



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO DI BIOLOGIA CELLULARE
XXIII CICLO

**BASI METABOLICHE PER LA TESSUTO-SPECIFICITA'
DELLE SINDROMI MIOPATICHE DA DEPLEZIONE DEL DNA
MITOCONDRIALE**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Cesare Montecucco

Supervisore :Ch.ma Prof. Vera Bianchi

Dottoranda : Miriam Frangini

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Biosintesi dei precursori del DNA	1
1.1.1 <i>Cenni sulle deossiribonucleoside chinasi</i>	3
1.2 Regolazione della sintesi <i>de novo</i>	4
1.2.1 <i>P53R2</i>	6
1.3 Regolazione della via di recupero	8
1.3.1 <i>Studio dei substrate cycle</i>	11
1.4 Metabolismo del dTTP	12
1.4.1 <i>Timidina chinasi 1 e 2</i>	13
1.5 Origine dei precursori mitocondriali e interazioni dinamiche tra pool citosolici e mitocondriali	17
1.6 Replicazione del DNA mitocondriale	22
1.6.1 <i>Turnover del mtDNA</i>	25
1.6.2 <i>Regolazione del numero di copie di mtDNA</i>	26
1.7 Sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (MDS)	28
1.7.1 <i>MDS miopatiche: confronto tra pazienti mutanti per TK2 o p53R2 e i rispettivi modelli animali</i>	31
1.8 Miogenesi del muscolo scheletrico	35
1.8.1 <i>Biogenesi e attività mitocondriale in relazione con il differenziamento miogenico</i>	37
2. SCOPO DELLA TESI	41

3. MATERIALI E METODI	43
3.1 Linee cellulari e condizioni di crescita	43
3.1.1 <i>Cellule quiescenti e differenziate</i>	44
3.1.2 <i>Purificazione della frazione di miotubi da una coltura differenziata di cellule C2C12</i>	44
3.2 Silenziamento genico mediante RNA interference con siRNA	45
3.3 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e real-time PCR relativa	46
3.4 Estrazione del DNA genomico e quantificazione del mtDNA mediante real-time quantitativa (TaqMan)	49
3.5 Estratti cellulari per saggi enzimatici	50
3.6 Saggi enzimatici	51
3.6.1 <i>Saggio dell'attività timidina chinasi</i>	51
3.6.2 <i>Saggio della timidina fosforilasi e delle nucleotidasi</i>	52
3.7 Western blot	53
3.8 Marcatura isotopica delle cellule	54
3.9 Estrazione dei pool dei nucleotidi	55
3.10 Determinazione delle dimensioni dei pool dei dNTP e della radioattività specifica del dTTP	56
3.11 Analisi microarray	57
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	59
4.1 Metabolismo della timidina in due linee di fibroblasti mutanti per la timidina chinasi mitocondriale	59
4.1.1 <i>Attività della TK2 in estratti proteici dei fibroblasti mutanti</i>	60

4.1.2	<i>Determinazione dei pool dei dNTP nei fibroblasti mutanti</i>	61
4.1.3	<i>Valutazione del contributo della sintesi de novo nei fibroblasti mutanti</i>	62
4.1.4	<i>Il catabolismo del dTTP nei fibroblasti dei pazienti</i>	64
4.1.5	<i>Metabolismo della timidina nei fibroblasti mutanti</i>	65
4.2	Modello cellulare di muscolo scheletrico: mioblasti differenziati in coltura	71
4.2.1	<i>Ottimizzazione delle condizioni di differenziamento di cellule C2C12</i>	72
4.2.2	<i>Caratterizzazione del metabolismo dei dNTP nelle cellule C2C12</i>	77
4.2.3	<i>Valutazione dei pool cellulari totali dei dNTP in cellule C2C12</i> .	80
4.2.4	<i>Confronto del modello cellulare con il muscolo scheletrico</i>	82
4.3	Silenziamento della TK2 e di p53R2 durante il differenziamento di cellule C2C12	84
4.3.1	<i>Effetti del silenziamento sul metabolismo dei dNTP</i>	88
5.	CONCLUSIONI	93
6.	RIASSUNTO	99
7.	SUMMARY	105
8.	BIBLIOGRAFIA	111
9.	PUBBLICAZIONI E CONGRESSI INERENTI L'ATTIVITA' DI RICERCA SVOLTA	133

ABBREVIAZIONI

(d)NMP, (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)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

cDNA: DNA complementare
mRNA: RNA messaggero
mtDNA: DNA mitocondriale
nDNA: DNA nucleare
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA

ENZIMI

cdN: 5'(3')deossiribonucleotidasi citosolica
dCK: deossicitidina chinasi
Dctd: dCMP deaminasi
dGK: deossiguanosina chinasi
GAPDH: gliceraldeide 6-fosfato deidrogenasi
hENT1: human equilibrative nucleoside transporter 1
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 E SOLUZIONI

BCA: acido bicinchinonico
BSA: albumina di siero bovino
5-BU: 5-Bromouracile
BVDU: (E)-5-(2-Bromovinil)-deossiuridina
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT: di-tiotreitolo
EDTA: acido etilendiamminotetracetico
FBS: Fetal Bovine Serum
Hepes: acido N-2-idrossietilpiperazide-N-2-etansulfonico

HU: idrossiurea
MOPS: acido 3-[N-morfolino]propanosulfonico
PBS: phosphate-buffered saline
TE: tampone Tris EDTA
Tris: 2-amino-2-idrossimetipropano-1,3-diolo
Versene: PBS+EDTA

ALTRE ABBREVIAZIONI

A.S.: attività specifica
Ct: fluorescent treshold value
COX1: citocromo ossidasi 1
Cpm: conte per minuto
FRET: fluorescence resonance energy transfer
GFP: green fluorescent protein
HRP: horseradish-peroxidase
Kb: kilo basi
MDS: sindromi dadeplezione del mtDNA
MNGIE: mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopaty
MRF: fattori di regolazione miogenica
p: significatività esatta
bp: paia di basi
PCR: polymerase chain reaction
RT-PCR: real-time PCR

1. INTRODUZIONE

1.1 Biosintesi dei precursori del DNA

I processi di replicazione e di riparazione del DNA richiedono un apporto bilanciato dei quattro precursori canonici del DNA, i deossiribonucleosidi trifosfato (dNTPs). Sbilanciamenti quantitativi tra i precursori nucleotidici comportano ridotta fedeltà nella replicazione del DNA in saggi condotti *in vitro* e sono stati correlati a mutazioni, aberrazioni cromosomiche e mutagenesi *in vivo* (Haynes and Kunz, 1986; Kunz and Kohalmi, 1991; Kunz *et al.*, 1994).

Nelle cellule di mammifero esistono due *pool* separati di dNTP: un *pool* citosolico utilizzato per la sintesi del DNA nucleare (nDNA) e un *pool* mitocondriale per la sintesi del DNA mitocondriale (mtDNA). I *pool* dei due compartimenti comunicano attraverso trasportatori specifici localizzati nella membrana mitocondriale interna, altrimenti impermeabile ai nucleotidi. Le cellule replicano il DNA nucleare in un periodo definito del ciclo cellulare, la fase S, che nelle cellule di mammifero generalmente ha una durata inferiore al 50% dell'intero ciclo. Questa fase è caratterizzata da un elevato *turnover* di dNTP e dalla massima espansione delle dimensioni dei quattro *pool* nucleotidici (da 20 a 30 volte). Al di fuori della fase S, le cellule necessitano comunque di precursori nucleotidici per sostenere la riparazione del DNA nucleare e la replicazione del mtDNA che avviene in modo costante lungo il ciclo cellulare (Bogenhagen and Clayton, 1976), indipendentemente dalla sintesi del nDNA. Rispetto alle esigenze della replicazione in fase S, la quantità assoluta di precursori richiesta per la replicazione del mtDNA è notevolmente inferiore, dato che il mtDNA rappresenta solo una piccola frazione del DNA totale (1-5%).

La formazione dei precursori del DNA avviene seguendo due vie biosintetiche (Reichard, 1988): la sintesi *de novo* e la via di recupero. La prima via ha localizzazione citosolica e in cellule proliferanti è predominante nel rifornire i precursori per la sintesi del nDNA e del mtDNA. Essa consiste in un percorso enzimatico a diversi stadi che a

partire da piccole molecole porta alla formazione di inosina monofosfato (IMP) e uridina monofosfato (UMP), dai quali derivano rispettivamente tutti i ribonucleosidi 5'-difosfato (NDP) purinici e pirimidinici. L'enzima ribonucleotide reduttasi (RNR) catalizza la reazione principale della sintesi *de novo* dei deossiribonucleotidi: la riduzione dei ribonucleosidi 5'-difosfato a 2'-deossinucleotidi (dNDP). Questi ultimi verranno poi fosforilati a trifosfati da chinasi ad ampia specificità. Un'eccezione nella via *de novo* è rappresentata dalla sintesi del dTTP che segue un percorso più tortuoso a partire dalla riduzione di CDP e UDP e che coinvolge altri enzimi tra cui il dCMP deaminasi, che converte il dCMP in dUMP e la timidilato sintasi, che converte il dUMP in dTMP (Figura 1).

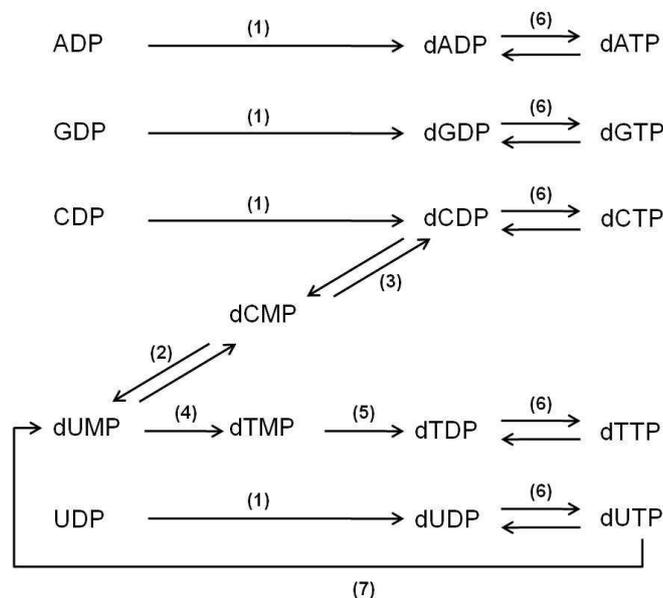


Figura 1. Sintesi *de novo* dei dNTP. (1) ribonucleotide reduttasi (RNR), (2) dCMP deaminasi, (3) CMP-UMP chinasi, (4) timidilato sintasi (TS), (5) timidilato chinasi (TMPK), (6) nucleoside difosfato chinasi (NDPK), (7) deossiridina trifosfatasi (dUTPasi).

Nella seconda via biosintetica, la via di recupero, deossinucleosidi (dN) derivati dalla degradazione del DNA o dai nutrienti introdotti con la dieta, sono trasformati in dNTP attraverso una serie di tre fosforilazioni consecutive. I nucleosidi entrano nella cellula per diffusione facilitata attraverso specifiche permeasi e, una volta entrati, subiscono una fosforilazione in 5' ad opera di una deossiribonucleoside chinasi che li converte irreversibilmente in nucleosidi monofosfato, impedendo così il loro efflusso attraverso la membrana plasmatica. Le fosforilazioni

successive a nucleosidi difosfato e trifosfato sono tutte reversibili e catalizzate rispettivamente da nucleoside monofosfato chinasi (NMPK) e nucleoside difosfato chinasi (NDPK). Nelle cellule di mammifero si conoscono quattro deossiribonucleoside chinasi: due a localizzazione citosolica, timidina chinasi 1 (TK1) e deossicitidina chinasi (dCK), e due a localizzazione mitocondriale, deossiguanosina chinasi (dGK) e timidina chinasi 2 (TK2). Esse si distinguono per la diversa specificità di substrato e garantiscono la fosforilazione di tutti i quattro precursori nucleosidici nel compartimento citosolico e in quello mitocondriale. TK1 fosforila deossiuridina e timidina, mentre dCK ha come substrati deossicitidina, deossiadenosina e deossiguanosina; TK2 si differenzia dalla TK1 perché oltre a deossiuridina e timidina fosforila anche deossicitidina; infine, dGK fosforila deossiadenosina e deossiguanosina.

1.1.1 Cenni sulle deossiribonucleoside chinasi

La letteratura è ricca di studi svolti sulle deossiribonucleoside chinasi: di ognuna di esse è stata ottenuta la purificazione, è nota la sequenza di cDNA codificante, la localizzazione cromosomica e l'organizzazione del rispettivo *locus* genico, le proprietà enzimatiche e cinetiche, la localizzazione subcellulare, la distribuzione tissutale e la regolazione lungo il ciclo cellulare. Il confronto delle loro sequenze ha permesso di individuare un'identità di sequenza aminoacidica del 40% tra dCK, dGK e TK2, in base alla quale sono state raggruppate come appartenenti ad un'unica famiglia enzimatica, a cui appartengono anche la timidina chinasi dell'Herpes virus e altre chinasi batteriche (Johansson and Karlsson, 1997; Eriksson *et al.*, 2002). La sequenza della timidina chinasi citosolica TK1 si discosta, invece, dalle altre deossiribonucleoside chinasi mostrando similarità solo all'interno di una regione N-terminale (*P-loop*), che media il legame con il donatore del gruppo fosfato; è stata perciò attribuita ad una famiglia enzimatica differente. Lo stesso rapporto di similarità tra le quattro deossiribonucleoside chinasi è mantenuto a livello di organizzazione spaziale (Sandrini and Piškur, 2005). Le strutture di dCK, dGK e TK2 presentano ciascun monomero costituito da 8 a 10 α -

eliche circondate da 5 foglietti β paralleli; mentre la struttura della TK1 presenta un dominio α/β che comprende il *P-loop* e un dominio contenente zinco. Il sito catalitico è collocato all'interfaccia tra questi due domini; nelle altre deossiribonucleoside chinasi, invece, il sito catalitico è formato da due paia di eliche ricoperte da una terza elica e la specificità di substrato è data da residui posti all'interno di queste. La dCK è un enzima ad espressione costitutiva a sede citoplasmatica, principalmente nell'area perinucleare e in prossimità della membrana cellulare (Hatzis *et al.*, 1998). La dCK è un dimero e presenta due siti che legano con affinità diversa sia substrati purinici che pirimidinici. L'attività enzimatica è inibita dal dCTP, mentre tutti i substrati agiscono da inibitori competitivi e, tra essi, la deossicitidina agisce con più efficienza nell'inibizione della fosforilazione degli altri substrati. La dGK catalizza la fosforilazione di deossiguanosina, deossiadenosina e deossiinosina. È un enzima a localizzazione mitocondriale a struttura dimerica con specificità di substrato simile a quella osservata per la dCK, ad eccezione dei deossiribonucleosidi pirimidinici, che in questo caso non vengono fosforilati. TK1 e TK2 verranno descritte più dettagliatamente nel paragrafo 1.4.1.

1.2 Regolazione della sintesi *de novo*

Enzima chiave nella regolazione della sintesi *de novo* è la RNR, la cui attività è il risultato di una fine modulazione che coinvolge processi di regolazione genica, inibizione enzimatica, degradazione proteica e regolazione allosterica e che garantisce una corretta produzione dei dNTP evitando sbilanciamenti quantitativi tra gli stessi (Nordlund and Reichard, 2006). Nei mammiferi la RNR è costituita dalla combinazione di due proteine diverse: R1(α), un dimero di 90 KDa e R2 (β), un dimero di 45 KDa. La subunità R1 contiene il sito catalitico di legame per i ribonucleosidi difosfato, che comprende diversi gruppi tiolici reattivi ed è situato all'interfaccia tra R1 ed R2, e due siti indipendenti per effettori allosterici, che regolano l'attività dell'enzima inducendo modificazioni conformazionali. Questi sono: il sito di attività, che controlla l'attività catalitica e può legare ATP o dATP, la presenza di ATP attiva l'enzima

mentre quella di dATP provoca l'inibizione dell'enzima verso tutti i substrati; il sito di specificità, che può legare i nucleotidi effettori ATP, dATP, dTTP o dGTP determinando quali ribonucleotidi saranno ridotti nel sito catalitico (Tabella 1). La subunità R2 contiene un radicale libero tirosilico, stabilizzato da un ponte tra due Fe^{3+} e un atomo di ossigeno, che partecipa alla riduzione radicalica del substrato. Nei mammiferi, in assenza di effettori nucleotidici la proteina R1 si trova in forma monomerica. Effettori allosterici che si legano solamente al sito di specificità (dTTP o dGTP) inducono la formazione di un complesso enzimaticamente attivo $\alpha_2\beta_2$ stimolando la dimerizzazione di R1 e l'interazione R1-R2 (Ingemarson and Thelander, 1996). Tutti i nucleotidi effettori stimolano fortemente il legame del dimero R1 alla subunità R2. In presenza di ATP o dATP entrambi i siti allosterici di R1 risultano occupati e la proteina forma degli esameri. Questi esameri possono interagire con il dimero R2 e formare dei complessi $\alpha_6\beta_2$. Questi ultimi possono essere in forma iperattiva in presenza di ATP, oppure in forma inattiva in presenza di dATP (Rofougaran *et al.*, 2006).

L'attività della RNR è regolata con il ciclo cellulare e raggiunge un picco in fase S, quando il fabbisogno di precursori aumenta per sostenere la replicazione del DNA nucleare. Il fattore limitante per l'attività enzimatica è rappresentato dalla subunità R2, che è espressa in fase S e ha un'emivita di sole 3 ore (Chabes and Thelander, 2000), mentre R1 si mantiene pressoché costante per tutto il ciclo cellulare, con un tempo di vita medio di 20 ore. L'espressione di R1 è controllata da fattori di trascrizione che attivano il promotore in fase S (Johansson *et al.*, 1998), mentre l'espressione di R2 è regolata da una repressione trascrizionale che viene rimossa all'inizio della fase S (Chabes *et al.*, 2004). Questi meccanismi di regolazione risultano in un andamento simile dell'espressione delle due subunità con un picco di mRNA rilevabile in fase S e livelli minimi di trascritti in fase G_0 - G_1 . Tuttavia, mentre i livelli di proteina R1 sono in eccesso durante tutto il ciclo cellulare in cellule proliferanti, i livelli di R2 sono impercettibili in G_1 per poi aumentare in fase S. È la regolazione della stabilità delle proteina R2 a fare la differenza: durante la fase S essa è stabile ed è accumulata, per essere poi degradata una volta superata la mitosi. In anafase, infatti, il complesso APC (*Anaphase-Promoting*

Complex) induce la proteolisi di R2 mediante ubiquitinazione riconoscendo la sequenza KEN posta all'estremità N-terminale della proteina (Chabes *et al.*, 2003). Cellule post-mitotiche sono quindi prive di una subunità R2 e perciò di un'attività enzimatica della RNR nella forma R1/R2. Di conseguenza, per molto tempo si è pensato che la sintesi di recupero dei dNTP fosse l'unica fonte di precursori per la sintesi del mtDNA e la riparazione del nDNA in cellule non in divisione. La recente scoperta di una seconda subunità minore della RNR, denominata p53R2, ha messo inaspettatamente in discussione questa teoria.

Sito di attività	Effettore legato	
	Sito di specificità	Difosfato ridotto
ATP	ATP, dATP	CDP, UDP
ATP	dTTP	GDP
ATP	dGTP	ADP
dATP	ATP, dATP, dTTP, dGTP	Inibizione

Tabella 1. Regolazione allosterica della ribonucleotide reductasi.

1.2.1 P53R2

Risale al 2000 la scoperta, tra i target trascrizionali di p53 in cellule di mammifero con danni al DNA, di una proteina analoga a R2 denominata p53R2 (Tanaka *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2000). I geni per p53R2 (*RRM2B*) e R2 (*RRM2*) sono localizzati su cromosomi distinti, rispettivamente cromosoma 8 e cromosoma 2. A livello proteico R2 e p53R2 sono equamente attive nel generare il radicale libero tirosilico necessario ad R1 per la catalisi. Sia in topo che in uomo p53R2 presenta un'identità aminoacidica dell'80-90% con R2 ma manca dei primi 33 residui della regione N-terminale, comprendente la sequenza KEN segnale per la degradazione in tarda mitosi. Perciò, al contrario di R2, p53R2 è una proteina stabile che persiste lungo l'intero ciclo cellulare e che è presente anche in cellule post-mitotiche.

In vitro, p53R2 e R1 costituiscono una RNR attiva con un'attività simile a quella di R1/R2: in presenza di un eccesso di R1 l'attività enzimatica di

p53R2 di topo è un 40% di quella di R2, mentre l'attività della p53R2 umana ha un'attività pari al 60% rispetto a R2 (Guittet *et al.*, 2001). Inizialmente si riteneva che p53R2 avesse un ruolo nella riparazione del DNA come elemento della risposta cellulare ai danni genotossici ed è stata più volte postulata la sua traslocazione nel nucleo per produrre i dNTP per la riparazione del DNA direttamente *in loco* (Tanaka *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2001). Diverse sono le considerazioni che negli anni successivi hanno spinto i ricercatori a formulare nuove ipotesi sulla funzione di p53R2, prima tra tutte l'osservazione che mentre generalmente la riparazione del DNA si completa entro poche ore dall'induzione del danno, la massima induzione di p53R2 non avviene prima di 24 ore. Inoltre, p53R2 è espressa a livelli molto bassi (30 volte in meno rispetto a R2 in fase S) anche in assenza di danni al DNA in cellule ciclianti ed è l'unica subunità minore della RNR presente in cellule quiescenti (Håkansson *et al.*, 2006; Pontarin *et al.*, 2007). In fibroblasti quiescenti la quantità di p53R2 aumenta di 2 volte rispetto al contenuto delle cellule proliferanti conferendo un'attività ribonucleotide reduttasica del 2-3% rispetto a quella di R1/R2 in cellule ciclianti (Pontarin *et al.*, 2007).

