman R, Thompson K, Wilson CM, Feigenbaum A, Naini AB, Hirano M, Bonilla E, DiMauro S, Vu TH. *Mitochondrial DNA depletion and dGK gene mutations.* Ann Neurol. 2002; 52 (3): 311-7.
- Sandrini MP, Piskur J. *Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction.* Trends Biochem Sci. 2005; 30 (5): 225-8.
- Sherley JL, Kelly TJ. *Human cytosolic thymidine kinase. Purification and*

physical characterization of the enzyme from HeLa cells.
J Biol Chem. 1988; 263 (1): 375-82.

- Sherman PA, Fyfe JA. *Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers.*
Anal Biochem. 1989; 180 (2): 222-6.
- Spinazzola A, Invernizzi F, Carrara F, Lamantea E, Donati A, Dirocco M, Giordano I, Meznaric-Petrusa M, Baruffini E, Ferrero I, Zeviani M. *Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes.*
J Inherit Metab Dis. 2008. Epub ahead of print
- Spyrou G, Reichard P. *Dynamics of the thymidine triphosphate pool during the cell cycle of synchronized 3T3 mouse fibroblasts.*
Mutat Res. 1988; 200 (1-2): 37-43.
- Taanman JW, Kateeb I, Muntau AC, Jaksch M, Cohen N, Mandel H. *A novel mutation in the deoxyguanosine kinase gene causing depletion of mitochondrial DNA.*
Ann Neurol. 2002; 52 (2): 237-9.
- 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.
- Van Dyck E, Jank B, Ragnini A, Schweyen RJ, 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.
- 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.
- Vilà MR, Segovia-Silvestre T, Gámez J, Marina A, Naini AB, Meseguer A, Lombès A, Bonilla E, DiMauro S, Hirano M, Andreu AL. *Reversion of mtDNA depletion in a patient with TK2 deficiency.*
Neurology. 2003; 60 (7): 1203-5.

- Vozza A, Blanco E, Palmieri L, Palmieri F. *Identification of the mitochondrial GTP/GDP transporter in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem. 2004; 279 (20): 20850-7.
- Wang L, Munch-Petersen B, Herrström Sjöberg A, Hellman U, Bergman T, Jörnvall H, Eriksson S. *Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates.* FEBS Lett. 1999; 443 (2): 170-4.
- Wang L, Saada A, Eriksson S. *Kinetic properties of mutant human thymidine kinase 2 suggest a mechanism for mitochondrial DNA depletion myopathy.* J Biol Chem. 2003; 278 (9): 6963-8.
- 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.
- Wang L, Limongelli A, Vila MR, Carrara F, Zeviani M, Eriksson S. *Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes.* Mol Genet Metab. 2005; 84 (1): 75-82.
- Wang L, Eriksson S. *Cloning and characterization of full-length mouse thymidine kinase 2: the N-terminal sequence directs import of the precursor protein into mitochondria.* Biochem J. 2000; 351 (Pt 2): 469-76.
- Welin M, Kosinska U, Mikkelsen NE, Carnrot C, Zhu C, Wang L, Eriksson S, Munch-Petersen B, Eklund H. *Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101 (52): 17970-5.
- Wintersberger E, Rotheneder H, Grabner M, Beck G, Seiser C. *Regulation of thymidine kinase during growth, cell cycle and differentiation.* Adv Enzyme Regul. 1992; 32: 241-54.
- Xu Y, Johansson M, Karlsson A. *Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria.* J Biol Chem. 2008; 283 (3): 1563-71.
- Yamaguchi T, Matsuda K, Sagiya Y, Iwadate M, Fujino MA, Nakamura Y, Arakawa H. *p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-*

regulated cell cycle checkpoint.
Cancer Res. 2001; 61 (22): 8256-62.

- Zhou X, Solaroli N, Bjerke M, Stewart JB, Rozell B, Johansson M, Karlsson A. *Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2-deficient mice.*
Hum Mol Genet. 2008; 17 (15): 2329-35.