Ancora in discussione è la questione sulla localizzazione di p53R2. Negli anni più volte è stato proposto un movimento della RNR tra il compartimento citoplasmatico e quello nucleare. Secondo questo modello la RNR forma un grande complesso proteico assieme alla DNA polimerasi e ad altri enzimi della sintesi dei dNTP in corrispondenza dei siti di replicazione del DNA (Prem veer Reddy and Pardee, 1980; Xue *et al.*, 2003). Anche in lievito è stato proposto un meccanismo di regolazione tramite traslocazione, ma in questo caso la subunità minore della RNR trasloca dal nucleo al citoplasma per formare il complesso attivo con la subunità maggiore in fase S (Yao *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). E' stata proposta l'esistenza di un segnale di localizzazione nucleare nella sequenza aminoacidica di p53R2 (Tanaka *et al.*, 2000), tuttavia questa sequenza non soddisfa tutti i requisiti di un classico segnale nucleare (Fontes *et al.*, 2003). Diversi esperimenti hanno invece dimostrato la localizzazione di R1 e R2 nel citoplasma (Engström *et al.*, 1984; Engström and Rozell, 1988) e successivamente, in una pubblicazione recente è

stata riportata la co-localizzazione, sempre nel citoplasma di R1, R2 e p53R2. Secondo quest'ultimo lavoro, non risulta nessuna traslocazione nel nucleo delle tre subunità, nemmeno in seguito a danni al DNA (Pontarin *et al.*, 2008).

Progressivamente è avanzata l'ipotesi che p53R2 abbia un ruolo nel rifornire i dNTP necessari per la sintesi del mtDNA in cellule post-mitotiche. La conferma che p53R2 svolge principalmente questa funzione deriva dalle gravi conseguenze della sua mutazione riscontrate in topo (Kimura *et al.*, 2003) e in uomo (Bourdon *et al.*, 2007; Bornstein *et al.*, 2008), correlate a deplezione del mtDNA e dovute a sbilanciamenti dei *pool* di dNTP (paragrafo 1.7.1).

In conclusione, si può affermare l'esistenza di una via *de novo* anche al di fuori della fase S mediata da R1/p53R2 che supporta la replicazione del mtDNA e la riparazione del DNA in cellule post-mitotiche.

1.3 Regolazione della via di recupero

Un altro punto chiave nella regolazione dei dNTP è rappresentato dalla fosforilazione irreversibile catalizzata dalle deossiribonucleoside chinasi nella via di recupero citoplasmatica e mitocondriale. Questi enzimi, oltre ad essere regolati a *feedback* negativo dai trifosfati dei loro rispettivi substrati nucleosidici, formano dei *substrate cycle* regolativi insieme alle 5'-nucleotidasi (Figura 2), enzimi che catalizzano la defosforilazione dei deossinucleosidi monofosfato prodotti dalle deossinucleoside chinasi, liberando deossinucleosidi e P_i . Questi cicli sono anche definiti "futili" poiché il risultato netto è consumo di energia: idrolisi di ATP in ADP e P_i . In realtà essi svolgono un'importante funzione regolatrice in quanto, essendo modulati dalle concentrazioni dei substrati, tamponano eventuali variazioni di concentrazione aumentando, così, la sensibilità metabolica (Newsholme *et al.*, 1984)

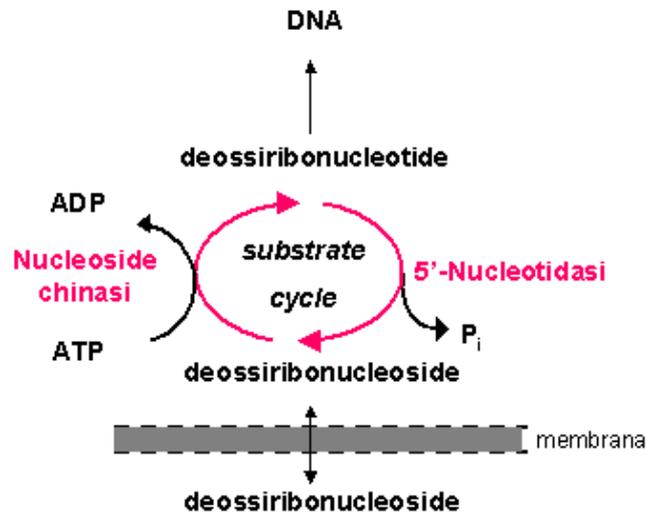


Figura 2. Rappresentazione schematica di un *substrate cycle* tra deossiribonucleosidi e deossiribonucleotidi. A seconda della localizzazione citoplasmatica o mitocondriale del ciclo, la membrana sarà rispettivamente quella cellulare o quella mitocondriale interna.

L'attività relativa di chinasi e nucleotidasi stabilisce se il ciclo ha, in un determinato momento, funzione anabolica o catabolica. Il ruolo regolativo si basa sulla permeabilità selettiva della membrana plasmatica che consente la diffusione ai nucleosidi ma non ai nucleotidi, che rimangono perciò sequestrati all'interno della membrana. In questo modo, i *substrate cycle* gestiscono gli scambi di deossinucleosidi tra ambiente esterno e interno regolando, di conseguenza, il livello intracellulare dei dNTP, dato che i monofosfati sono in equilibrio con i di- e trifosfati presenti nel *pool* (Gazziola *et al.*, 2001). Quando il catabolismo prevale sull'anabolismo, i deossiribonucleosidi si accumulano e vengono escreti dalla cellula, viceversa nella situazione opposta, vengono importati e metabolizzati a dNTP. La direzione del ciclo è dettata dalle condizioni intracellulari: ad esempio, quando la sintesi del DNA è inibita, i deossinucleotidi presenti in eccesso stimolano l'azione della 5'-nucleotidasi, spostando l'equilibrio del *substrate cycle* in direzione catabolica, con la conseguente espulsione dalla cellula dei nucleosidi prodotti; lo stesso effetto si verifica se invece a spostare l'equilibrio sono enzimi quali deaminasi, fosforilasi e idrolasi, che

catalizzano la demolizione di parte dei nucleosidi (Rampazzo *et al.*, 2010). Al contrario, quando il *pool* dei dNTP si abbassa a causa, ad esempio, dell'inibizione della sintesi *de novo*, l'attivazione delle chinasi determina la fosforilazione dei deossiribonucleosidi che entrano così a far parte del *pool* dei precursori del DNA (Bianchi *et al.*, 1986) favorendo l'assunzione di altri nucleosidi dall'ambiente.

Nell'uomo sono note sette 5'-nucleotidasi a diversa localizzazione subcellulare: cinque di queste sono citosoliche, una è ancorata sulla superficie esterna della membrana plasmatica e una si trova nella matrice mitocondriale (Rampazzo *et al.*, 2000; Bianchi and Spychala, 2003). Tutte le 5'-nucleotidasi intracellulari sono caratterizzate da una Km relativamente elevata che determina una spiccata sensibilità per variazioni anche modeste delle concentrazioni dei substrati, generalmente molto basse. Due tra le 5'-nucleotidasi hanno una preferenza di substrato per i deossiribonucleosidi 2' e 3' monofosfato e sono quindi definite deossinucleotidasi. Entrambe sono coinvolte nella regolazione dei dNTP pirimidinici. La 5'-deossinucleotidasi citosolica (cdN) costituisce un ciclo del substrato con la TK1 nel citosol (Hoglund and Reichard, 1990; Gazzola *et al.*, 2001). Si tratta di un enzima ubiquitario responsabile della maggior parte dell'attività deossinucleotidasica in cellule di mammifero (Rampazzo *et al.*, 2002). La 5'-deossinucleotidasi mitocondriale (mdN) ha un'elevata omologia con l'enzima citosolico; escludendo la sequenza N-terminale di localizzazione mitocondriale l'identità aminoacidica è del 52% (Rampazzo *et al.*, 2000b). La mdN costituisce un perfetto *substrate cycle* intramitocondriale con la TK2 (Rampazzo *et al.*, 2004).

L'equilibrio di questi cicli è determinato anche da altri enzimi del catabolismo dei deossiribonucleosidi: fosforilasi, deaminasi e idrolasi. Rimuovendo i nucleosidi l'azione di questi enzimi sposta l'equilibrio verso il catabolismo. L'importanza di questi enzimi nella regolazione dei *pool* di dNTP è testimoniata dal fatto che, spesso, mutazioni a loro carico determinano l'insorgenza di malattie legate allo sbilanciamento dei precursori del DNA (Rampazzo *et al.*, 2010). La timidina fosforilasi (TP), ad esempio, è coinvolta nella regolazione del contenuto di dTTP nella cellula, in quanto catabolizza la timidina a timina e deossiribosio-1-fosfato nel citoplasma. Una deficienza di questa funzione risulta nell'accumulo di

alti livelli di timidina e deossitimidina nel plasma dei pazienti affetti, determinando delezioni multiple e deplezione del mtDNA in una patologia nota come encefalopatia mitocondriale neurogastrointestinale (MNGIE) (Nishino *et al.*, 1999).

1.3.1 Studio dei *substrate cycle*

L'attività dei *substrate cycle* citoplasmatici può essere valutata misurando la fuoriuscita di nucleosidi nel mezzo di incubazione in cellule in coltura. In questi esperimenti alle cellule vengono forniti precursori marcati isotopicamente e viene valutata l'incorporazione della radioattività nel DNA e nei deossiribonucleosidi rilasciati nel mezzo di coltura (Gazziola *et al.*, 2001). Da questo tipo di esperimenti è stato possibile concludere che in cellule ciclanti la maggior parte dei dNTP prodotti è incorporata nel DNA e solo una piccola frazione viene escreta. Qualsiasi evento che perturba il normale metabolismo dei dNTP determina uno spostamento dell'equilibrio verso un maggior importo (e quindi anabolismo) o una maggiore escrezione (catabolismo) a seconda dei casi. In questo modo è stato possibile identificare la TK1 come responsabile della fase anabolica del ciclo futile di dTMP/ timidina e la dCK come enzima corrispondente in quelli di dCMP/ deossicitidina e dAMP/ deossiadenosina (Höglund *et al.*, 1988). Lo studio dei *substrate cycle* mitocondriali è complicato dal fatto che il contenuto mitocondriale di dNTP rappresenta solo una piccola frazione dei precursori totali della cellula. Di conseguenza, gli studi si sono indirizzati nell'analisi separata dei *pool* citosolici e mitocondriali, con la messa a punto di un metodo di analisi differenziale dei due *pool* (Pontarin *et al.*, 2003). Il ruolo regolativo della mdN è emerso in seguito ad esperimenti di sovraespressione dell'enzima e di silenziamento del gene corrispondente mediante *RNA interference* in cellule TK1⁺ e TK1⁻ (Rampazzo *et al.*, 2004). In cellule proliferanti TK1⁺ la fosforilazione della [H³]-timidina è quasi esclusivamente mediata dalla TK1 nel citoplasma e perciò la sovraespressione della mdN nel mitocondrio non ha un effetto rilevabile sul *pool* di dTTP citoplasmatico. Al contrario, in cellule TK1⁻, la timidina è metabolizzata esclusivamente nei mitocondri e il dTMP formato

è un possibile substrato della mdN. Esperimenti condotti in cellule proliferanti TK1⁻ hanno perciò confermato il coinvolgimento della mdN in un *substrate cycle* con la timidina chinasi 2 (Rampazzo *et al.*, 2004). La deossinucleotide chinasi mitocondriale regola quindi la fosforilazione della timidina all'interno del mitocondrio, ma il suo livello di attività in cellule proliferanti non influenza le dimensioni del *pool* di dTTP mitocondriale e tanto meno di quello citoplasmatico.

1.4 Metabolismo del dTTP

Abbiamo visto come la sintesi dei dNTP sia un processo coordinato con il tasso di sintesi del DNA: il contenuto dei dNTP è basso in cellule non-proliferanti, aumenta alla transizione G1/S e declina in corrispondenza del passaggio G2/mitosi (Chabes *et al.*, 2003). Il *pool* del dTTP è quello che subisce una fluttuazione più ampia, con una concentrazione in fase S di 20 volte superiore a quella delle cellule in G0 (Spyrou and Reichard, 1988). Questa variazione è il risultato della fine modulazione della RNR, dei *substrate cycle* dTMP/timidina e della regolazione con il ciclo cellulare degli enzimi TK1 e timidina monofosfato chinasi (TMPK). Sia TK1 che TMPK sono degradate in fase mitotica e di conseguenza sono virtualmente assenti in cellule quiescenti.

Hu e Chang, in una *review* del 2007 pongono come titolo la domanda: "*Mitotic control of dTTP pool: a necessity or a coincidence?*" (Hu and Chang, 2007). Il dTTP rappresenta un regolatore chiave dell'attività della RNR, in quanto è in grado di spostare la specificità dell'enzima dalla riduzione di pirimidine a quella di purine (Reichard, 1988) inibendo la riduzione del CDP e favorendo la formazione di dGTP. Cellule che esprimono forme non degradabili di TK1 e TMPK presentano un aumento dei *pool* di dTTP e dGTP rispettivamente di 2 volte e 3 volte rispetto a cellule *wild-type* e una riduzione del 30% del *pool* del dCTP (Ke *et al.*, 2005). Questo forte sbilanciamento del rapporto dGTP/dCTP determina un aumento del tasso di mutazione. L'accumulo di dGTP *in vivo* è estremamente mutagenico (Darè *et al.*, 1995) e la deplezione di dCTP non solo determina uno stallo della forza replicativa con misincorporazione di

nucleotidi, ma anche riduce la capacità di correzione di bozze della polimerasi. Si può quindi affermare che la degradazione mitotica di TK1 e TMPK è un prerequisito per garantire un *pool* bilanciato dei quattro nucleotidi nella fase G1 del ciclo successivo. Il contenuto di dTTP è quindi minimizzato nella fase G1 precoce per evitare una deplezione di dCTP e una produzione eccessiva di dGTP. In tarda fase G1 i livelli di espressione di TK1 e TMPK aumentano, garantendo la massima produzione di dTTP necessaria per una corretta replicazione del DNA in fase S. Perciò, le oscillazioni periodiche nella formazione del dTTP non sono una diretta conseguenza della sua produzione e del suo consumo, ma piuttosto si tratta di un meccanismo attivamente coinvolto nel mantenimento della stabilità genomica durante la proliferazione di cellule di mammifero (Hu and Chang, 2007).

1.4.1 Timidina chinasi 1 e 2

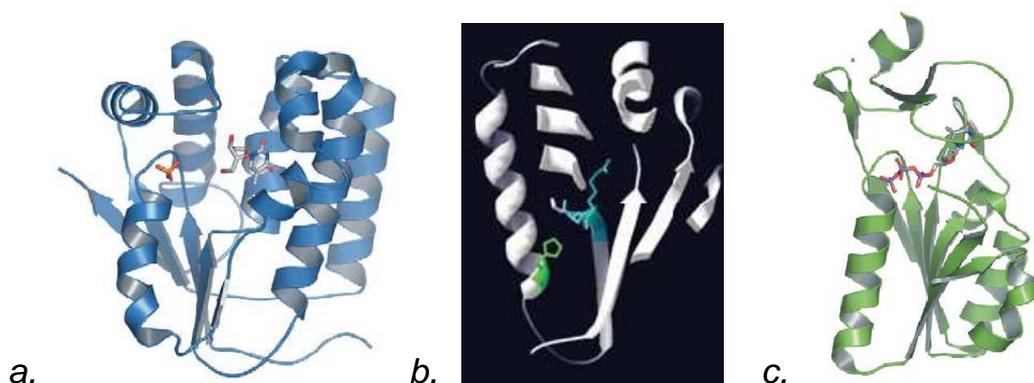


Figura 3. Struttura quaternaria delle timidina chinasi. (a) DMdNK, enzima di insetto omologo della TK2, con timidina e ione solfato; (b) predizione della struttura della TK2 di topo tramite analisi computazionale; (c) struttura della TK1 umana con dTTP. (a) e (c) tratte da Sandrini and Piškur, 2005; (b) tratta da Dorado *et al.*, 2010.

Le cellule di mammifero contengono due isoforme di timidina chinasi: una citosolica (TK1) e una mitocondriale (TK2), i due enzimi responsabili del recupero della timidina in dTMP. Entrambi gli enzimi sono identificati dallo stesso codice EC (EC 2.7.1.21) sebbene siano codificati da geni nucleari diversi e appartengano a due famiglie strutturali differenti (Figura 3), indice di una diversa origine evolutiva (Johansson *et al.*, 2001; Welin *et al.*, 2004;

Sandrini and Piškur, 2005). Il gene della TK1 mappa sul cromosoma 17q25, mentre quello della TK2 sul cromosoma 16q22. Oltre alla timidina, entrambe fosforilano deossiuridina e la TK2 fosforila anche deossicitidina. I due enzimi presentano complessi meccanismi di regolazione enzimatica e di cooperatività.

La TK1 presenta un sistema di regolazione che oserei definire “a tutt’occolo”. La sua attività è regolata con il ciclo cellulare: aumenta alla transizione G1/S, declina in G2/M ed è prossima a zero in cellule non proliferanti. Meccanismi di controllo trascrizionale e traduzionale ne determinano l’incremento di espressione in fase S precoce (Dou and Pardee, 1996), mentre il declino repentino di espressione in G2/M non è correlato al contenuto di mRNA (Arnèr and Eriksson, 1995), ma è da attribuire ad un sistema di proteolisi mediante ubiquitinazione (Ke and Chang, 2004). Nella regione C-terminale della TK1 umana è presente infatti una sequenza di 40 aminoacidi, conservata anche in pollo, criceto e topo, contenente un sito KEN riconosciuto dal complesso APC/C-Cdh1. Una volta ubiquitinata, la proteina viene degradata nei proteasomi durante la mitosi. In cellule quiescenti, invece, vi è correlazione tra l’assenza di attività della TK1 e il basso contenuto del suo mRNA, implicando la soppressione della trascrizione (Wintersberger *et al.*, 1992).

In aggiunta, l’attività enzimatica della TK1 è regolata in modo molto complesso. La proteina può assumere una forma dimerica (60 KDa) o tetrameric (120 KDa) e la transizione da dimero a tetramero può dipendere sia dalla concentrazione di ATP che dalla concentrazione di TK1 presente. Analisi cinetiche con timidina come substrato e a concentrazioni saturanti di ATP (2-3 mM), rivelano uno stesso *turnover* (Kcat) per entrambe le forme ma una diversa Km: la forma dimerica ha una Km di 15-17 µM timidina, mentre la forma tetrameric circa 0.5 µM timidina. La concentrazione fisiologica di ATP nella cellula è di circa 1-2 mM, mentre quella della timidina non è nota e si suppone che sia in equilibrio con quella del plasma, che è inferiore a 50 nM. Questo implica che nella cellula il tetramero ha un’attività catalitica di 30 volte superiore al dimero (Munch-Petersen *et al.*, 1993; Munch-Petersen, 2009). La concentrazione cellulare della TK1 è zero all’inizio della fase G1 e aumenta fino a 0.16-0.25 µM nel picco di fase S. Ne consegue che in fase

G1 precoce la TK1 non può formare tetrameri e si trova quindi in forma dimerica. Con l'aumentare della concentrazione di enzima durante la fase S la forma tetramerică prende il sopravvento (Figura 4). Successivamente, durante la mitosi, pur essendo presente in grande quantità la TK1 non è molto attiva. Infatti, una fosforilazione della serina 13 compromette lo stato tetramerică dell'enzima e di conseguenza la sua attività (Li *et al.*, 2004). Questo complesso meccanismo di transizione dimero- tetramero assicura una fine regolazione dell'attività della TK1.

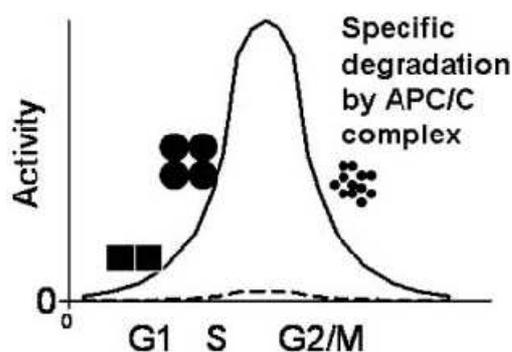


Figura 4. Modello della variazione dell'attività TK1 durante il ciclo cellulare (tratto da Munch-Petersen, 2010). La concentrazione di ATP si presuppone essere costante a 1-2 mM, mentre quella della timidina inferiore o uguale a 50 nM. All'inizio del ciclo cellulare la TK1 è assente per effetto della degradazione specifica mediante ubiquitinazione avvenuta nella precedente fase G2/M. Durante la fase G1 la concentrazione della TK1 aumenta come conseguenza dell'attivazione trascrizionale. Inizialmente la TK1, trovandosi ad una bassa concentrazione, sarà nella forma dimerica con un'elevata Km. Con l'aumentare della concentrazione di TK1, l'enzima raggiungerà progressivamente la forma tetramerică con una Km 30 volte inferiore. Infine, in corrispondenza del suo picco di concentrazione, tutta la TK1 si troverà nella forma tetramerică e la sua attività sarà 30 volte superiore a quella della forma dimerica. Linea continua: attività TK1 con transizione dimero-tetramero. Linea tratteggiata: attività TK1 senza transizione dimero-trimero.

La TK2 è espressa da un gene nucleare e trasportata nel mitocondrio in virtù di una sequenza segnale N-terminale (Wang & Eriksson, 2000; Wang *et al.*, 2003). Il ruolo principale della TK2 è quello di sostenere la sintesi dei nucleotidi pirimidinici all'interno del mitocondrio. Essa non è regolata con il ciclo cellulare ed è espressa a bassi livelli in tutti i tessuti, tuttavia possiede una complessa regolazione a livello enzimatico. La sua cinetica in presenza di deossicitidina è di tipo Michaelis-Menten, con una velocità iperbolica in funzione del substrato; mentre, in presenza di timidina, la TK2

mostra una dipendenza bifasica dal substrato che indica cooperatività negativa (Munch-Petersen, 1991; Munch-Petersen & Tyrsten, 1977). Una cooperatività negativa implica che a basse concentrazioni di substrato l'affinità di legame è alta, ma diminuisce quando la concentrazione aumenta. Nella cellula, dove la concentrazione fisiologica di timidina è inferiore a 50 nM, questo si traduce in un'attività enzimatica 100 volte superiore a quella di una TK2 non cooperativa con la stessa Km. Non è ancora noto il meccanismo molecolare alla base di questa cooperatività negativa. Si potrebbe presupporre l'esistenza di più di un sito di legame del substrato, in questo caso il legame in un sito potrebbe modificare l'affinità dell'altro. Tuttavia l'esistenza di un altro sito di legame è poco probabile in una proteina di 30 KDa. Ancora aperto è il dibattito su una possibile oligomerizzazione della TK2 ad una forma dimerica o superiore. La struttura quaternaria della TK2 non è ancora nota, per ora sono disponibili dei modelli ottenuti tramite l'omologia con una chinasi di insetto (DMdNK) dalle caratteristiche molto simili alla TK2 e programmi di predizione al computer (Figura 3). La TK2 presenta un'elevata similarità di sequenza con la dCK e la dGK (paragrafo 1.1.1), che nelle loro forme attive sono dei dimeri e in esperimenti condotti con la TK2 murina ricombinante, sembra che l'enzima attivo sia un dimero. I risultati ottenuti in precedenza, che presentavano la TK2 attiva come monomero nella forma nativa, sono stati attribuiti ad artefatti dovuti alla modalità di estrazione della proteina (Wang and Eriksson, 2000).

Un interessante argomento di discussione è se la complicata cinetica della TK2 abbia qualche conseguenza fisiologica sulla regolazione dei *pool* mitocondriali dei dNTP. In cellule ciclanti i *pool* mitocondriali dei dNTP sono in continuo scambio con quelli citosolici (Pontarin *et al.*, 2003). In cellule non proliferanti, dove la sintesi *de novo* è ridotta e la via di recupero citoplasmatica della timidina è assente (degradazione mitotica della TK1), il contributo della TK2 mitocondriale diventa fondamentale per la sintesi del dTTP. Nel 2001, mutazioni a carico della TK2 sono state associate ad una grave forma di sindrome da deplezione del mtDNA (MDS), caratterizzata da miopatia del muscolo scheletrico, deplezione del mtDNA e mortalità infantile (Saada *et al.*, 2001). Da allora, diversi studi hanno confermato questa correlazione riportando ulteriori mutazioni nel

gene della TK2 presenti in pazienti MDS. Topi *knock-out* per la TK2 manifestano ritardo nella crescita e mortalità prematura (Zhou *et al.*, 2008). In un altro studio, il topo *knock-in* per una mutazione omologa alla H121N umana presenta un'attività TK2 notevolmente ridotta e un forte sbilanciamento del pool del dTTP (Akman *et al.*, 2008). L'effetto di questa mutazione sulle proprietà enzimatiche della TK2 sembra compromettere la sua cooperatività negativa (Wang *et al.*, 2003). Questo potrebbe spiegare in parte il fenotipo dei topi *knock-in* e suggerisce che la regolazione cooperativa della TK2 abbia un significato fisiologico importante per la regolazione del *pool* mitocondriale del dTTP (Munch-Petersen, 2010).

1.5 Origine dei precursori mitocondriali e interazioni dinamiche tra *pool* citosolici e mitocondriali.

In cellule proliferanti i *pool* di ciascun dNTP hanno dimensioni comprese tra 10-100 pmoli/ 10^6 cellule, in cui la frazione mitocondriale rappresenta un 10% del totale (Rampazzo *et al.*, 2010). Al di fuori della fase S, la richiesta di precursori nucleotidici è limitata principalmente alla replicazione del mtDNA che, a differenza di quello nucleare, è sottoposto ad un continuo *turnover* (paragrafo 1.6.1) e si replica lungo tutto il ciclo cellulare. In concomitanza a questa riduzione dei consumi si verifica un ridimensionamento dei *pool* nucleotidici citoplasmatici e mitocondriali, che si riducono entrambi di circa 10 volte in cellule di mammifero.

E' comunemente accettata la teoria secondo la quale i precursori del mtDNA derivano sia dalla sintesi *in situ* delle vie di recupero mitocondriali, sia dall'importo di dNTP prodotti nel citosol. Tuttavia, per lungo tempo, si è ritenuto che i *pool* mitocondriali di dNTP fossero separati da quelli citosolici. Timidina radioattiva fornita a cellule TK1⁻ veniva incorporata preferibilmente nel mtDNA, dopo essere stata fosforilata dalla TK2 (Bogenghagen and Clayton, 1976). Successivamente, grazie alla messa a punto di un sistema per separare il *pool* mitocondriale da quello citoplasmatico, è stata dimostrata l'esistenza di uno scambio reciproco tra i *pool* di dNTP sintetizzati nei due compartimenti. In particolare, esperimenti di flusso isotopico condotti su cellule TK1⁻ e TK1⁺ in coltura

con timidina triziata, hanno dimostrato un rapido influsso, nel mitocondrio, di fosfati timidinici provenienti dalla sintesi *de novo* che determinava una diluizione della radioattività specifica della timidina all'interno dell'organello e un movimento ugualmente rapido, ma in direzione opposta, di nucleotidi sintetizzati mediante fosforilazione della timidina all'interno del mitocondrio, dimostrato dalla presenza di radioattività nei fosfati timidinici citosolici delle cellule TK2⁻ (Pontarin *et al.*, 2003). Esperimenti successivi hanno dimostrato l'esistenza di scambi di questo tipo anche per il *pool* mitocondriale del dGTP (Leanza *et al.*, 2008), supportando l'ipotesi che queste interazioni dinamiche tra mitocondrio e citosol interessino tutti i quattro dNTP. Sulla base di questi risultati e di altri dati ottenuti con cellule geneticamente modificate (Rampazzo *et al.*, 2004), è stato proposto un modello a due vie per l'origine dei precursori mitocondriali, come esemplificato per il dTTP in Figura 5. Secondo questo schema ipotetico, i *pool* dei dNTP mitocondriali sono alimentati da due vie di trasporto dal citosol al mitocondrio: importo di deossiribonucleotidi attraverso trasportatori specifici, oppure trasporto di deossiribonucleosidi, mediante un trasportatore nucleosidico equilibrativo (hENT1) (Lai *et al.*, 2004) e successiva fosforilazione ad opera di chinasi mitocondriali.

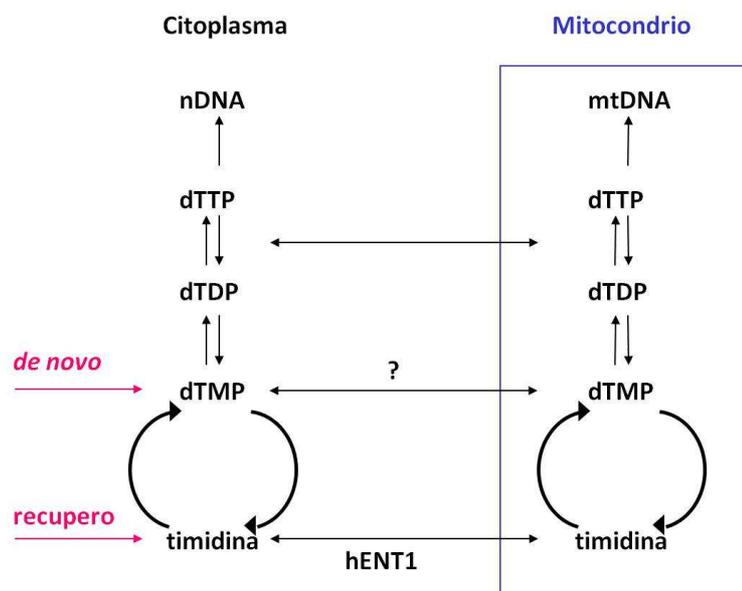


Figura 5. Rappresentazione delle vie di sintesi del dTTP nel citoplasma e nel mitocondrio

La prima via dipende principalmente dalla sintesi *de novo* e in misura minore dall'attività della timidina chinasi citosolica. Il contributo di questa via risulta notevolmente ridotto in cellule post-mitotiche in quanto la TK1 e R2 sono assenti e l'attività di R1/p53R2 è minima (paragrafo 1.4.1). Esistono diverse evidenze sperimentali per il trasporto di deossinucleotidi attraverso la membrana mitocondriale interna. Questo processo potrebbe avvenire a livello di mono-, di-, e trifosfato (Ferraro *et al.*, 2006; Mathews and Song, 2007); tuttavia, non è ancora stata risolta la natura molecolare delle proteine trasportatrici coinvolte né il livello di fosforilazione a cui avviene il trasporto.

La seconda via prevede l'importo di deossinucleosidi presenti nell'ambiente extracellulare all'interno della matrice e la loro successiva trasformazione in dNTP mediante fosforilazioni successive. Le due deossinucleoside chinasi mitocondriali (TK2, dGK), da sole, sono sufficienti per la sintesi di tutti i quattro dNTP del *pool* mitocondriale: la dGK agisce sui deossinucleosidi purinici, la TK2 su deossitimidina, deossicitidina e deossiuridina (paragrafo 1.1.1). La via di recupero mitocondriale è attiva anche al di fuori della fase S, in quanto i due enzimi non sono regolati con il ciclo cellulare; acquisisce quindi rilevanza in cellule quiescenti o differenziate. Attualmente, non è ancora disponibile un quadro completo di tutte le chinasi mitocondriali coinvolte nei diversi stadi di fosforilazione verso la forma trifosfato dei precursori. Sono state identificate delle chinasi per i nucleosidi mono- e difosfato che potrebbero essere coinvolte nel metabolismo dei dNTP nel mitocondrio. La prima nucleoside monofosfato chinasi mitocondriale umana è stata caratterizzata di recente. Questo enzima, denominato UMP-CMPK2 ha come substrati UMP, CMP, dUMP e dCMP, ma predilige i deossinucleotidi (Xu *et al.*, 2008). Negli anni '90 è stata individuata nell'uomo una nucleoside difosfato chinasi mitocondriale (NME4), associata alla membrana interna (Milon *et al.*, 1997), che presenta un'elevata omologia di sequenza con quella di piccione, solubile nella matrice (Lambeth *et al.*, 1997). Non è esclusa l'esistenza di ulteriori isoforme di nucleoside difosfato chinasi umane aventi localizzazioni diverse all'interno del mitocondrio (Milon *et al.*, 2000).

Il trasporto dei deossiribonucleosidi attraverso la membrana mitocondriale è mediato dai trasportatori nucleosidici equilibrativi (ENT), o concentrativi, la cui partecipazione all'importo di nucleosidi nel mitocondrio non è stata ben caratterizzata. Esistono quattro ENT nella famiglia umana di trasportatori nucleosidici e hENT1 è presente sia nella membrana plasmatica che in quella mitocondriale (Lee *et al.*, 2006). Il *knock-down* di hENT1 in colture di fibroblasti determina deplezione del mtDNA (Villaroya *et al.*, 2009), indicando l'importanza dell'ingresso di deossinucleosidi come primo stadio di una serie di reazioni necessarie alla sintesi del mtDNA. Recentemente è stato dimostrato che hENT3, un trasportatore di nucleosidi intracellulare, è localizzato nella membrana mitocondriale e facilita l'importo di deossinucleosidi canonici e di analoghi nucleosidici antivirali (Govindarajan *et al.*, 2009). La timidina viene importata in mitocondri isolati, fosforilata e incorporata nel mtDNA (McKee *et al.*, 2004). L'importo della deossiguanosina risulta accoppiato alla sintesi di ATP e alla fosforilazione del deossinucleoside (Watkins *et al.*, 1987). Mediante esperimenti di immunisto chimica e analisi di *microarray* su tessuti è stato possibile individuare alti livelli di hENT1 in reni, fegato, ghiandole surrenali e bassi livelli di espressione in polmoni e tessuto nervoso. Non sono state determinate quantità misurabili di hENT1 in cuore, milza, muscolo e altri tessuti (Hubeek *et al.*, 2008). La concentrazione citosolica e mitocondriale dei deossinucleosidi è sempre stata considerata in equilibrio con quella extracellulare, saranno necessari ulteriori studi per chiarire la tessuto-specificità dei trasportatori nucleosidici.

Un'ultima considerazione riguarda la distribuzione tessuto-specifica degli enzimi coinvolti nella sintesi di recupero (Tabella 2). TK2 e dGK sono costitutivamente espresse a bassi livelli, mentre le due chinasi citosoliche, TK1 e dCK, sono principalmente espresse nei tessuti linfoidei (dCK) o in cellule proliferanti (TK1) a livelli relativamente elevati. In tessuti differenziati i livelli di attività di TK1, TK2, dCK e dGK, misurati in estratti totali di tessuti di topo, rivelano una distribuzione tessuto-specifica che interessa anche gli enzimi catabolici, come ad esempio le nucleotidasi (Rylova *et al.*, 2007). Un'ulteriore caratterizzazione degli enzimi della sintesi di recupero delle pirimidine, condotta in frazioni citosoliche e mitocondriali di tessuti di ratto, ha suggerito che la TK2 sia il principale

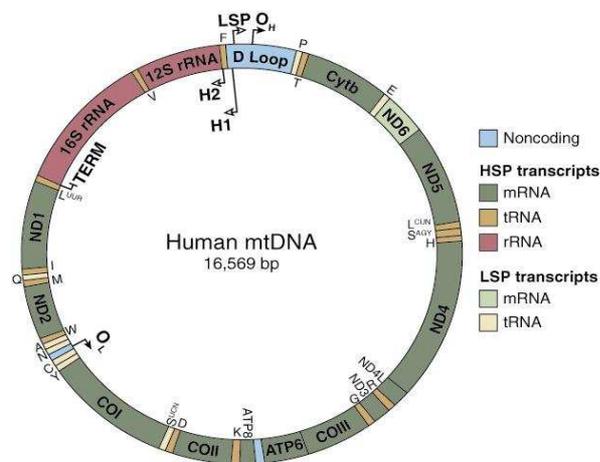
enzima per il recupero delle pirimidine nella maggior parte dei tessuti (Wang and Eriksson, 2010). I livelli mitocondriali più alti della TK2 si ritrovano in milza, cervello e polmone; livelli intermedi caratterizzano fegato, cuore e reni, mentre il livello più basso di attività appartiene al muscolo scheletrico. In questo studio è stata misurata anche un'attività TK2 molto bassa nel citosol che però, al momento, non trova conferma in altre pubblicazioni. Le due chinasi citosoliche sono state rinvenute solo negli estratti di milza e fegato, sia TK1 che dCK presentano un'attività che è bassa in fegato e alta nella milza. Per quanto riguarda gli enzimi catabolici, le deossinucleotidasi pirimidiniche citosolica (cdN) e mitocondriale (mdN) presentano un *pattern* di distribuzione simile: l'attività della cdN risulta alta in estratti di milza, polmoni e reni; mentre la mdN è alta in estratti di fegato, milza e reni. L'attività della timidina fosforilasi (TP) in estratti citosolici risulta alta in fegato, cuore, milza e polmoni; mentre è bassa in cervello e muscolo scheletrico. Anche per questo enzima è stato misurato un livello molto basso di attività negli estratti mitocondriali che necessita una conferma.

	Livelli di attività enzimatica		
	elevata	media	bassa
TK2**	milza, cervello, polmone	fegato, cuore, reni	muscolo
TK1**	cellule prolifer., milza, testicoli		fegato
dCK**	tessuti linfoidei milza		fegato, muscolo
dGK*	fegato, reni, milza, polmoni, cuore		muscolo
cdN*	milza, polmoni, reni		
mdN*	fegato, milza, reni		
TP*	fegato, cuore, milza, polmoni		cervello, muscolo

Tabella 2. Distribuzione tessuto-specifica degli enzimi della sintesi di recupero. Dati relativi a misure di attività enzimatica su estratti di tessuti di topo *(Rylova et al., 2007) o di ratto **(Wang and Eriksson, 2010).

1.6 Replicazione del DNA mitocondriale

I mitocondri sono organelli essenziali per le funzioni cellulari, non solo perché forniscono la cellula di energia sotto forma di ATP, ma anche perché sono coinvolti in molteplici processi metabolici e nell'apoptosi. Anomalie nella funzionalità mitocondriale sono state riscontrate in numerose patologie umane come cancro, diabete, la sindrome di Alzheimer e il normale processo di invecchiamento.



Falkenberg M, et al. 2007.
Annu. Rev. Biochem. 76:679-99

Figura 6. Mappa del mtDNA umano. Abbreviazioni: COI, citocromo c ossidasi subunità I; COII, citocromo c ossidasi subunità II; COIII, citocromo c ossidasi subunità III; Cytb, citocromo b; HSP, promotore del filamento pesante (*heavy-strand*); LSP, promotore del filamento leggero (*light-strand*); ND1, NADH deidrogenasi subunità 1; ND2, NADH deidrogenasi subunità 2; ND4, NADH deidrogenasi subunità 4; ND6, NADH deidrogenasi subunità 6; OH, origine di replicazione del filamento pesante (*H-strand*).

Il genoma mitocondriale è costituito da una molecola circolare di DNA a doppio filamento, di circa 16,6 kilobasi (kb) nelle cellule umane e 16,3 kb in cellule murine, che codifica per 13 delle circa 90 proteine presenti nella catena respiratoria dei mitocondri di mammifero (Figura 6). I livelli di espressione di questi 13 polipeptidi sono correlati al numero di copie del mtDNA. Le restanti componenti della catena respiratoria sono codificate da geni nucleari e importate nel mitocondrio attraverso sistemi di trasporto specializzati (Mokranjac and Neupert, 2005). In aggiunta alle molecole di mRNA, il genoma mitocondriale codifica anche due RNA ribosomali (rRNA) e 22 transfer RNA (tRNA). La maggior parte delle componenti

necessarie per la replicazione del mtDNA, la trascrizione e la traduzione, è quindi codificata da geni nucleari.

I mitocondri contengono una batteria enzimatica propria dedicata al processo di replicazione del mtDNA (Falkenberg *et al.*, 2007). Molte componenti basilari di questo sistema sono state caratterizzate, ma alcune attività enzimatiche non sono ancora state identificate. Inoltre, esiste tutt'ora un intenso dibattito circa l'esatto modello di replicazione del mtDNA. La sintesi del mtDNA a partire dall'origine di replicazione O_H procede in modo unidirezionale spostando il filamento pesante (H) parentale. Il filamento H nascente spesso termina 700 paia di basi (bp) a valle dell' O_H dando origine al 7S DNA. Questo evento di terminazione produce la caratteristica struttura a triplo filamento nota come D-loop (Clayton, 1991). La frequenza con cui si ritrovano strutture di questo tipo varia con lo stato di proliferazione cellulare e il tipo di tessuto. Non sono ancora state chiarite le funzioni del D-loop e sono attualmente sconosciuti anche i meccanismi che decidono se la replicazione debba continuare oppure arrestarsi.

I primi studi condotti su linee cellulari di mammifero hanno portato all'elaborazione di un modello di replicazione definito asimmetrico (Clayton, 1991). In questo modello, la trascrizione diretta dal LSP (*Leading Strand Promoter*) fornisce i *primer* necessari per iniziare la replicazione del filamento pesante, definito filamento continuo (*leading strand*). Quando la sintesi del *leading strand* ha raggiunto i due terzi del genoma, viene esposta l'origine di replicazione del filamento leggero (O_L) che si attiva, dando inizio alla sintesi del filamento in ritardo (*lagging strand*), che procede nella direzione opposta. Una volta completata la sintesi di entrambi i filamenti, le estremità delle molecole vengono legate nella consueta forma circolare prima che sia introdotto il superavvolgimento. Questo modello si basa sull'osservazione degli intermedi di replicazione al microscopio elettronico, sull'isolamento biochimico di questi intermedi e su esperimenti di *pulse-chase* (Berk and Clayton, 1974; Bogenhagen and Clayton, 2003).

Nei primi anni 2000 è stato proposto un modello diverso per la replicazione del mtDNA nei mammiferi basato sull'osservazione degli intermedi di replicazione mediante una nuova tecnica elettroforetica su gel

di agarosio (neutra/neutra bi-dimensionale, 2D-NAGE) che permette di distinguere le molecole del DNA per forma e dimensione. I risultati ottenuti da questa analisi sono compatibili con un classico modello di replicazione sincrono dei due filamenti. Queste e altre osservazioni hanno portato alla conclusione che il mtDNA si replica simmetricamente a partire da molteplici forche replicative bidirezionali su un'ampia zona (Bowmaker *et al.*, 2003). Il modello di replicazione sincrono è stato successivamente modificato in seguito all'osservazione di un'altra modalità di replicazione, sia in uccelli che in mammiferi (Yasukawa *et al.*, 2006). Si tratta del modello definito RITOLS (*Ribonucleotide Incorporation Throughout the Lagging Strand*). Secondo questo modello la replicazione inizia in corrispondenza del D-loop e, a differenza del modello sincrono, il filamento leggero viene prima sintetizzato come RNA, per poi essere convertito in DNA attraverso un meccanismo non ancora identificato. Gli autori ipotizzano che l'RNA possa proteggere e stabilizzare il ssDNA oppure che abbia la funzione di bloccare l'apparato trascrizionale, che potrebbe interferire con la replicazione.

La discussione tra i sostenitori dei due modelli è ancora accesa. Il modello di replicazione sincrono è stato messo in dubbio in seguito all'analisi del mtDNA al microscopio a forza atomica che ha prodotto prove a favore del modello asimmetrico (Brown *et al.*, 2005). In questo studio sono stati scoperti siti addizionali di inizio della replicazione che concordano con gli intermedi di replicazione osservati nell'analisi con 2D-gel. Inoltre, si riscontra la presenza stabile di RNA (*R-loops*), non replicativo e parzialmente ibridato al mtDNA che mette in dubbio il modello RITOLS (Brown *et al.*, 2008). I confini tra i due modelli di replicazione diventano sempre meno marcati e solo ulteriori studi permetteranno di ottenere un quadro finale dei meccanismi di questo processo.

Il replisoma minimo, vale a dire le proteine fondamentali per la sintesi del mtDNA, comprende la DNA polimerasi mitocondriale (POL γ), l'elicasi TWINKLE e le mtSSB, proteine mitocondriali che legano e stabilizzano i filamenti singoli di DNA (ssDNA) in corrispondenza della forca replicativa. POL γ è un eterotetramero costituito da una subunità catalitica e due subunità accessorie identiche che, insieme a TWINKLE, costituisce un apparato replicativo che utilizza filamenti di DNA a doppio filamento

(dsDNA) come stampo per la sintesi di molecole di ssDNA di circa 2 kb. La presenza di proteine mtSSB stimola la reazione, portando alla formazione di prodotti di DNA di circa 16 kb, in conformità con le dimensioni del mtDNA nei mammiferi (Falkenberg *et al.*, 2007). Tra le altre attività enzimatiche coinvolte nel processo replicativo si presuppone un'attività primasica, in grado di generare *primer* a RNA in corrispondenza dell'origine di replicazione. Un'attività primasica è stata per la prima volta descritta in estratti mitocondriali nel 1985, ma da allora non è ancora stato individuato l'enzima responsabile e il gene corrispondente (Wong and Clayton, 1986; Wong and Clayton, 1985). Secondo il modello asimmetrico non è richiesta un'attività primasica distinta. La RNA polimerasi mitocondriale (POLMRT), infatti, genera dei *primer* per l'inizio della replicazione in corrispondenza dell'origine O_H e un lavoro recente ha dimostrato che ciò si verifica anche in corrispondenza dell'origine O_L (Wanrooij *et al.*, 2008). Questo lavoro ha proposto due modalità di azione della POLMRT. L'enzima trascrive in modo efficiente lunghi filamenti di dsDNA, ma la sua processività diminuisce notevolmente in corrispondenza di filamenti ssDNA, generando filamenti di RNA di 20-75 nucleotidi. Questi brevi *primer* di RNA possono essere utilizzati dalla POLY per iniziare la sintesi del mtDNA *in vitro* e la reazione è stimolata dalla presenza di proteine mtSSB. Studi successivi hanno confermato questi risultati (Fusté *et al.*, 2010).

1.6.1 Turnover del mtDNA

I mitocondri si dividono attraverso fissione binaria, e il loro contenuto, compreso il mtDNA, segrega nei mitocondri di nuova formazione. Questo processo si verifica non solo in cellule proliferanti, dove la divisione cellulare richiede una distribuzione equa delle componenti citoplasmatiche alle cellule figlie, ma avviene anche in cellule non proliferanti dove i mitocondri sono sottoposti ad un *turnover* di degradazione e rigenerazione. Di conseguenza è necessario che questi processi siano accompagnati dalla replicazione del mtDNA per garantire che ogni organello abbia un contenuto adeguato di genoma mitocondriale. Perciò,

la sintesi del mtDNA, diversamente da quella del nDNA, non è limitata alla fase S, ma si verifica lungo tutto il ciclo cellulare.

In colture primarie di epatociti di ratto, che sono cellule quiescenti, si osserva un elevato *turnover* del mtDNA che avviene in modo casuale; mentre non si osserva alcuna replicazione del nDNA (Kai *et al.*, 2006). Anche in tessuti differenziati si verifica un *turnover* costitutivo del mtDNA (Gross *et al.*, 1969). La vita media delle molecole di mtDNA è altamente regolata e varia da tessuto a tessuto. Cuore, fegato e reni hanno il più alto tasso di *turnover* (emivita di circa 7 giorni); mentre per il cervello è molto più basso (emivita di circa 30 giorni) (Gross *et al.*, 1969). Il motivo per cui questo tipo di *turnover* in cellule post-mitotiche interessa il mtDNA e non il nDNA resta da chiarire. Il genoma mitocondriale potrebbe risentire di danni ossidativi oppure potrebbe essere più vulnerabile a causa della sua struttura e/o impacchettamento e degradarsi più facilmente (Wang, 2010). In ogni caso, un elevato *turnover* implica consumo di dNTP e quindi differenze nel metabolismo dei precursori del DNA tra tessuti a diverso contenuto e diverso *turnover* di mtDNA.

1.6.2 Regolazione del numero di copie di mtDNA

I mitocondri sono organelli molto dinamici che cambiano continuamente forma attraverso l'occorrenza frequente di eventi di fusione e fissione e sono in continuo movimento nella cellula. Questo dinamismo morfologico dei mitocondri è cruciale per la vita e la morte delle cellule ed è stato correlato all'apoptosi, al mantenimento dell'omeostasi cellulare e, recentemente, a disordini neurologici e metabolici (Otera and Mihara, 2011). A seconda delle necessità cellulari i mitocondri possono essere uniti in un reticolo interconnesso (fusione) o fragmentati in mitocondri singoli (fissione).

Data l'elevata plasticità morfologica dei mitocondri è difficile stabilire il numero di copie di mtDNA presente in ciascun mitocondrio, per convenzione si fa un'approssimazione considerando i mitocondri come entità separate.

Nei mammiferi, l'ocita maturo contiene almeno 100 000 copie di mtDNA, distribuite in 1-2 copie per organello, quindi il rapporto mtDNA / nDNA è di 100 000: 1. Durante l'embriogenesi questo rapporto si riduce drasticamente. In cellule somatiche ci sono 5-10 copie di mtDNA per organello e da circa 1000 a 10 000 copie per cellula. Il numero di copie di mtDNA non è casuale, ma varia con il tipo di tessuto e lo stadio di sviluppo. Muscolo, tessuto nervoso e fegato contengono un numero elevato di copie di mtDNA. Tuttavia, non è ancora stato individuato un chiaro meccanismo molecolare responsabile del controllo del numero di molecole di mtDNA.

Tutte le componenti del replisoma sono importanti per la regolazione del numero di copie di mtDNA. In *S. pombe* una delezione nel gene che codifica le mtSSB determina una deplezione di mtDNA. Inoltre, mutazioni a carico di POLy e TWINKLE determinano delezioni multiple e deplezione di mtDNA, come osservato in pazienti umani e modelli *knock-out* di topo. Se sovraespressi, questi geni determinano un aumento del numero di molecole di mtDNA ma non sono patogenici (Tynismaa *et al.*, 2004; Tynismaa and Suomalainen, 2009). Queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di un livello soglia di copie di mtDNA per cellula, fondamentale per la normale funzionalità mitocondriale, al di sotto del quale si sviluppano delle patologie; mentre valori elevati sembrerebbero non avere effetti negativi. Un altro elemento chiave nella regolazione del numero di molecole di mtDNA è il fattore trascrizionale mitocondriale (TFAM). Topi *knock-out* per TFAM manifestano deplezione di mtDNA e mortalità embrionale (Larsson *et al.*, 1998); mentre la sovra-espressione di questo fattore determina un incremento del numero di copie senza modificare la capacità della catena respiratoria o la massa mitocondriale (Tynismaa and Suomalainen, 2009).

Tra i fattori che potrebbero essere coinvolti nella regolazione del numero di copie di mtDNA, la concentrazione dei dNTP riveste un ruolo fondamentale. In lievito la sovra-espressione della RNR determina un aumento del numero di molecole di mtDNA, indicando l'importanza del contenuto di dNTP in questo processo di regolazione (Taylor *et al.*, 2005; Baruffini *et al.*, 2006). Mutazioni a carico di TK2 e dGK, le due chinasi responsabili della sintesi di recupero mitocondriale di dNTP, determinano

una deplezione tessuto-specifica del mtDNA. I pazienti con una TK2 mutata (paragrafo 1.7.1), tipicamente sviluppano una grave miopatia che occasionalmente si accompagna a danni neurodegenerativi (Saada *et al.*, 2001; Mancuso *et al.*, 2002; Oskoui *et al.*, 2006; Gotz *et al.*, 2008; Lesko *et al.*, 2010) mentre topi TK2^{-/-} manifestano una patologia multi-organo che differisce dal fenotipo osservato nei pazienti (Zhou *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2008). Quest'osservazione, suggerisce l'esistenza di differenze tra specie nella regolazione tessuto-specifica del contenuto di precursori per la sintesi del mtDNA. Deplezione di mtDNA con tessuto-specificità caratterizza il fenotipo dovuto a mutazioni di p53R2 (paragrafo 1.7.1). Infine, recentemente, l'assenza di p53 è stata correlata a deplezione del mtDNA in fibroblasti umani in coltura (Kulaviec *et al.*, 2009; Lebedeva *et al.*, 2009), indicando un coinvolgimento anche di questa proteina.

Per concludere, la regolazione del numero di copie di mtDNA è un processo multifattoriale che avviene a diversi livelli attraverso molteplici vie e il preciso meccanismo di questo controllo non è ancora stato individuato (Wang, 2010).

1.7 Sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (MDS)

Le sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (MDS) rappresentano una classe di malattie mitocondriali ereditarie, a trasmissione autosomica recessiva, clinicamente eterogenea e caratterizzata da una riduzione quantitativa del numero di copie di mtDNA, senza difetti di tipo qualitativo (es. delezioni o mutazioni puntiformi). Una ridotta quantità di mtDNA generalmente determina una sintesi insufficiente dei complessi della catena respiratoria codificati dal genoma mitocondriale (I, III, IV, e V) e, quindi, difetti del metabolismo energetico. Le MDS sono responsabili per circa il 50% di deficienze multiple della catena respiratoria che colpiscono i bambini (Sarzi *et al.*, 2007). Esse solitamente si manifestano durante il periodo neonatale o nella prima infanzia e hanno un esito fatale. Le MDS sono caratterizzate da una marcata tessuto-specificità; la deplezione del mtDNA può interessare sia singoli tessuti che una combinazione di organi

e tessuti. Tuttavia, i fenotipi clinici sono eterogenei, si possono sovrapporre ed espandere: per esempio una patologia prevalentemente miopatica si può generalizzare al cervello e al cuore se il paziente sopravvive ai sintomi iniziali (Suomalainen and Isohanni, 2010). Tipicamente le MDS si classificano secondo tre principali manifestazioni cliniche: muscolare, encefalomiopatica, epatocerebrale (Spinazzola *et al.*, 2008). La prima descrizione di MDS nell'uomo risale ai primi anni '90 (Moares *et al.*, 1991) e da allora il meccanismo molecolare alla base di questi disordini è stato chiarito solo in una piccola frazione dei casi fornendo un'importante strumento di diagnosi per i pazienti. Finora sono state individuate mutazioni in nove geni nucleari che causano MDS. La maggior parte delle proteine individuate nell'eziologia di queste patologie è coinvolta nel metabolismo dei dNTP: le due chinasi della sintesi di recupero mitocondriale TK2 e dGK, la subunità minore della RNR p53R2, l'enzima catabolico timidina fosforilasi TP e probabilmente le subunità beta e alfa dell'enzima succinil-CoA sintasi (SUCLA2 e SUCLG1). Anche difetti in proteine essenziali per la replicazione del mtDNA possono essere causa di MDS: la subunità catalitica della DNA polimerasi mitocondriale POLy e la DNA elicasi mitocondriale TWINKLE. Non è ancora nota la funzione del gene MPV17 associato a MDS.

I fenotipi dei difetti nei geni appena elencati si possono suddividere grossolanamente nelle tre categorie di MDS: TK2, SUCLA2 e p53R2 determinano le forme miopatica ed encefalo-miopatica, dGK, SUCLG1, POLy, TWINKLE e MPV17 sono responsabili della forma epato-cerebrale. Mutazioni nel gene TYMP, che codifica la timidina fosforilasi (TP), determinano una sindrome definita come miopatia encefalo-neurogastrointestinale mitocondriale (MNGIE) (Nishino *et al.*, 1999); questa patologia si distingue dalle altre MDS perché in aggiunta alla deplezione del mtDNA presenta delezioni e mutazioni puntiformi.

La tessuto-specificità delle MDS è un fenomeno molto importante che non ha ancora trovato spiegazione. Muscolo, fegato e cervello sono tessuti ad alta richiesta energetica, principalmente soddisfatta dalla fosforilazione ossidativa. L'attività della catena respiratoria mitocondriale richiede un'adeguata espressione delle proteine codificate nel genoma dell'organello, correlata alla quantità di mtDNA presente. Il tessuto

muscolare, quello epatico e, in misura minore, il cervello sono dotati di un elevato *turnover* del mtDNA rispetto ad altri tessuti che, in parte, potrebbe giustificare la manifestazione di deplezione osservata nelle MDS dovute a difetti negli enzimi del metabolismo dei dNTP. Sbilanciamenti delle quantità dei precursori nucleotidici interferiscono con la normale replicazione del mtDNA portando, in questi casi, a deplezione. Tuttavia, non è chiaro come mai difetti nella TK2 colpiscano prevalentemente il muscolo mentre mutazioni a carico della dGK siano deleterie per fegato e cervello.

Perché i mitocondri di muscolo sono più sensibili a fluttuazioni nel *pool* del dTTP? La sintesi *de novo* citosolica dipendente da p53R2 non sembra sufficiente per compensare difetti nelle vie di recupero mitocondriali in questo tessuto. Nel caso del dTTP questa mancata compensazione potrebbe essere dovuta al fatto che la via *de novo* dipende anche dall'attività di timidilato sintasi (TS) e dCMP deaminasi (Figura1, paragrafo 1.1). Tuttavia, il ruolo della sintesi *de novo* del dTTP nel muscolo non sembra di secondaria importanza come testimoniato dai casi di MDS legati a deficienza di p53R2 (paragrafo 1.7.1).

Nel muscolo scheletrico l'attività TK2 è solo il 10% di quella misurata in mitocondri isolati da altri tessuti (Saada *et al.*, 2002). Mettendo in relazione l'attività TK2 con la richiesta energetica del tessuto (stimata dal contenuto di mtDNA e dall'attività di COX), il muscolo scheletrico possiede i valori più bassi dei rapporti TK2/mtDNA e TK2/COX rispetto a fegato e cuore. Queste osservazioni dipingono una situazione nel tessuto muscolare caratterizzata da una bassa attività basale della TK2, associata ad un'elevata richiesta di proteine codificate dal genoma mitocondriale che potrebbe essere un fattore determinante per la tessuto-specificità.

Interessante è notare che mentre la capacità di sintesi di recupero delle pirimidine presenta tessuto-specificità, per le purine il quadro è differente: l'attività della dGK mostra minor variabilità e la maggior parte dei tessuti (tra i quali il fegato) è corredata di un'attività dGK elevata (Rylova *et al.*, 2007). In questo caso si potrebbe ipotizzare che nei pazienti con una dGK difettiva, il coinvolgimento preferenziale del fegato e del cervello sia dovuto al basso livello di espressione della dCK citosolica documentata in

questi tessuti. Infatti questa chinasi, espressa costitutivamente, fosforila anche la deossiguanosina e potrebbe compensare la condizione dGK. Il quadro complessivo si complica quando si considera la tessuto-specificità legata a difetti in p53R2. Risulta evidente che molti altri fattori potrebbero essere coinvolti nella determinazione della tessuto-specificità delle MDS e ulteriori studi saranno necessari per comprendere il pattern tessuto-specifico del metabolismo dei dNTP nell'uomo e in altri modelli animali (Wang, 2010).

1.7.1 MDS miopatiche: confronto tra pazienti mutanti per TK2 o p53R2 e i rispettivi modelli animali

Argomento di questa tesi è l'indagine dei meccanismi molecolari che diano ragione della tessuto-specificità osservata nelle forme miopatiche di MDS. Perciò, di seguito sarà presentato un excursus sulle informazioni attualmente disponibili in letteratura per mutazioni a carico di TK2 e p53R2.

L'attività della TK2 è diventata clinicamente rilevante in seguito all'identificazione di mutazioni autosomiche recessive nel gene della TK2 come causa frequente di MDS nell'uomo (Saada *et al.*, 2001). Nei primi casi descritti i pazienti sviluppavano una grave ipotonia muscolare a cui seguiva la perdita spontanea di attività, da queste osservazioni è nata la definizione di MDS miopatica. Casi riportati successivamente hanno esteso lo spettro clinico della patologia da miopatia pura a miopatia associata a rigidità della spina dorsale o al coinvolgimento del sistema nervoso centrale, inclusi perdita dell'udito, atrofia spino-muscolare e grave encefalomiopatia (Mancuso *et al.*, 2002; Oskoui *et al.*, 2006; Gotz *et al.*, 2008; Lesko *et al.*, 2010). Le MDS associate a disfunzioni della TK2 presentano una certa variabilità nell'età a cui si ha la prima manifestazione della malattia e nella lunghezza del periodo di sopravvivenza; generalmente il fenotipo insorge nei primi 2 anni di vita e progredisce rapidamente determinando, nella maggior parte dei casi, morte in età infantile.

In due casi, una grave deplezione della TK2 si è manifestata con insorgenza tardiva, lenta progressione della miopatia e lunga sopravvivenza (Barthélémy *et al.*, 2001; Vilà *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Vilà *et al.*, 2008) con fenotipi distinti e talvolta contrastanti. I due pazienti recavano due diverse coppie di mutazioni in eterozigosi T77M / R161K (Wang *et al.*, 2005) e R152G / 171del (Vilà *et al.*, 2003) (secondo le ultime annotazioni in GenPept le mutazioni sono T150M / R234K e R225G / K244del). Le condizioni dei pazienti deterioravano nel tempo; tuttavia, in entrambi i casi è stata osservata un'apparente selezione negativa delle fibre muscolari anormali che ha suggerito l'esistenza di meccanismi molecolari compensativi in grado di ristabilire le funzioni della catena respiratoria, oppure i livelli di mtDNA nelle fibre sopravvissute. In un caso, è stato postulato un adattamento del metabolismo dei dNTP (Vilà *et al.*, 2003). Altri meccanismi compensativi sono stati ipotizzati in fibroblasti con deficienza della TK2 in cui non si manifesta la deplezione del mtDNA (Villaroya *et al.*, 2009).

Al fine di ottenere una migliore caratterizzazione della patogenesi di mutazioni della TK2, nel 2008 Akman e collaboratori hanno prodotto un modello murino *knock-in* per la mutazione H126N. Questa mutazione è analoga alla mutazione umana H121N, riscontrata in omozigosi in un bambino con miopatia congenita deceduto a quattro anni di età (Saada *et al.*, 2001; Nevo *et al.*, 2002) e in eterozigosi in due gemelli con una miopatia a rapida progressione insorta nei primi 12-16 mesi di vita (Mancuso *et al.*, 2002). Rispetto al fenotipo specificamente muscolare dei pazienti con la mutazione H121N, i topi *knock-in*, in accordo con il modello *knock-out* (Zhou *et al.*, 2008; Bartesaghi *et al.*, 2010), manifestano un'encefalomiopatia a rapida progressione con una riduzione drastica dell'attività TK2, sbilanciamento del *pool* dei dNTP e deplezione del mtDNA in tutti i tessuti, ma in modo più marcato nel cervello. Difetti nel metabolismo della catena respiratoria interessano esclusivamente il sistema nervoso centrale; la morte sopraggiunge entro le prime 3 settimane di vita.

La gravità e la tessuto-specificità della MDS umana legata alla deficienza della TK2 sembra essere in relazione con l'attività residua della proteina mutata: riduzioni parziali di attività (14-45% del normale) producono

miopatia, mentre deplezioni più severe (inferiori al 10% del normale) causano encefalomiopatia (Dorado *et al.*, 2011). Nei topi l'attività della TK2 è bassa nel muscolo e alta nel cervello e nell'uomo si ritrova una condizione molto simile, con un'attività bassa nel muscolo e presumibilmente più alta nel cervello. Di conseguenza il cervello, al contrario del muscolo, potrebbe tollerare una deficienza moderata della TK2 (attività residua del 40%); ma quando la riduzione di attività supera il 90%, la patologia interessa muscolo e cervello. Dorado e collaboratori (Dorado *et al.*, 2011) hanno riscontrato che nel cervello e nel cuore di topi *wild-type* l'attività TK2 è costante nella seconda settimana di vita, mentre l'attività TK1 diminuisce drasticamente tra l'ottavo e il tredicesimo giorno dopo la nascita. La riduzione di attività della TK1, risultato della complessa regolazione descritta nel paragrafo 1.4.1, permette il manifestarsi della deficienza della TK2 nei topi *knock-in* H121N ed è correlata con la comparsa della deplezione di mtDNA nei tessuti colpiti.

Infine, ulteriori osservazioni su questi topi *knock-in* hanno suggerito l'esistenza di un meccanismo di compensazione trascrizionale nei tessuti non colpiti dalla patologia. Infatti, nel cuore dei topi TK2^{-/-}, tessuto non affetto dalla mutazione, alla tredicesima settimana di età si osserva un incremento dei trascritti mitocondriali rispetto al contenuto di mtDNA. Questa regolazione è stata attribuita alla riduzione dell'attività del soppressore trascrizionale mitocondriale MTERF3. In questo modo viene favorito il processo di trascrizione mitocondriale con il conseguente incremento dei suoi trascritti. Nel cuore questo sistema di compensazione si attiverebbe alla prima comparsa di deplezione del mtDNA, prevenendo in questo modo danni alla catena respiratoria. Nel cervello, dove la deplezione del mtDNA è più severa, la riduzione della soppressione di MTERF3 potrebbe essere insufficiente per compensare il difetto.

Ad oggi, l'ultimo gene che è stato associato alle MDS è *RRM2B*, che codifica per p53R2. I topi *Rrm2b*^{-/-} manifestano crescita ritardata, danni renali, atrofia muscolare e mortalità precoce, tra l'undicesima e la dodicesima settimana di vita (Kimura *et al.*, 2003). La patologia nei topi è stata attribuita ad un alterato contenuto di dNTP. Alla dodicesima settimana di età i topi *knock-out* presentano una marcata deplezione del mtDNA in reni, muscolo scheletrico e fegato (Bourdon *et al.*, 2007).

Nell'uomo, mutazioni di p53R2 sono state inizialmente individuate in uno *screening* condotto su numerosi pazienti che presentavano una severa deplezione del mtDNA nel muscolo scheletrico (1-2% rispetto ai controlli), ma non in individui con una deplezione meno marcata (10-30% del contenuto normale di mtDNA). Attualmente sono note ben 12 mutazioni diverse nel gene di p53R2, individuate in dieci pazienti, che determinano MDS nell'uomo, con manifestazioni clinicamente eterogenee. Il fenotipo è più grave rispetto ai topi e si manifesta generalmente con miopatia e acidosi lattica (Bornstein *et al.*, 2008), accompagnata in alcuni casi da danni neurologici e renali (Bourdon *et al.*, 2007); la morte sopraggiunge precocemente tra i 2 e i 4 mesi di vita. Due dei pazienti noti presentano un decorso più benigno della patologia, con un fenotipo prevalentemente encefalomiopatico che si è mantenuto stabile, senza peggioramenti, fino ai 2-3 anni di vita (Bornstein *et al.*, 2008). Nell'uomo il gene *RRM2B* è espresso in modo ubiquitario, con livelli elevati nel muscolo scheletrico. I trascritti della subunità omologa R2, invece, sono pressoché assenti in cuore, cervello e muscolo, suggerendo che questi tessuti dipendano esclusivamente da p53R2 per la sintesi *de novo*; mentre nei reni è presente una quantità modesta, ma significativa, di R2 (Zhou *et al.*, 2003). Nel topo l'espressione del gene *Rrm2b* misurata in diversi tessuti (Kimura *et al.*, 2003) risulta generalmente più bassa rispetto a quella osservata nell'uomo.

Lo studio dell'espressione delle altre subunità della RNR nei tessuti murini potrebbe fornire delle indicazioni utili per chiarire le differenze fenotipiche tra topo e uomo. Nei topi *Rrm2b*^{-/-} nonostante ci sia una sostanziale deplezione di mtDNA non si osservano difetti nella catena respiratoria. Si potrebbe ipotizzare che il contenuto soglia di mtDNA al di sotto del quale si manifestano difetti nella catena respiratoria sia diverso tra uomo e topo, oltre a differire in tessuti diversi di uno stesso organismo. Considerati collettivamente questi studi rivelano che mutazioni in *RRM2B* rappresentano una causa relativamente frequente di MDS, sottolineando il ruolo cruciale di p53R2 nel rifornire i dNTP necessari per la replicazione del mtDNA in tessuti post-mitotici, tuttavia i meccanismi molecolari sottostanti restano prevalentemente oscuri.

1.8 Miogenesi del muscolo scheletrico

La miogenesi del muscolo scheletrico è un avvenimento complesso che si verifica a partire dalla prima settimana dello sviluppo embrionale. Cellule mononucleate e altamente proliferanti, i mioblasti, originano da cellule mesenchimali totipotenti e migrano verso la destinazione finale per dare origine al muscolo scheletrico (miogenesi embrionale). I mioblasti progressivamente si fondono formando dei sincizi plurinucleati, detti miotubi, che differenziano ulteriormente acquisendo le caratteristiche morfo-funzionali delle cellule muscolari (Lawson and Purslaw, 2000; Carozzi *et al.*, 2000). Si tratta di un processo a più fasi che si verifica secondo una sequenza specifica: proliferazione, migrazione, riconoscimento, allineamento e fusione (Sandri and Carraro, 1999). Il programma di differenziamento muscolare è intimamente legato al ciclo cellulare. Raggiunta una densità cellulare critica i mioblasti escono dal ciclo cellulare e solo in fase G1/G0 inizia il cosiddetto differenziamento terminale, che dipende dall'espressione di fattori di trascrizione muscolo-specifici (Olson, 1992). Più tardi durante lo sviluppo fetale, dalle cellule progenitrici residenti si origina una popolazione di cellule che prendono posizione attorno alle miofibre. Queste cellule, denominate cellule satelliti, persistono nell'adulto sottoforma di cellule staminali quiescenti e sono localizzate in una nicchia situata tra la lamina basale e il sarcolemma delle fibre a cui sono associate. In questo stato particolare esse esibiscono limitata espressione genica e sintesi proteica, ma possono essere attivate in risposta a fattori di stress (quali esercizio fisico, traumi, malattie miodegenerative). In seguito all'attivazione, le cellule satelliti lasciano la loro nicchia, si dirigono al sito interessato e riprendono il ciclo cellulare dando origine a mioblasti che proseguiranno nel differenziamento muscolare per poi fondersi a miofibre pre-esistenti (miogenesi adulta, Figura 7) (Charge and Rudnicki, 2004). Mioblasti coltivati *in vitro* possono differenziare e dare origine a miotubi multinucleati, costituendo un modello cellulare per il processo di miogenesi adulta.

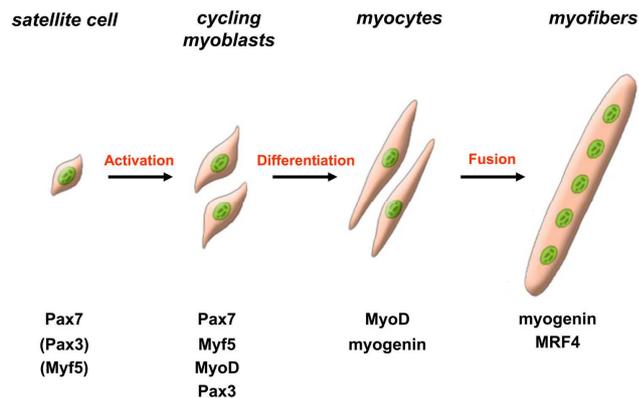


Figura 7. Rappresentazione schematica della miogenesi adulta. Cellule muscolari satelliti in stato quiescente possono attivarsi in conseguenza di stimoli provenienti dalle fibre a cui sono associate o dal micro-ambiente. La loro progenie proliferante, i mioblasti, esprimono i fattori di trascrizione Pax7 e Pax3 e i fattori di regolazione miogenica MyoD e Myf5. Una volta iniziato il processo di differenziamento i mioblasti smettono di ciclare e perdono l'espressione di Pax7, Pax3 e Myf5. I miociti in differenziamento, positivi per l'espressione della miogenina, si allineano e si fondono in fibre multinucleate (miofibre). MRF4 è successivamente richiesto per l'ipertrofia delle nuove fibre. (Le Grand and Rudnicki, 2007).

Esperimenti condotti con mioblasti in coltura hanno consentito l'identificazione di molteplici fattori genetici e ambientali che influiscono sul differenziamento miogenico. In particolare, le MRF (fattori di regolazione miogenica) sono proteine esclusivamente espresse nelle cellule miogeniche e durante il differenziamento, agiscono in modo sequenziale e alternato (Burattini *et al.*, 2004) (Figura 7). Esse appartengono ad una famiglia di fattori di trascrizione *basic-loop-helix* (bHLH), ad elevata correlazione genica, costituita da quattro membri: MyoD, Myf-5, MRF-4 e miogenina. I membri di questa famiglia riconoscono un motivo di sequenza nel DNA (E-box) nei loro target trascrizionali e sono sufficienti a trans-differenziare in muscolo scheletrico diversi tipi cellulari di derivazione mesodermica ed ectodermica (Davis *et al.*, 1987; Weintraub *et al.*, 1989; Olson, 1990; Miner and Wold, 1990; Ridgeway *et al.*, 2000). Esperimenti di *knock-out* hanno permesso di individuare molti bersagli genetici delle MRF, che sono prevalentemente proteine strutturali coinvolte nella contrazione delle fibre muscolari e, inoltre, hanno dimostrato la sovrapposizione funzionale delle MRF nel processo miogenico. Per esempio, la deficienza di Myf-5 o di MyoD nei topi non influisce sul differenziamento muscolare (Braun *et al.*, 1992; Rudnicki *et al.*, 1992) ma topi MyoD^{-/-}, Myf5^{-/-}, MRF4^{-/-} nascono senza tracce di muscolo scheletrico

e di mioblasti (Rudnicki *et al.*, 1993; Kassam-Duchossoy *et al.*, 2004). D'altra parte, una delezione in omozigosi di MRF4 e/o della miogenina non influisce sulla formazione dei mioblasti, ma colpisce il loro differenziamento in fibre muscolari (Hasty *et al.*, 1993; Patapoutian *et al.*, 1995).

Complessivamente questi dati suggeriscono una ridondanza funzionale di questi fattori sia nelle fasi precoci che in quelle tardive della miogenesi. Nel processo di differenziamento delle cellule satelliti MyoD è necessario per il potenziale differenziativo dei mioblasti, mentre Myf5 regola il loro tasso di proliferazione e la loro omeostasi (Le Grand and Rudnicki, 2007). L'espressione ectopica di MyoD, da sola, è sufficiente a forzare il completamento del programma miogenico in cellule non-muscolari (Tapscott *et al.*, 1988) e può indurre la trasformazione di cellule staminali multipotenti in cellule del muscolo scheletrico (Gianakopoulos' *et al.*, 2011 in stampa). Quest'ultimo processo avviene mediante l'attivazione di geni mesodermici pre-miogenici e la conseguente attivazione trascrizionale di miogenina e Myf5 che determina il proseguimento della miogenesi. I fattori di differenziamento MRF4 e miogenina non sono coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento di cellule satelliti ma l'induzione della miogenina è necessaria e sufficiente per la formazione di miotubi e fibre (Gayraud-Morel *et al.*, 2007).

1.8.1 Biogenesi e attività mitocondriale in relazione con il differenziamento miogenico

Durante lo sviluppo embrionale *in vivo*, il differenziamento muscolare è accompagnato da un aumento pronunciato del contenuto di mitocondri (Miki *et al.*, 1988), mentre nel muscolo adulto la biogenesi mitocondriale è indotta in corrispondenza di un aumento della richiesta energetica (stimolazione nervosa o esercizio fisico di resistenza). Nelle fibre muscolari si può distinguere un fenotipo ossidativo, strettamente correlato al contenuto di mitocondri: le fibre di tipo I, fibre lente, sono ricche in mitocondri e presentano un metabolismo ossidativo; le fibre di tipo II, fibre veloci, hanno pochi mitocondri e dipendono da un metabolismo glicolitico.

Le caratteristiche del muscolo scheletrico dipendono dalla percentuale di fibre di tipo I e di tipo II in esso contenute e muscoli maturi possono modificare il loro contenuto mitocondriale in relazione al livello di attività. Anche durante il differenziamento *in vitro* si assiste ad un incremento sostanziale degli enzimi mitocondriali che si accompagna ad un aumento del metabolismo ossidativo (Remels *et al.*, 2010). I mioblasti hanno infatti un metabolismo prevalentemente glicolitico, mentre i miotubi completamente differenziati producono energia mediante la fosforilazione ossidativa (Leary *et al.*, 1998). Sono stati descritti i profili temporali di espressione delle componenti che determinano il fenotipo ossidativo e la capacità mitocondriale durante l'intero programma miogenico in mioblasti di topo (Remels *et al.*, 2010). La funzionalità mitocondriale è essenziale per un corretto differenziamento e per la fusione dei mioblasti (Herzberg *et al.*, 1999) e difetti nel funzionamento mitocondriale sopprimono l'espressione della miogenina (Rochard *et al.*, 2000). In miotubi di topo differenziati *in vitro* oltre all'aumento della capacità respiratoria mitocondriale si verifica un incremento del contenuto di proteine della catena respiratoria, che rappresenta il sito di consumo dell'ossigeno. Inoltre, si osserva un aumento di attività della citrato sintasi (marcatore del volume mitocondriale) accompagnato da un'espansione del numero di copie del mtDNA e da un incremento di espressione delle diverse COX (Kim *et al.*, 1995; Remels *et al.*, 2010). L'espressione di PGC1 α , co-attivatore dei PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*), media la biogenesi mitocondriale e il concomitante sviluppo del metabolismo ossidativo durante la miogenesi. Esso agisce anche sull'espressione del fattore Tfam, principale regolatore della trascrizione e della replicazione del mtDNA (Gleyzer *et al.*, 2005). Un innalzamento dei livelli di Tfam determina un incremento del contenuto di mtDNA e della trascrizione mitocondriale con il conseguente aumento dell'attività COX e quindi della capacità ossidativa. Nel complesso questi dati confermano l'attivazione della biogenesi mitocondriale durante il differenziamento muscolare e suggeriscono la partecipazione attiva del mitocondrio alla regolazione di questo processo.

In che modo l'attività mitocondriale regola la miogenesi? Esperimenti condotti con mioblasti di quaglia hanno dimostrato che in presenza di

difetti nell'attività mitocondriale (trattamento con FCCP e Oligomicina) si blocca la capacità delle MRF di indurre il differenziamento e si osserva una riduzione dell'mRNA della miogenina e del contenuto proteico di MyoD (Rochard *et al.*, 2000). L'attività mitocondriale sembra quindi agire direttamente sul controllo trascrizionale della miogenina e sulla regolazione post-trascrizionale di MyoD. La ricerca dei meccanismi molecolari che permettono una connessione tra attività mitocondriale e miogenesi ha individuato un parziale coinvolgimento della via delle Raf/MEK/ MAP chinasi (Luo *et al.*, 1997). Ulteriori approfondimenti sulla comunicazione tra mitocondrio e nucleo hanno evidenziato che l'attività mitocondriale agisce direttamente o indirettamente sulla regolazione di un gruppo di geni nucleari importanti per il programma di differenziamento. Geni nucleari la cui espressione è sensibile all'attività mitocondriale sono stati caratterizzati in lievito (Poyton and McEwen, 1996) e in cellule di pollo prive di mtDNA (ρ^0) (Wang and Morais, 1997). La prima correlazione tra attività mitocondriale e differenziamento è stata individuata in esperimenti con mioblasti di topo C2C12: riducendo il contenuto di mtDNA in queste cellule si verifica un innalzamento della concentrazione citosolica di calcio seguita dall'attivazione o inibizione di importanti fattori trascrizionali (Biswas *et al.*, 1999).

Ulteriori studi permetteranno di approfondire il coinvolgimento dell'attività mitocondriale nella regolazione dell'espressione di geni nucleari e di comprendere la segnalazione retrograda mitocondrio-nucleo che sta alla base dell'influenza dell'organello sul differenziamento muscolare.

2. SCOPO DELLA TESI

Con il differenziamento, e quindi con l'uscita delle cellule dal ciclo cellulare, la richiesta di precursori del DNA è limitata principalmente alla replicazione del genoma mitocondriale, una piccola percentuale rispetto al DNA totale e, in concomitanza a questa riduzione dei consumi, si verifica una modificazione nell'assetto delle vie biosintetiche dei dNTP: la subunità R2 dell'enzima ribonucleotide reduttasi e la timidina chinasi citosolica TK1 sono infatti regolate con il ciclo cellulare e al di fuori della fase S sono virtualmente assenti. La sintesi *de novo* si riduce ad un 2% di quella presente in condizioni di proliferazione e dipende da R1/p53R2, mentre la timidina chinasi mitocondriale, TK2, è l'unico enzima responsabile della sintesi di recupero del dTTP. Il risultato di questa riorganizzazione comporta un ridimensionamento dei *pool* nucleotidici citoplasmatici e mitocondriali, che si riducono entrambi di circa 10 volte in cellule di mammifero.

In questo contesto i ruoli della TK2 e di p53R2 assumono notevole rilevanza e ciò è dimostrato dall'esistenza di patologie correlate a mutazioni in questi enzimi, note come sindromi da deplezione del mtDNA (MDS), che colpiscono prevalentemente il muscolo e dipendono dallo sbilanciamento dei *pool* di dNTP.

Lo scopo del mio lavoro di dottorato è quello di chiarire le basi molecolari che determinano la tessuto-specificità nelle MDS miopatiche dovute a mutazioni della TK2 e di p53R2.

In particolare, ho studiato il metabolismo del dTTP in un tipo cellulare non affetto da queste mutazioni, i fibroblasti di pelle, e in un tipo cellulare bersaglio di questa forma di MDS, i mioblasti. Per fare ciò ho analizzato fibroblasti quiescenti provenienti da pazienti affetti da MDS miopatica dove la TK2 è mutata (Frangini *et al.*, 2009) e cellule muscolari di topo differenziate in cui ho silenziato la TK2 o p53R2 mediante *RNA interference*. In entrambi i casi ho studiato condizioni cellulari in cui l'enzima mutante o silenziato è l'unico a svolgere la sua funzione nella cellula.

Nel confronto di questi due modelli cellulari abbiamo mirato all'individuazione di elementi divergenti che potessero costituire punti di fragilità del muscolo rispetto a una deficienza genetica delle due proteine. Il lavoro sulle cellule muscolari ha richiesto la messa a punto di nuovi protocolli sperimentali ed è tuttora in corso.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Linee cellulari e condizioni di crescita

Sono state impiegate cinque linee cellulari di mammifero diverse:

Fibroblasti di pelle: le linee mutanti TK2 derivano da due pazienti entrambi eterozigoti per due coppie di mutazioni diverse nel gene della TK2, R152G/ K171del (**Pa**) e T77M/ R161K (**Pb**). Le linee provengono dal laboratorio di M. R. Vilà (*Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain*) ottenute a partire da campioni di biopsie di pelle dei pazienti all'età di 14 anni (Pa) e 10 anni (Pb). I controlli **Ca** e **Cb** erano già presenti nel nostro laboratorio, provengono da donatori sani di età corrispondente ai pazienti. Crescono in terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) ad alto glucosio (4500 mg/l), sodio piruvato 110 mg/L, HEPES buffer 5 g/l, pH 7.4, amminoacidi non essenziali e siero fetale bovino (FBS) inattivato al 10%.

C2C12: linea stabilizzata di mioblasti di topo acquistata *dall'American Type Culture Collection* (ATCC). Crescono in DMEM ad alto glucosio (4500 mg/l), sodio piruvato 110 mg/l, glutamina 4mM e FBS inattivato al 10%.

Tutte le linee cellulari crescono in monostrato su piastre Petri o fiasche di plastica monouso e sterili. Sono mantenute in incubatore a 37°C con aria satura di vapore acqueo e al 5% di CO₂. Tutti i terreni sono addizionati di antibiotici (streptomicina 50 µg/ml e penicillina 60 µg/ml). Periodicamente si effettua il controllo per l'assenza di contaminazioni da micoplasmi mediante il kit Venor Gem (Minerva Biolabs).

Quando raggiungono la confluenza le cellule vengono lavate in una soluzione di versene (PBS + 0.02% di EDTA), staccate mediante tripsinizzazione (tripsina 0.25% in PBS) e risospese in terreno di coltura, per essere poi trapiantate. La conta cellulare avviene a mezzo di un Coulter Counter (Coulter Z1, Beckman Coulter) e la distribuzione lungo il ciclo cellulare è determinata mediante analisi al Citofluorimetro. La linea C2C12 viene mantenuta su plastica trattata con gelatina e a densità di

coltura inferiori rispetto ai fibroblasti. Generalmente vengono trapiantate a un livello di confluenza che non supera il 60% per evitare che perdano il potenziale differenziativo.

3.1.1 Cellule quiescenti e differenziate

La quiescenza nei fibroblasti si ottiene in colture confluenti, sostituendo il terreno di crescita con terreno allo 0.1% di FBS dializzato e mantenendo le cellule in queste condizioni per almeno 10 giorni prima di eseguire gli esperimenti.

Il differenziamento delle C2C12 viene indotto in colture al 70% di confluenza, sostituendo il terreno di crescita con terreno al 2% di siero di cavallo (terreno di differenziamento) e rinnovando il terreno quotidianamente per tutto il periodo di differenziamento, che dura al massimo 8-10 giorni.

3.1.2 Purificazione della frazione di miotubi da una coltura differenziata di cellule C2C12

Colture differenziate vengono lavate delicatamente in versene e staccate con tripsina diluita (0.05% in versene). Le cellule sono poi risospese, sempre delicatamente, in terreno di crescita e trasferite in una nuova piastra che viene posta in incubatore per 30 minuti. Al termine dell'incubazione una buona parte di mioblasti si ritrova adesa alla piastra mentre i miotubi rimangono sospesi. Ripetendo l'incubazione di 30 minuti, dopo aver trasferito la sospensione cellulare in una nuova piastra di coltura, si ottiene un'ulteriore separazione fisica tra mioblasti e miotubi. La sospensione cellulare che ne risulta è notevolmente arricchita di miotubi e dopo 10 minuti di centrifuga a 300 g si ottiene un pellet che può essere utilizzato per analisi successive.

3.2 Silenziamento genico mediante *RNA interference* con siRNA.

Il silenziamento genico della TK2 e di p53R2 nelle C2C12 è stato ottenuto mediante trasfezione transiente con siRNA. E' stato messo a punto un protocollo che consente di silenziare i mioblasti ancora proliferanti mantenendo poi il silenziamento per tutto il periodo di differenziamento. Sono stati utilizzati degli *siRNA Stealth* (Stealth siRNA™, Invitrogen) che consistono in sequenze chimicamente modificate di dsRNA specifiche per il gene di interesse e ottimizzate per il silenziamento in cellule di mammifero. Per i controlli negativi sono stati utilizzati siRNA forniti dalla ditta costituiti da dsRNA disegnati per avere un rischio minimo di omologia con altre sequenze di vertebrati e un contenuto in GC paragonabile a quello delle sequenze silenzianti. Prima di eseguire gli esperimenti sono state testate tre diverse sequenze per ciascun gene silenziato per scegliere quelle che producevano un silenziamento più efficiente. In Tabella 3 sono riportate le sequenze utilizzate in questo lavoro per silenziare la TK2 e p53R2.

Stealth siRNA	Sequenza
TK2MSS250034	5'-GAUGUCUCUGUUGAUCUGAUAGUUU-3' 5'-AAACUAUCAGAUCAACAGAGACAUC-3'
RRM2BMSS283984	5'-GGAGAACUUGGAUUCUCAAGAUUU-3' 5'-AAAUCUUUGAGAAAUCCAAGUUCUCC-3'

Tabella 3 . Sequenze degli siRNA a doppio filamento per il silenziamento della TK2 e di p53R2 (*RRM2B*).

Il protocollo di silenziamento prevede la semina di $0.75 \cdot 10^6$ cellule in piastre Petri da 78.5 cm^2 , in terreno di crescita al 10% FBS privo di antibiotici(-Ab). Il giorno seguente si procede con la trasfezione usando una concentrazione finale 30 nM di siRNA per la TK2 e 20 nM per p53R2. Durante la trasfezione gli siRNA vengono prima complessati con l'agente trasfettante (RNAiMax) in terreno Opti-MEM (Gibco) e successivamente

aggiunti al terreno di coltura, seguendo le modalità indicate dalla ditta fornitrice. La concentrazione finale di RNAiMAX utilizzata per silenziare la TK2 è 2 µl/ml, mentre per p53R2 è 1.2 µl/ml. Trascorse 48 ore si ripete la trasfezione in terreno di differenziamento (2% siero di cavallo) utilizzando la stessa procedura. Trascorse altre 48 ore il terreno contenente gli siRNA viene diluito 1:1 con terreno di differenziamento fresco, in questo modo si dimezza la concentrazione di siRNA presente. Dopo 24 ore si procede con la sostituzione completa del terreno di coltura che verrà poi ripetuta quotidianamente fino al giorno dell'esperimento. Il grado di silenziamento ottenuto viene poi stimato valutando il livello di mRNA di ciascun gene di interesse mediante *realtime* relativa.

3.3 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e *real-time* PCR relativa.

Per estrarre l'RNA viene rimosso accuratamente il terreno di coltura e si omogeneizzano le cellule con Trizol (Invitrogen). Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, si aggiungono 200 µl di cloroformio per ml di Trizol e si agita vigorosamente per 15 secondi. Centrifugando a 4°C per 15 minuti a 12 000 g la soluzione si separa in tre fasi e l'RNA viene recuperato prelevando la fase acquosa sovrastante. Si aggiungono 500 µl di isopropanolo e si centrifuga nuovamente a 12 000 g per 10 minuti, in questo modo l'RNA precipita. Il *pellet* viene poi lavato con una soluzione di etanolo 75%, precipitato per centrifugazione (5 minuti a 7 500 g) e sciolto in acqua sterile priva di RNasi (Gibco), scaldato 10 minuti a 55°C e conservato a - 80°C.

L'integrità dell'RNA è stata verificata mediante una corsa elettroforetica in condizioni denaturanti in gel all'1.5% di agarosio con formaldeide 2.2 M. Il tampone di elettroforesi è così costituito: 20mM MOPS pH 7.0, 2mM sodio acetato, 1mM EDTA pH 8.0.

Dopo la quantificazione al Nanodrop (Thermo Scientific) 3 µg di RNA sono stati sciolti in H₂O (Gibco) in un volume totale di 9 µl per procedere con la retrotrascrizione. Dopo un'incubazione di 5 minuti a 65°C con dNTP 10 mM e *primer Random Hexamers* (Applied Biosystems) si aggiungono il

tampone di reazione 5x e l'inibitore di RNasi (Applied Biosystems). Si procede con un'incubazione di 2 minuti a 25°C prima di aggiungere la trascrittasi inversa *SuperScript II* (Invitrogen). A questo punto si fa avvenire la reazione di retrotrascrizione in un termociclatore *GeneAmp PCR system 2700* (Applied Biosystems) nelle seguenti condizioni: 10 minuti a 25°C, 60 minuti a 42°C, 15 minuti a 70°C. A reazione avvenuta il cDNA viene diluito in H₂O (Gibco) alla concentrazione finale di 100 ng/ µl e conservato a -20°C. Una PCR di prova permette in seguito di verificare la riuscita della retrotrascrizione e la purezza del cDNA. In un volume finale di 25 µl della soluzione di reazione (tampone 1x per Taq DNA polimerasi, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM *primers* di un gene *housekeeping*, 0.6 U Taq polimerasi (GE Healthcare), H₂O) si aggiungono 3 µl di cDNA. Le condizioni di reazione al termociclatore sono: 5 minuti a 95°C, (30 secondi a 95°C, 1 minuto a 60°C) x 40 volte, 4°C all'infinito. I prodotti di reazione sono poi verificati mediante elettroforesi in gel all'1% di agarosio.

Il contenuto di mRNA dei geni di interesse viene valutato mediante *realtime* PCR relativa utilizzando come stampo il cDNA preparato in precedenza.

Nella reazione vengono utilizzate separatamente due coppie di *primer*: una per il gene di interesse e una per il gene *housekeeping* scelto per normalizzare i valori ottenuti. Per gli esperimenti condotti nelle C2C12 è stato utilizzato il gene *housekeeping Rplp0* (come suggerito da Stern-Straeter *et al.*, 2009) mentre per le analisi nei fibroblasti di pelle le condizioni utilizzate sono descritte in dettaglio in Frangini *et al.*, 2009. Le sequenze dei *primer* utilizzati per la linea C2C12 di topo sono riportate in Tabella 4. Per i geni *Rplp0* e *Mhy3* (miosina embrionale) sono stati utilizzati *Quantitect primer assay kit* (Qiagen).

La *real-time* PCR viene eseguita in piastre da 96 pozzetti in un volume di 12 µl costituito da cDNA, *primer* 0.2 µM e la miscela di reazione *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Ogni reazione si effettua con diverse quantità di cDNA in triplice copia per valutare il mantenimento dell'efficienza di amplificazione. Si utilizza lo strumento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) impostato con i seguenti parametri: 10 minuti 95°C, (25 secondi 95°C) x 37 cicli, 1 minuto

60°C, 3 minuti a 72°C, 15 secondi a 95°C, 1 minuto a 65°C, 15 secondi a 95°C, mantenimento a 4°C.

Dopo aver analizzato le curve di amplificazione con il *7500 System Software* e aver fissato la soglia di fluorescenza nell'intervallo di linearità, si costruisce un grafico ponendo il Log della quantità di cDNA in relazione ai Ct (ciclo *threshold*, soglia) ottenuti. Per ciascun campione si ottiene una retta il cui coefficiente angolare (m) serve a 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 (Pfaffl, 2001) viene calcolato il livello di mRNA del gene di interesse in relazione al campione utilizzato come controllo, per esempio cellule quiescenti (differenziate) rispetto a cellule proliferanti oppure campioni silenziati rispetto a controlli. Tutti i valori sono normalizzati per il contenuto di mRNA del gene *housekeeping* di ciascun campione.

Gene	Primer forward	Primer reverse
<i>Rrm1</i>(R1)	CCCAATGAGTGTCTGGTCT	GTTCTGCTGGTTGCTCTTCC
<i>Rrm2</i> (R2)	CCTACTAACCCCAGCGTTGA	GTTTCAGAGCTTCCCAGTGC
<i>Rrm2b</i> (p53R2)	ACACACGCACACACCACCTGTA	TGACAAATGGGAAGCACAGAGC
<i>Tk1</i>	ACAAGTGCCTGGTCATCAAGTA	ACAATTACTGTCTTGCCCTCGT
<i>Tk2</i>	TGTCCTTGTGTGAGAGAGCAGT	CTCCAGGGTATACGGTCATCAT
<i>Trp53</i> (p53)	GTACCTTATGAGCCACCCGA	CTTCTGTACGGCGGTCTCC
<i>Tyms</i> (TS)	ATGTGGTGAATGGGGAAGTGT	GAGCTTTGGGAAAGGTCTTGG
<i>Dctd</i> (dCMP deaminasi)	GAAGCAAGGACCCAAGTTTCC	CCTTCACATCAGCCGAGTTCT
<i>Myog</i> (miogenina)	CCAACCCAGGAGATCATTG	ACCCAGCCTGACAGACAATC

Tabella 4. Sequenze di alcuni *primer* utilizzati per la *real-time* PCR nelle cellule di topo.

3.4 Estrazione del DNA genomico e quantificazione del mtDNA mediante *real-time* PCR quantitativa (TaqMan)

Il DNA genomico viene estratto mediante il *Puregene Core kit B* (Qiagen) e sciolto in TrisHCl 10 mM pH 7.5. Il DNA viene poi quantificato al Nanodrop (Thermo Scientific) e la sua integrità viene verificata mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1%. Per la *real-time* PCR viene applicato il sistema TaqMan che prevede l'uso di una sonda fluorigenica che consente il rilevamento di uno specifico prodotto di PCR mentre questo si accumula durante i cicli di PCR. Le sonde TaqMan sono marcate al 5' da un fluoroforo detto *reporter* e all'estremità 3' da uno detto *quencher* capaci di emettere fluorescenza 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 perché il *quencher* inibisca l'emissione del *reporter* per effetto del fenomeno FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Durante la PCR, il legame dei *primer* al DNA e l'estensione del filamento nascente in direzione 5'-3' ad opera della polimerasi determinano il rilascio del *reporter* che allontanatosi dal *quencher* emette fluorescenza 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 (β -actina) e per il mtDNA (COX1). La curva standard viene allestita con diverse quantità di ciascun vettore calcolate per ottenere l'espressione di un numero crescente e determinato di molecole di β -actina e COX1 in un rapporto 1:100. Per la rilevazione del mtDNA si utilizzano *primer* per il gene COX1 in associazione alla sonda per lo stesso gene *mtDNA TaqMan probe* (Applied Biosystems) coniugata al fluoroforo 6FAM (Tabella 5), mentre per l'amplificazione del gene nucleare β -actina sia i *primer* che la sonda coniugata al fluoroforo VIC sono contenuti nella soluzione PDARs (*pre-developed assay reagent*) ACTB (Applied Biosystems). La reazione avviene in piastre da 96 pozzetti contenenti ciascuno un volume totale di 20 μ l costituiti da: 2 μ l di DNA genomico (10 ng/ μ l) o plasmidico (a diverse concentrazioni per la retta standard), 1x *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1x PDARs

ACTB, 112 nM *primer* per il gene mitocondriale COX1 e 125 nM sonda per il gene COX1 (*mtDNA TaqMan probe*). Questo protocollo è stato ottimizzato per la quantificazione del mtDNA in estratti genomici di topo.

Nome	Sequenza
Primer COX1 forward	5'-TGCTAGCCGCAGGCATTACT-3'
Primer COX1 reverse	5'-CGGGATCAAAGAAAGTTGTGTTT-3'
mtDNA TaqMan probe	6FAM-5'-TACTACTAACAGACCGCAACC-3'-MGB

Tabella 5. Sequenze dei *primer* e della sonda per il riconoscimento del gene mitocondriale COX1 (subunità 1 della citocromo c ossidasi 1). MGB, minor groove binder (non-fluorescent quencher); 6FAM, 6-carboxy-fluorescein.

La PCR viene eseguita utilizzando il *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) impostato con i seguenti parametri: 2 minuti a 50°C, 10 minuti a 95°C, e (15 secondi a 95°C, 1 minuto a 60°C) x 40 volte. I risultati vengono analizzati tramite il *7500 System Software* che fornisce il numero di molecole COX1 e β -actina presenti in ciascun campione analizzato, calcolati in base alla curva standard. Per determinare il numero di molecole di mtDNA in ciascuna cellula è sufficiente calcolare il rapporto tra le quantità ottenute per COX1 e β -actina, moltiplicato per 2 (perché il gene nucleare è presente in duplice copia).

3.5 Estratti cellulari per saggi enzimatici

Per estrarre le proteine cellulari totali si rimuove il terreno di coltura e si lava il monostrato cellulare tre volte con NaCl 0.9%; quindi, si aggiunge una quantità di tampone di lisi (Tris HCl pH 7.5 10 mM, TritonX 0.5%, EDTA 2 mM, DTT 1 mM e NaCl 0.2 M, inibitore di proteasi (Roche)) proporzionale alla densità cellulare. L'NaCl del tampone di lisi si aggiunge in un secondo momento; infatti, dopo aver staccato le cellule con una spatola, si raccolgono in una *ependorf* e si agitano al *vortex* per 50 secondi per rompere le membrane cellulari. Per facilitare l'entrata in soluzione dell'estratto, si aggiunge l'NaCl e si passa di nuovo al *vortex* per 15 secondi. Il lisato cellulare viene centrifugato a 19000 g per 10 minuti a

4°C. Questo passaggio consente di separare i residui di membrana nella *pellet* e le proteine nel surnatante. Quest'ultimo viene trasferito in nuove *ependorf* e conservato a -80°C. La concentrazione delle proteine negli estratti così ottenuti viene determinata mediante il saggio colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976) secondo una retta di taratura allestita con quantità note di BSA (albumina di siero bovino).

3.6 Saggi enzimatici

Tutti i saggi sono stati eseguiti utilizzando due quantità diverse di ogni campione per verificare il mantenimento della proporzionalità.

3.6.1 Saggio dell'attività timidina chinasi

L'attività timidina chinasi è stata saggiata secondo il protocollo descritto in Franzolin *et al.* (2006) con alcune modifiche. I saggi sono stati effettuati impiegando come substrato 0.2 µM [³H]BVDU ((E)-5-(2-bromovinil)-dUrd), un analogo della timidina specifico per la TK2 (Moravek Biochemicals and Radiochemicals, Brea, CA, USA), in presenza di 50 µM 5-Bromouracile (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) per inibire l'azione della timidina fosforilasi che altrimenti interferirebbe con il saggio. In alternativa è stato utilizzato come substrato 1 µM [³H]Timidina (Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) in assenza o presenza di 100 µM KIN109, un inibitore specifico della TK2.

Aliquote variabili di proteine, calibrate per ogni linea cellulare, vengono risospese in *ependorf* in tampone di diluizione (1mg/ml BSA, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 2 mM DTT, 5 mM ATP e H₂O) in un volume totale di 20 µl. Il tutto eseguito in ghiaccio. Si aggiungono 20 µl di miscela di reazione 2X (100 mM Tris HCl, 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 10 mM NaF, 4 mM DTT, 0.4 µM [³H]BVDU oppure 2 µM [³H]Timidina e H₂O). La reazione avviene in bagnetto termico a 37°C per 60 minuti. Trascorso questo tempo di incubazione, l'azione dell'enzima viene bloccata bollendo le *ependorf* per un minuto; dopodiché si trasferisce tutto in ghiaccio. Da

ogni campione si prelevano 30 μ l del volume totale e si depositano su filtri a scambio ionico DE81 (Whatmann), in grado di legare e trattenere le cariche negative dei nucleotidi, che vengono lasciati ad asciugare. Seguono tre lavaggi dei filtri in abbondante ammonio formato 5 mM, in modo tale da eliminare il substrato radioattivo inutilizzato. Al termine dei lavaggi, ciascun filtrino viene adagiato sul fondo di una *via* per scintillatore e posto in agitazione per almeno 30 minuti con 2 ml di 0.1 M HCl, 0.2 M NaCl. Durante questa fase, detta di eluizione, i fosfati trattenuti nel filtrino sono rilasciati in soluzione e possono così venire quantificati allo scintillatore (Tri-CARB 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 proteina).

Nel paragrafo 4.1.5, l'attività specifica della TK2 è stata espressa in pmol/min/ 10^6 cellule per poterla confrontare direttamente con i valori misurati *in situ* negli esperimenti di *pulse-chase*. Per fare la conversione tra mg di proteine e numero di cellule sono stati calcolati i mg totali di proteine estratte (moltiplicando il volume di estrazione per la concentrazione proteica dell'estratto) e sono stati divisi per il numero di cellule totali da cui era stato preparato l'estratto. Dividendo il valore di attività (pmol/min/mg proteine) per il valore ottenuto dalla conversione (mg proteine/ 10^6 cellule), si ottiene l'attività enzimatica espressa in pmol/min/ 10^6 cellule.

3.6.2 Saggio della timidina fosforilasi e delle deossinucleotidasi

L'attività della TP è stata misurata apportando alcune modifiche al protocollo riportato in Martì *et al.*, (2004). Per ciascun campione si allestiscono due reazioni: due diverse quantità di proteine (6-12 μ g) vengono incubate in 20 μ l di tampone di reazione (0.1 M Tris-Arsenato pH 6.5, 10 mM Timidina) e parallelamente vengono preparate due reazioni uguali ma senza timidina, che fungono da *background*. Segue un'incubazione di un'ora a 37°C, trascorsa la quale la reazione viene bloccata con 0.1 ml di NaOH 0.3 M. Le reazioni di *background* vengono addizionate con 10 mM Timidina subito dopo l'inattivazione della reazione

e poi si misura l'assorbimento a 300 nm da cui si ricava l'attività specifica della TP espressa in nmoli/ h/ mg.

Il saggio dell'attività deossinucleotidasica totale (mitocondriale, mdN e citosolica, cdN) misura la defosforilazione di 5 mM [³H]dUMP in 0.25 mM buffer acetato pH 5.5, 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 30 mM KCl e 0.2 mg/ml BSA. La reazione avviene in un volume totale di 20 µl con un'incubazione di 30 minuti a 37°C. Trascorso il tempo di incubazione si blocca la reazione con l'aggiunta di 1 ml di acido acetico freddo 50 mM e la soluzione viene fatta passare attraverso una colonna AG1-X2 che viene poi lavata con altri 2 ml di acido acetico 50 mM. L'eluato e i lavaggi vengono raccolti in un'unica *vial* e si determina la radioattività allo scintillatore (Tri-CARB 2800 TR, Perkin Elmer) dopo l'aggiunta di 14 ml di liquido di scintillazione per fluidi *Ready Safe* (Beckman Coulter).

3.7 Western blot

L'estratto proteico è stato preparato a partire da 2*10⁶ cellule lavate due volte in PBS freddo che vengono sedimentate centrifugando 10 minuti a 500 g, 4°C e risospese in 200 µl di tampone di lisi (PBS, 1.5% SDS e inibitore di proteasi per cellule di mammifero (Sigma)) per essere lisate attraverso il passaggio ripetuto in un ago 30G x 5/16". Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio il lisato viene centrifugato 20 minuti a 19000 g, 4°C 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).

Per l'elettroforesi sono stati utilizzati gel a diverse concentrazioni di poliaccrilamide in base alle dimensioni delle proteine che si volevano rilevare: 12% per R2 e p53R2, 9% per p53, 6% per R1. Per gli estratti dei fibroblasti umani sono state utilizzate le seguenti quantità: 10-20 µg di proteine per rilevare il segnale di R1 e 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 subunità della ribonucleotide reduttasi e per la β-actina sono

riportati in letteratura (Pontarin *et al.*, 2007) mentre per p53 è stato utilizzato un anticorpo monoclonale di topo (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1/1200. Per gli estratti di topo sono state utilizzate le seguenti quantità: 5 µg di estratto di mioblasti e 50 µg di estratto di miotubi per R2, 26 µg per R1, 20 µg per p53R2 e 1 µg per GAPDH (gliceraldeide-6-fosfato deidrogenasi) come standard interno per la normalizzazione dei segnali. Per R1 è stato utilizzato un anticorpo monoclonale di topo (Millipore) diluito 1/500; per R2 un anticorpo monoclonale di ratto (Engström and Rozell, 1988) diluito 1/40 000; per p53R2 è stato impiegato un anticorpo policlonale di coniglio (Abcam) diluito 1/1000; per GAPDH un anticorpo monoclonale di topo diluito 1/1000 (CHEMICON). 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*.

3.8 Marcatura isotopica delle cellule

I fibroblasti quiescenti mutanti e controlli sono stati marcati con timidina triziata al fine di valutare l'incorporazione di questo precursore nel *pool* del dTTP. Per effettuare la marcatura si rimuove il terreno di coltura sostituendolo con terreno fresco contenente 0.1% FBS dializzato. Le cellule vengono poi poste in incubatore ad equilibrare per circa 2 ore prima di procedere. L'aggiunta di idrossiurea (HU, Sigma) inibitore della RNR, 5-Bromo Uracile (5BU), inibitore della TP e di BVDU, inibitore della TK2 viene eventualmente effettuata durante questo periodo. Trascorse le due ore in una stanza a 37°C viene aggiunta [³H]Timidina (20 000 cpm/pmol, Perkin Elmer) al terreno di coltura, alla concentrazione desiderata. Si procede quindi con i tempi di incubazione voluti in termostato a 37°C e poi si effettua l'estrazione dei *pool* di deossinucleotidi. Negli esperimenti di *pulse-chase* le cellule sono state marcate con 100 nM [³H]Timidina per 90 minuti (*pulse*). Trascorsi 60 minuti di *pulse* il terreno è stato rimosso e sostituito con terreno fresco allo 0.1% di siero con o senza

100 nM timidina non radioattiva (*chase*). Le cellule sono state quindi riposte in incubatore per 5, 15 e 30 minuti prima di estrarre il *pool* totale.

3.9 Estrazione dei *pool* dei nucleotidi

L'estrazione dei *pool* cellulari totali dei nucleotidi si effettua in una stanza a 4°C rimuovendo il terreno di coltura e lavando le cellule quattro volte con PBS freddo. Dopodiché si aggiunge metanolo 60% e si lascia incubare per 1 ora, in questo modo i *pool* totali vengono rilasciati in soluzione. Il *pool* disciolto in metanolo viene quindi raccolto e bollito per 3 minuti prima di essere evaporato e sciolto in acqua. I campioni si conservano a -80°C. Quando si estrae il *pool* totale dal *pellet* di mitotubi purificati, trascorsa l'incubazione in metanolo 60%, si effettua una centrifugazione di 10 minuti a 19 000 g. Il *pellet* che risulta contiene tutti i residui cellulari da cui si estraggono le macromolecole totali con NaOH 0.3 M. La lettura di assorbanza (Abs) a 260 nm di questa soluzione viene poi utilizzata per la normalizzazione dei *pool*.

La separazione dei *pool* citosolici e mitocondriali avviene mediante centrifugazione differenziale. Tutte le operazioni sono svolte a 4°C. Come per l'estrazione dei *pool* totali si procede con la rimozione del terreno di coltura e con i lavaggi in PBS. Il monostrato cellulare viene staccato dal supporto con l'ausilio di una spatola in tampone di estrazione 1x (0.21 M mannitolo, 0.07 M saccarosio, 0.2 M EGTA, 10 mM TrisHCl pH7.5) contenente 0.5% BSA e poi viene effettuata la lisi con diversi passaggi attraverso un ago di siringa (30G x ½" per i fibroblasti). Con una centrifugazione di 10 minuti a 19 000 g si separa il citosol (surnatante) da mitocondri e nuclei (*pellet*). Il *pellet* viene lavato in tampone di estrazione, sedimentato nuovamente e risospeso in 1 ml di metanolo 60%. Il *pool* mitocondriale si estrae quindi con un'ora di incubazione a -20°C. Al termine dell'estrazione viene bollito 3 minuti e centrifugato. Il surnatante così ottenuto contiene il *pool* di nucleotidi che verrà evaporato e sciolto in acqua. Il *pool* citosolico viene invece estratto aggiungendo a 300 µl di surnatante, ottenuto dalla prima separazione, 600 µl di metanolo assoluto e incubando per 1 ora a -20°C. Successivamente viene bollito per 3 minuti

e posto a -20°C per una seconda incubazione *overnight*. Il giorno seguente si procede con la centrifugazione e l'evaporazione del surnatante contenente i nucleotidi. Sciolto in acqua, il *pool* citosolico viene conservato a -80°C.

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

Per determinare le dimensioni dei *pool* dei quattro dNTP si effettua un saggio enzimatico modificato sul modello descritto da Sherman and Fyfe (1989). Questo sistema permette di valutare la quantità di un dNTP presente in un estratto cellulare usando oligonucleotidi sintetici e un enzima con attività di DNA polimerasi. 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 utilizzando un dNTP marcato isotopicamente fornito in eccesso e il dNTP che si desidera quantificare all'interno del campione. La quantificazione si effettua mediante una curva standard ottenuta aggiungendo alla reazione quantità note del dNTP che dovrà essere misurato (da 0 a 8 pmoli). In base alle sequenze degli oligonucleotidi il rapporto tra dNTP marcato e dNTP non marcato è pari a 2 per il dTTP e pari a 3 per dCTP, dGTP e dATP. Il dNTP marcato è ³²P-dATP per la quantificazione di dTTP, dCTP, dGTP e ³²P-dTTP per quella del dATP. Per la determinazione dei *pool* nei fibroblasti di pelle è stato utilizzato il protocollo descritto in Frangini *et al.* (2009). Nel 2010 un lavoro condotto nel nostro laboratorio ha introdotto dei miglioramenti nel saggio (Ferraro *et al.*, 2010) che sono stati adottati per le analisi condotte sulle C2C12. Di seguito verrà riportato quest'ultimo protocollo.

La reazione avviene in tubi di vetro dove a 20 µl di campione diluito in acqua, vengono aggiunti 80 µl di soluzione di reazione costituita da: 40mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 5mM ditiotreitolo, 0.25 mM oligonucleotide, 1.5 mg RNase A, 0.25 mM dATP marcato, 500–1000 cpm/pmol (oppure dTTP marcato per il saggio del dATP) e DNA polimerasi. Nel saggio è stata inclusa l'aggiunta di RNasi A alla concentrazione di 0.014 µg/µl per

rimuovere RNA marcato che si forma in esperimenti di marcatura isotopica con precursori triziati. Il tipo di DNA polimerasi e la concentrazione utilizzata per la determinazione di ciascun dNTP sono riportati di seguito: si utilizza il frammento di Klenow (BioLabs) per il saggio del dTTP (0.2 Unità) e del dATP (0.025 Unità), con 60 minuti di incubazione a 37°C; 2 unità di Taq DNA polimerasi (GE Healthcare) per il saggio del dCTP e del dGTP, con un'incubazione a 48°C di 60 minuti per il dCTP e di 120 minuti per il dGTP.

Al termine della reazione 85 µl del volume totale vengono depositati su filtri a scambio ionico DE81 (Whatmann) in grado di legare i fosfati dei dNTP trattenendo i polimeri. Si lasciano asciugare i filtri e poi si procede con 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno in una soluzione acquosa di NaHPO₄, un lavaggio in acqua distillata e uno in etanolo assoluto. I fosfati radioattivi legati ai filtri vengono poi rilevati allo scintillatore. La radioattività del ³²P permette di valutare le dimensioni dei *pool* dei dNTP espresse in pmol/10⁶ cellule oppure pmol/Abs NaOH. Nel caso i *pool* misurati provengano da un esperimento di marcatura isotopica con [³H]Timidina, allestendo una retta di taratura con [³H]dTTP anziché dTTP non-radioattivo, si potrà valutare oltre alla dimensione del *pool* del dTTP anche la sua radioattività specifica espressa in cpm/pmol.

3.11 Analisi *microarray*

Le analisi *microarray* non sono state eseguite nel nostro laboratorio, perciò verranno fornite solo alcune informazioni al riguardo.

E' stata fatta una marcatura diretta dei campioni di RNA, accoppiata a un'amplificazione con T7 RNA polimerasi (T7-IVT: *T7 In Vitro Transcription*). Partendo da 1 µg di RNA purificato, è stato applicato il protocollo del *Quick Amp Labeling Kit, one-color* (Agilent) per ottenere aRNA marcato con il fluoroforo Cyanine 3-CTP, poi purificato tramite colonne di affinità *RNeasyTM MiniKit* (Qiagen). Leggendo 1 µl di soluzione aRNA al NanodropTM, è stata quantificata la resa della reazione ottenendo una stima dell'attività specifica del target marcato. Una quantità ideale di aRNA (1.65 µg) è stata frammentata mediante idrolisi alcalina (30

minuti a 60° C in *Fragmentation Buffer*) per produrre frammenti di lunghezze comparabili tra loro. Infatti, frammenti di dimensioni diverse potrebbero seguire cinetiche d'ibridazione differenti.

La piattaforma utilizzata per l'ibridazione è *Microarray Agilent Mouse WholeGenome 4x44k*.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, partendo da tre diverse aliquote di RNA marcate in modo indipendente (repliche tecniche). Le ibridazioni sono non-competitive, cioè ogni replica tecnica è deposta su un vetrino diverso. Le immagini ottenute dalla scansione dei vetrini sono state processate con il software *Feature Extraction™ v 10.5.1* (Agilent) per acquisire i valori di fluorescenza. Per la normalizzazione dei dati è stato utilizzato il software *Expander* (Shamir *et al.*, 2005) che esegue una normalizzazione per quantili. Con questo tipo di analisi basata su ibridazioni non-competitive è possibile confrontare dati provenienti da esperimenti diversi.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il lavoro di ricerca da me svolto durante il dottorato può essere schematizzato in due parti principali. Nella prima parte mi sono dedicata allo studio di colture quiescenti di fibroblasti di pelle provenienti da pazienti con deficienza della TK2. Il mio obiettivo era quello di capire se nei tipi cellulari non colpiti dalla miopatia, come i fibroblasti, ci fossero dei meccanismi di compensazione in grado di tamponare gli effetti di una ridotta attività della timidina chinasi mitocondriale. Nella seconda parte mi sono dedicata allo studio di un modello di cellule muscolari differenziate in coltura per cercare di individuare che cosa rende il tessuto muscolare così vulnerabile all'inattivazione di TK2 e p53R2.

4.1 Metabolismo della timidina in due linee di fibroblasti mutanti per la timidina chinasi mitocondriale

Nell'introduzione sono state descritte in dettaglio le conseguenze di una deficienza della TK2 ed è stato riportato il caso di due pazienti con MDS miopatica dovute alle mutazioni T77M/R161K (paziente a, Pa) e R152G/K171Del (paziente b, Pb). I due soggetti manifestavano una miopatia con un decorso più lento rispetto agli altri casi noti, hanno infatti raggiunto l'età adolescenziale, e presentavano deplezione del mtDNA nel muscolo scheletrico ma non in altri tessuti, come ad esempio cuore, reni e fibroblasti. Abbiamo voluto investigare se nei fibroblasti di pelle di questi due pazienti il *network* degli enzimi coinvolti nella sintesi del dTTP si sia adattato per compensare le mutazioni della TK2. In un lavoro precedente abbiamo dimostrato che nei fibroblasti in quiescenza le dimensioni del *pool* del dTTP sono determinate dall'azione integrata della sintesi *de novo* dipendente da R1/p53R2 e della sintesi di recupero dipendente dalla TK2; inoltre l'attività della TK2 è influenzata sia dalla disponibilità di timidina che dalla competizione con la timidina fosforilasi (Rampazzo *et al.*, 2007). Alla luce di questo complesso *network* enzimatico, per comprendere quali meccanismi metabolici si innescano quando una delle componenti è difettosa è necessario considerare l'intero insieme dei fattori coinvolti. In

cellule proliferanti la presenza di una TK2 a ridotta attività è ininfluenza per il mantenimento del *pool* mitocondriale del dTTP, prodotto principalmente nel citosol attraverso l'attività della ribonucleotide reductasi e la via di recupero della timidina, catalizzata dalla TK1. Di conseguenza ho eseguito tutti gli esperimenti in colture quiescenti di fibroblasti, in cui il mantenimento del *pool* del dTTP è garantito dall'attività della TK2 e della via *de novo* catalizzata da R1/p53R2. La quiescenza è stata indotta in colture confluenti di fibroblasti riducendo la percentuale di siero nel mezzo di coltura dal 10% allo 0.1% e mantenendo le cellule in condizioni quiescenti per 10 giorni, prima di eseguire gli esperimenti.

4.1.1 Attività della TK2 in estratti proteici dei fibroblasti mutanti

Per prima cosa ho caratterizzato le due linee di fibroblasti mutanti (Pa, Pb) in termini di attività residua della TK2 rispetto a due linee di fibroblasti di controllo (Tabella 6). L'attività della TK2 è stata misurata su estratti proteici totali sia attraverso un saggio specifico basato sulla fosforilazione di 5'-bromovinil-2-deossiuridina (BVDU), un analogo nucleosidico che rappresenta un buon substrato per la TK2 ma non per la TK1 (Franzolin *et al.*, 2006), sia mediante la fosforilazione di timidina, substrato utilizzato nelle precedenti determinazioni di attività nei due pazienti (Vilà *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Si può osservare come la fosforilazione della timidina in questi campioni sia fortemente inibita da un inibitore specifico della TK2, KIN109 [1-(6-[1,1-(difenil)-1-(4-piridil)metossi]esil) timidina (Franzolin *et al.*, 2006)]; una dimostrazione del fatto che la reazione dipende esclusivamente dalla TK2. I risultati dei due saggi sono concordanti: gli estratti Pa hanno un'attività TK2 più bassa (circa il 5% dei controlli) rispetto agli estratti Pb (circa il 40% dei controlli). Per escludere che questa differenza di attività delle linee mutanti rispetto ai controlli sia determinata da una minor stabilità dell'enzima mutato, nelle condizioni di preparazione e di stoccaggio dei campioni, ho testato estratti cellulari ottenuti in diverse condizioni di preparazione con il saggio del BVDU. L'aggiunta di glicerolo, di 15 mM MgCl₂ o di concentrazioni crescenti di ATP (0.2-5 mM) non ha alcun effetto sull'attività della TK2, nemmeno il

congelamento del campione determina differenze; in ogni caso l'attività misurata negli estratti Pa si mantiene sempre a valori inferiori al 10% dei controlli (dati non mostrati).

Linea cellulare	Attività TK2 (pmol/min/mg proteina)		
	³ H]BVDU (0.2 μM)	³ H]Timidina (1 μM)	
		- KIN109	+KIN109
Controlli	5.2 ± 1.2	12.1 ± 5.8	0.4 ± 0.2
Pa	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.2 ± 0.1
Pb	2.1 ± 0.4	4.8 ± 1.8	0.3 ± 0.1

Tabella 6. Attività TK2 in estratti proteici di colture quiescenti di fibroblasti di controllo o mutanti nel gene della TK2. L'attività è stata misurata con due saggi diversi per la TK2: nel primo saggio è stato utilizzato un substrato specifico per la TK2, [³H]BVDU; nel secondo saggio è stata misurata la fosforilazione di timidina in presenza o in assenza di un inibitore specifico della TK2, KIN109, alla concentrazione di 100 μM. Pa e Pb, fibroblasti di pazienti mutanti per la TK2. I valori di attività sono espressi in pmoli di substrato fosforilato/ minuto di reazione/ mg di proteina. I valori sono medie di risultati ottenuti in doppio provenienti da 3 a 6 esperimenti diversi ± la deviazione standard delle medie.

4.1.2 Determinazione dei pool dei dNTP nei fibroblasti mutanti

Una volta stabilita la ridotta attività TK2 nelle linee di fibroblasti mutanti ci siamo chiesti se questa deficienza determinasse un qualche sbilanciamento dei pool dei dNTP. Ho quindi confrontato le dimensioni del pool del dTTP in colture quiescenti di fibroblasti di controllo e mutanti, senza osservare alcuna differenza significativa. Le dimensioni dei pool cellulari totali del dTTP sono molto simili tra loro (Tabella 7) e anche i pool mitocondriali non differiscono di molto tra controlli (0.11 ± 0.03 pmol/ 10^6 cellule) e mutanti (0.08 ± 0.03 pmol/ 10^6 cellule). In letteratura esiste solo una pubblicazione che riporta i pool dei dNTP determinati in fibroblasti umani deficienti per la TK2 e i valori differiscono dai dati ottenuti nei miei esperimenti. Si tratta di due pazienti con mutazioni in omozigosi per la TK2, diverse dalle mutazioni presenti nei fibroblasti oggetto del mio studio.

In quella pubblicazione i *pool* mitocondriali del dTTP di due linee mutanti risultavano inferiori del 50% e del 30% rispetto ai controlli e anche il *pool* del dCTP era leggermente ridotto, anche se non significativamente; nei mutanti si riscontrava perciò uno sbilanciamento di precursori nucleotidici rispetto ai controlli, ma un normale contenuto di mtDNA e di attività della catena respiratoria (Saada *et al.*, 2003). Ho quindi valutato le quantità di tutti i quattro dNTP in *pool* citosolici e mitocondriali delle due linee di fibroblasti mutanti Pa e Pb e dei due controlli Ca e Cb. Le dimensioni relative dei *pool* ottenute risultano in accordo con quelle determinate in un precedente lavoro in fibroblasti quiescenti di pelle e di polmone (Ferraro *et al.*, 2006) e non ho riscontrato nessuna indicazione di sbilanciamento di nucleotidi nelle cellule dei due pazienti (dati non mostrati). Quindi, nonostante la marcata riduzione di attività TK2 presente nei fibroblasti Pa e Pb, non si osservano modificazioni misurabili dei *pool* citosolici e mitocondriali del dTTP nei 10 giorni di quiescenza in coltura.

Pool cellulare del dTTP (pmol/ 10⁶ cellule)	
Linea cellulare	dTTP
Controlli	1.72 ± 0.2
Pa	1.67 ± 0.3
Pb	1.33 ± 0.2

Tabella 7. Pool cellulare totale del dTTP. La determinazione del *pool* avviene mediante saggio enzimatico descritto nei materiali e metodi (paragrafo 3.10). Valori medi ottenuti in doppio da 3 a 6 esperimenti diversi ± relative deviazioni standard.

4.1.3 Valutazione del contributo della sintesi de novo nei fibroblasti mutanti

I fibroblasti dei pazienti potrebbero mantenere un adeguato contenuto di dTTP grazie ad un sistema di compensazione, mediante sovraespressione, della via di sintesi *de novo* dipendente da R1/p53R2. Ho quindi valutato i livelli di mRNA delle tre subunità della RNR e di p53, il

fattore di trascrizione che può indurre l'espressione di p53R2, in condizioni proliferanti e dopo 10 giorni di quiescenza (Tabella 8). Con la quiescenza il messaggero di R1 diminuisce fino ad un 20-50% rispetto al contenuto di cellule proliferanti, mentre la quantità di mRNA di R2 si riduce ad un 10%. Al contrario, i livelli di mRNA di p53 e p53R2 aumentano durante la quiescenza. In particolare, si osserva un andamento simile in tutte le linee cellulari per l'espressione delle subunità della RNR, mentre l'induzione di p53 mostra più variabilità; l'incremento maggiore avviene nei fibroblasti Pa.

Livello di mRNA (cellule quiescenti/cellule ciclanti)				
Linea cellulare	R1	R2	P53R2	P53
Controlli	0.35 ± 0.06	0.06 ± 0.01	2.82 ± 0.77	3.40 ± 0.59
Pa	0.18 ± 0.03	0.10 ± 0.03	5.10 ± 0.53	8.53 ± 1.57
Pb	0.47 ± 0.04	0.12 ± 0.03	3.78 ± 0.23	5.47 ± 0.90

Tabella 8. Espressione delle tre subunità della ribonucleotide reduttasi e di p53 in colture quiescenti e ciclanti di fibroblasti di controllo e mutanti per la TK2. Livello di mRNA determinato con real-time PCR in cDNA ricavati dagli estratti di RNA totale di colture quiescenti e ciclanti. Ciclofillina a, come controllo interno. I valori esprimono il livello di mRNA di cellule quiescenti rispetto a cellule proliferanti. Medie di tre esperimenti analizzati in triplo ± deviazioni standard.

A livello proteico i *western blot* confermano questi dati di espressione e non si osservano chiare differenze tra cellule di pazienti e controlli nell'espressione di p53R2 (Figura 8). Da questi risultati, si può escludere un meccanismo di sovraespressione della forma R1/p53R2 della RNR nei fibroblasti mutanti durante la quiescenza. Tuttavia, la carenza di TK2 nei pazienti potrebbe essere compensata da un contributo più attivo della RNR alla sintesi del dTTP rispetto ai controlli. Per fare questo tipo di valutazione ho somministrato alle cellule, nel terreno di coltura, idrossiurea (HU) alla concentrazione di 3mM, un inibitore specifico della RNR. Dopo 2 ore di trattamento sia nei mutanti che nei controlli il *pool* del dTTP risulta ridotto del 20%, senza tracce di una maggiore sensibilità per l'inibitore nelle cellule con ridotta attività TK2 (dati non mostrati). Tenendo presente

che la sintesi *de novo* del dTMP avviene prevalentemente attraverso la deaminazione del dCMP seguita dalla metilazione del dUMP (Figura 1) e che il dCMP può provenire oltre che dalla sintesi *de novo* anche dalla via di recupero della deossicitidina, catalizzata dalla dCK (vedi introduzione), ho misurato l'attività di quest'ultimo enzima negli estratti proteici di pazienti e controlli. I risultati non hanno evidenziato alcuna differenza significativa, escludendo quindi anche la possibilità di un potenziamento del recupero della deossicitidina per mantenere il *pool* del dTTP nelle cellule con ridotta TK2 (dati non mostrati).

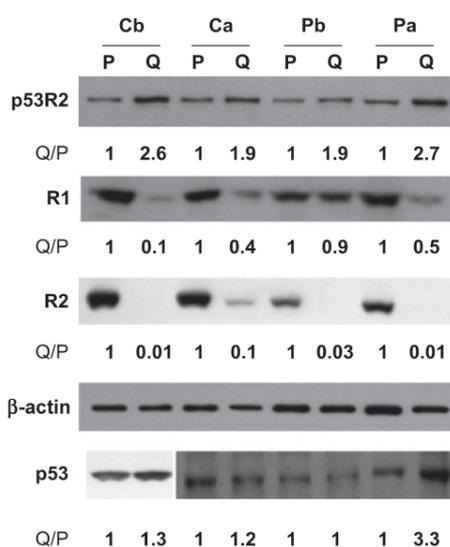


Figura 8. Western blot delle tre subunità della ribonucleotide reductasi e di p53 in colture quiescenti e ciclanti di fibroblasti di controllo e mutanti per la timidina chinasi mitocondriale (TK2). Analisi condotta su estratti proteici di fibroblasti di controllo (Ca, Cb) e di pazienti (Pa, Pb) in condizioni proliferanti (P) o dopo 10 giorni di quiescenza (Q). Il contenuto relativo di ciascuna proteina è stato normalizzato con la β -actina. Q/P, rapporto dei livelli di ciascuna proteina in colture quiescenti e proliferanti. Il blot per p53 negli estratti Cb è stato ottenuto da una corsa separata.

4.1.4 Il catabolismo del dTTP nei fibroblasti dei pazienti

Come illustrato nell'introduzione, le dimensioni dei *pool* dei dNTP sono regolate dall'azione concertata di reazioni di sintesi e di degradazione. Nei pazienti Pa e Pb abbiamo visto che il *pool* del dTTP apparentemente non risente della ridotta attività TK2 e abbiamo escluso la possibilità di un meccanismo di compensazione che preveda un potenziamento della

sintesi *de novo* o del recupero di deossicitidina. Un'alternativa per mantenere il *pool* del dTTP potrebbe essere una riduzione della sua degradazione e quindi, dell'attività di enzimi catabolici quali timidina fosforilasi (TP) o le deossinucleotidasi cdN e mdN. In Tabella 9 sono riportati i valori di attività della TP e dell'azione combinata di mdN e cdN, misurati in estratti proteici totali di colture quiescenti di controlli e mutanti. L'attività deossinucleotidasica è pressoché identica in tutte le linee cellulari, mentre i valori della TP sono più variabili; tuttavia, sia pazienti che controlli presentano lo stesso intervallo di variazione. Si può quindi escludere anche la possibilità di una ridotta degradazione dei nucleotidi timidinici nei fibroblasti dei mutanti per mantenere un adeguato *pool* del dTTP.

Linea cellulare	Attività TP (nmol timina/h/mg)	Attività deossinucleotidasi (nmol deossiuridina/h/mg)
Ca	273 ± 52	2340 ± 240
Cb	587 ± 125	2160 ± 540
Pa	244 ± 87	2160 ± 300
Pb	731 ± 67	2340 ± 240

Tabella 9. Attività enzimatica della timidina fosforilasi (TP) e delle deossinucleotidasi in estratti proteici di colture quiescenti di fibroblasti. L'attività TP è stata misurata usando come substrato 1mM timidina; l'attività deossinucleotidasica totale (mitocondriale + citosolica) con 5mM [³H]dUMP come substrato. I valori sono espressi come nanomoli di prodotto formato/ ora di incubazione/ mg di proteina e riportati con medie e deviazioni standard di diversi esperimenti.

4.1.5 Metabolismo della timidina nei fibroblasti mutanti

I dati presentati finora provengono da analisi effettuate con estratti proteici. Per misurare *in situ*, in cellule integre, le attività delle vie metaboliche che determinano la produzione del dTTP ho incubato le cellule con 25 nM di [³H]-timidina, aggiunta al mezzo di coltura, per 5 e 20 minuti e poi ho misurato gli effetti sulle dimensioni del *pool* del dTTP e la sua radioattività specifica nel *pool* cellulare totale (Figura 9, A e B). Nei

tessuti post-mitotici si può presupporre che il recupero della timidina dall'ambiente extra-cellulare sia molto basso, le concentrazioni di timidina nel sangue sono infatti al di sotto del limite inferiore misurabile di 50 nM. In accordo con un lavoro precedente condotto su fibroblasti di pelle (Rampazzo *et al.*, 2007), l'aggiunta di timidina anche a concentrazioni di 25 nM è risultata sufficiente per determinare un'immediata, seppure modesta, espansione delle dimensioni del *pool* del dTTP, senza differenze significative tra mutanti e controlli (Figura 9A).

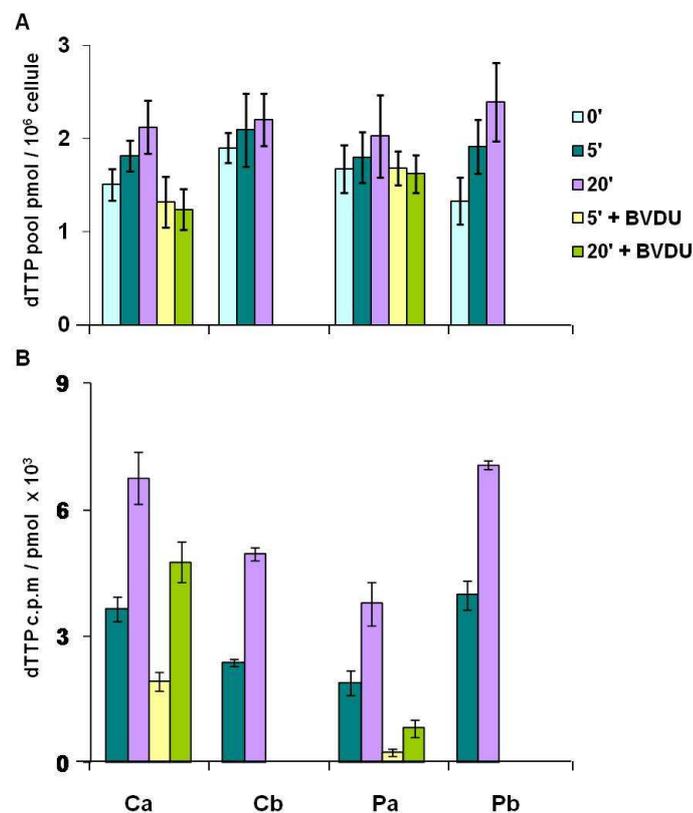


Figura 9. Fosforilazione *in situ* di [³H]timidina in fibroblasti di controllo e mutanti TK2. Colture quiescenti di fibroblasti di controllo (Ca, Cb) e mutanti TK2 (Pa, Pb) sono state incubate per 0, 5 e 20 minuti con timidina triziata alla concentrazione di 25 nM e ad un'attività specifica di 20 000 cpm/pmol. Le linee cellulari Ca e Pa sono state incubate anche in presenza di BVDU 1 μ M aggiunto 15 minuti prima della [³H]timidina, l'incubazione è stata protratta per 5 o 20 minuti. (A) dimensioni del *pool* cellulare totale di dTTP (pmoli/ 10⁶ cellule); (B) radioattività specifica del dTTP nel *pool* cellulare totale (cpm/ pmoli). I dati provengono da cinque esperimenti diversi. Le barre indicano le deviazioni standard.

La presenza di 1 μ M BVDU, che a questa concentrazione agisce da inibitore competitivo della TK2, durante la marcatura con timidina triziata previene l'espansione del *pool* con la stessa efficienza nel controllo Ca e

nella linea mutante Pa (Figura 9A). Questo conferma il coinvolgimento della TK2 nella fosforilazione della timidina in entrambe le linee cellulari, in accordo con quanto dedotto nei saggi enzimatici (Tabella 6) dai dati sull'inibizione della fosforilazione della timidina *in vitro* in presenza dell'inibitore KIN109. I valori di radioattività specifica del dTTP forniscono un'informazione importante, in quanto riflettono l'efficienza con cui il recupero di timidina extracellulare (che produce dTTP radioattivo) compete con la sintesi *de novo* endogena (dTTP non radioattivo) (Rampazzo *et al.*, 2007; Pontarin *et al.*, 2003). La radioattività specifica della [H^3]-timidina fornita alle cellule inizialmente era di 20 000 cpm/ pmol. Dopo 20 minuti di incubazione parte della timidina triziata è stata incorporata nel *pool* del dTTP, che ha raggiunto una radioattività specifica di circa 7 000 cpm/ pmol nel controllo Ca e nel mutante Pb, e circa 5 000 in Cb e Pa (Figura 9B). Perciò, in Ca e Pb circa un terzo del dTTP deriva dalla via di recupero della timidina extra-cellulare, mentre in Cb e Pa questa porzione è compresa tra un quarto e un quinto del dTTP totale. La presenza di BVDU determina una riduzione della radioattività specifica dopo 20 minuti di incubazione, del 25% in Ca e del 75% in Pa (Figura 9B). Se si considera che l'effetto del BVDU consiste in una riduzione dell'espansione del *pool* del dTTP, simile in entrambe le linee (Figura 9A), le differenze di radioattività specifica suggeriscono una minor efficienza della TK2 nel competere con la sintesi *de novo* di R1/ p53R2 nelle cellule mutate.

Mediante un esperimento di *pulse-chase* ho determinato il *turnover* del dTTP nei fibroblasti Pa e nei controlli Ca, che presentano un uguale contenuto di attività TP (Tabella 9). Le cellule sono state incubate con 0.1 μ M [H^3]-timidina per un tempo totale di 90 minuti (*pulse*). Nel *chase*, dopo 60 minuti il mezzo di coltura è stato sostituito in metà delle piastre, con terreno contenente 0.1 μ M timidina non radioattiva e nell'altra metà, con terreno senza timidina. In entrambe le serie ho determinato le dimensioni del *pool* del dTTP e la sua radioattività specifica a 5, 15 e 30 minuti di *chase*, considerando come tempo 0 il momento dell'avvenuta sostituzione del terreno di coltura (Figura 10).

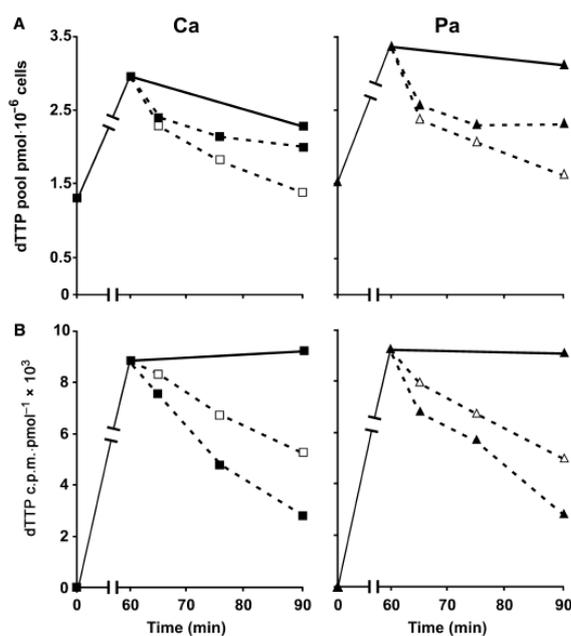


Figura 10. Analisi del turnover del dTTP mediante un esperimento di *pulse-chase* con [³H]timidina. Colture quiescenti di fibroblasti di controllo (Ca, quadrati) e mutanti TK2 (Pa, triangoli) sono state incubate con [³H]timidina alla concentrazione 0.1 μM per 90 minuti. Dopo 60 minuti di *pulse* (linee continue), il mezzo di coltura è stato sostituito (*chase*, linee tratteggiate) in parte delle colture con terreno senza timidina (simboli vuoti) o contenente timidina non radioattiva alla concentrazione 0.1 μM (simboli pieni), per 5, 15 e 30 minuti. (A) dimensioni del *pool* cellulare totale del dTTP (pmoli dTTP/ 10⁶ cellule). (B) radioattività specifica del *pool* del dTTP (cpm / pmol).

In entrambe le linee, in assenza di timidina non radioattiva, le dimensioni del *pool* raddoppiano nei primi 60 minuti di *pulse* (Figura 10A) per poi ritornare ai valori iniziali durante il *chase* di 30 minuti. Quando la timidina è presente durante il *chase*, il declino del *pool* del dTTP è solo transitorio. In entrambe le condizioni di *chase* la radioattività specifica del dTTP declina progressivamente, indicando un *turnover* del *pool* (Figura 10B). In presenza di timidina non radioattiva il *turnover* è più veloce, con un'emivita della radioattività specifica del dTTP di circa 14 minuti in Ca e 18 minuti in Pa, in accordo con i valori ottenuti precedentemente in fibroblasti di polmone (Pontarin *et al.*, 2006). Quando invece la timidina è assente nel terreno del *chase*, l'emivita è superiore ai 30 minuti e questo lento decadimento della radioattività specifica è da attribuire alla sintesi *de novo* di dTTP non radioattivo. Considerando i cambiamenti di radioattività specifica osservati e la concentrazione del dTTP durante il *chase*, è possibile calcolare il tasso di ri-sintesi del dTTP a partire dalla timidina, utilizzando una procedura descritta precedentemente in esperimenti di

pulse-chase, simili a questi, condotti su fibroblasti di polmone non mutati per la TK2 (Pontarin *et al.*, 2006). Nei primi 15 minuti di *chase* e in assenza di timidina, il dTTP è sintetizzato ad una velocità di 0.045 pmol/ 10⁶ cellule/ min in Ca e 0.054 pmol/ 10⁶ cellule/ min in Pa. In presenza di timidina nel mezzo di coltura, i tassi di sintesi sono rispettivamente 0.066 e 0.090 pmol/ 10⁶ cellule/ min; quindi più elevati, come risultato dell'attività di sintesi di recupero della TK2. Ancora una volta questi dati confermano che la sintesi del dTTP avviene con la stessa efficienza nelle cellule *wild-type* e in quelle mutanti per la TK2, nonostante queste cellule presentino una differenza di circa 15 volte nell'attività della TK2 misurata *in vitro* negli estratti proteici (Tabella 6). Il saggio di attività è stato fatto con 1 µM di timidina triziata come substrato e quindi, per poter confrontare meglio i valori ottenuti *in vitro* con quelli misurati *in situ*, ho ripetuto il saggio TK2 utilizzando il substrato alla concentrazione di 0.1 µM (corrispondente alla concentrazione utilizzata nell'esperimento di *pulse-chase*) e ho espresso i valori di attività enzimatica in pmol/ 10⁶ cellule/ min (vedere materiali e metodi per la conversione proteine-cellule, paragrafo 3.6.1). In questo modo si ottengono valori di 0.5 e 0.02 pmol/10⁶ cellule/ min rispettivamente negli estratti Ca e Pa. La differenza tra paziente e controllo è la stessa rispetto al saggio condotto con concentrazioni maggiori di substrato riportato in Tabella 6. Tuttavia, negli estratti di controllo, e non in quelli dei fibroblasti di paziente, l'attività della TK2 misurata *in vitro* è 10 volte superiore al tasso di sintesi del dTTP misurato *in situ* nelle cellule. Questa notevole differenza suggerisce che nei fibroblasti *wild-type*, con una TK2 perfettamente funzionante, vi sia un eccesso di attività timidino-chinasica mitocondriale il cui potenziale non è sfruttato completamente

Concludendo questa prima parte del mio lavoro, le due linee di fibroblasti mutanti per la TK2 mostrano una notevole riduzione di attività timidino-chinasica misurata *in vitro* in estratti di cellule quiescenti, a cui tuttavia non corrisponde uno sbilanciamento dei *pool* di dNTP. Nelle linee mutate non ho ritrovato meccanismi di adattamento metabolico come una riduzione delle vie cataboliche o una maggior dipendenza dalla via *de novo* di R1/p53R2. Confrontando le dinamiche del *pool* del dTTP nei mutanti e nei

controlli, in esperimenti di marcatura con timidina triziata, nonostante la ridotta attività TK2 i mutanti fosforilano il precursore con uguale efficienza rispetto ai controlli. Dall'analisi del *turnover* del dTTP, attraverso esperimenti di *pulse-chase*, risulta che le cellule di controllo sintetizzano il dTTP *in situ* con la stessa efficienza delle cellule mutate, ad un tasso 10 volte inferiore a quello osservato nei saggi enzimatici. L'espressione della TK2 aumenta in fibroblasti di pelle *wild-type* quiescenti (Rampazzo *et al.*, 2007), ma l'enzima sembra lavorare a livelli inferiori alle sue potenzialità. Dai risultati ottenuti in questo mio lavoro, una piccola percentuale dell'attività potenziale della TK2 sembra sufficiente a mantenere il *pool* del dTTP in fibroblasti *wild-type*. Nelle cellule mutanti, invece, i tassi di fosforilazione *in vitro* (in estratti proteici) e *in situ* (in cellule) non differiscono. Si potrebbe pensare che queste cellule, sfruttando completamente la loro attività TK2 residua, siano in grado di mantenere adeguati livelli del *pool* del dTTP; questo spiegherebbe l'assenza di deplezione del mtDNA riscontrata. Nei fibroblasti *wild-type* potrebbe intervenire un controllo a *feedback* negativo da parte di dTTP e dCTP (Wang *et al.*, 2003) a ridurre il reale potenziale della TK2 e i fibroblasti mutanti potrebbero essere in grado di eludere, in qualche modo, questo tipo di controllo. Tuttavia, non sono stata in grado di ritrovare indicazioni a favore di una regolazione di questo tipo da parte di dCTP e dTTP in saggi condotti su estratti proteici totali (dati non mostrati).

In un lavoro precedente condotto nel laboratorio in cui ho svolto il dottorato, il silenziamento della TK2 mediante RNAi in fibroblasti di pelle (la linea Cb di questo lavoro), determinava una riduzione del 10% del *pool* del dTTP (Rampazzo *et al.*, 2007). La riduzione dell'attività specifica della TK2 era paragonabile a quella osservata qui nel paziente Pa, ma in contrasto con quanto ottenuto nei miei esperimenti, il *pool* del dTTP risentiva di questa riduzione di attività. Si può pensare che queste differenze dipendano dal controllo multifattoriale a cui è sottoposto il metabolismo dei dNTP. I *pool* sono regolati da un complesso *network* enzimatico e variazioni interindividuali in specifiche componenti tra pazienti e controlli potrebbero mascherare gli effetti di mutazioni a carico di un singolo enzima. Un esempio a favore è rappresentato dall'attività della TP, che risulta variabile in linee cellulari diverse (Tabella 9).

4.2 Modello cellulare di muscolo scheletrico: mioblasti differenziati in coltura

Il muscolo scheletrico è caratterizzato da valori molto bassi di attività TK2 (Saada *et al.*, 2003; Rylova *et al.*, 2007). Nell'introduzione (paragrafo 1.7), è stato tracciato un resoconto dettagliato delle informazioni presenti in letteratura che potrebbero dar ragione della sua vulnerabilità nei confronti di mutazioni di TK2 e p53R2. Tuttavia, sebbene queste informazioni forniscano degli importanti indizi al riguardo, molti elementi del quadro sono tuttora difficili da comprendere.

Una volta caratterizzato il metabolismo della timidina nei fibroblasti di pelle e dopo aver analizzato le modalità con cui cellule mutanti siano in grado di far fronte ad una riduzione dell'attività TK2 e a garantire un'adeguata produzione di dTTP per la replicazione del mtDNA, ci siamo chiesti in che modo questi dati potessero aiutarci a capire la tessuto-specificità che caratterizza le MDS miopatiche. Si potrebbe ipotizzare che nel muscolo i livelli fisiologici di TK2 siano prossimi alla soglia minima richiesta per il mantenimento del *pool* del dTTP e che quindi, anche in presenza di una parziale inattivazione dell'enzima, la sua attività potrebbe scendere al di sotto di questa soglia, determinando uno sbilanciamento dei dNTP. Sarebbe interessante poter studiare il metabolismo dei dNTP direttamente in colture di mioblasti di pazienti, ma è difficile e poco etico pensare di ottenere biopsie di muscolo da soggetti così giovani che sono affetti da miopatia e, tenendo in considerazione la variabilità interindividuale osservata nei fibroblasti, occorrerebbero biopsie da soggetti diversi, sia pazienti che controlli. Inoltre, da una biopsia generalmente si ottiene una popolazione mista di cellule in cui la porzione di fibroblasti prende progressivamente il sopravvento ad ogni passaggio in coltura, diminuendo drasticamente il potenziale di differenziamento delle cellule muscolari. In letteratura sono presenti studi condotti sui tessuti dei pazienti (misure di attività enzimatica, analisi istochimiche) o in modelli animali (topi *knock-out* e *knock-in*), ma non è mai stata riportata una caratterizzazione del metabolismo dei dNTP in cellule muscolari, simile a quella riportata qui sui fibroblasti di pelle.

Per condurre uno studio di questo tipo, avevamo bisogno di un modello cellulare di muscolo scheletrico che ci permettesse di ottenere un buon livello di differenziamento in coltura. Il vantaggio di lavorare con un modello cellulare è quello di poter controllare le condizioni sperimentali, un requisito importante per studiare il metabolismo dei precursori nucleotidici. Infatti, mediante l'ausilio di inibitori chimici, di esperimenti di marcatura con precursori radioattivi o di silenziamento con RNAi è possibile sezionare a nostro piacimento ogni componente del *network* enzimatico coinvolto. La linea cellulare di mioblasti murini C2C12 si è rivelata molto adatta ai nostri scopi. Si tratta di una linea cellulare stabilizzata, proveniente da tessuto muscolare di topo, in grado di mantenere la capacità di differenziazione miogenica se posta in opportune condizioni di crescita. Inoltre è una popolazione clonale, priva di contaminazioni da parte di altri tipi cellulari, ciò dovrebbe garantire la riproducibilità degli esperimenti. Queste cellule in condizioni proliferanti, con terreno al 10% di siero fetale bovino (terreno di crescita), hanno un aspetto morfologicamente simile a fibroblasti, si moltiplicano attivamente e hanno una fase S del 50%. Sostituendo il terreno di coltura con un mezzo al 2% di siero di cavallo (terreno di differenziamento) è possibile indurre il differenziamento: i mioblasti diventano miociti post-mitotici che si fondono in sincizi multinucleati detti miotubi.

4.2.1 Ottimizzazione delle condizioni di differenziamento di cellule C2C12

La manipolazione delle cellule C2C12 richiede particolari attenzioni volte ad evitare la perdita del loro potenziale differenziativo, perciò, nella prima parte di questo lavoro ho cercato di ottimizzare le condizioni di differenziamento. Queste cellule proliferano rapidamente in coltura e il contatto cellula-cellula induce nei mioblasti una modificazione delle loro caratteristiche che abbassa l'efficienza di fusione (fusione lenta); di conseguenza, è importante mantenere le colture sempre a una densità moderata per evitare che la popolazione cellulare si impoverisca di cellule a fusione rapida. Anche i passaggi in coltura riducono il potenziale

differenziativo, per questo per ogni esperimento è preferibile iniziare da una coltura fresca, proveniente da aliquote congelate a bassi passaggi. In seguito a numerose prove di differenziamento ho ottenuto i risultati migliori crescendo le cellule in terreno di crescita, su supporti di plastica preventivamente trattati con gelatina, fino al raggiungimento di un 70-80% di confluenza; a questa densità, si sostituisce il mezzo di coltura con il terreno di differenziamento e inizia il processo di fusione. Una volta indotto il differenziamento, ho riscontrato che si ottengono miotubi migliori rinnovando il terreno quotidianamente. A queste condizioni si ottiene un differenziamento rapido, lunghi fasci di miotubi rivestono la superficie di coltura e si ingrandiscono giorno per giorno (Figura 11). Attorno al sesto giorno di differenziamento i miotubi iniziano ad esibire un'attività contrattile spontanea e resistono in coltura fino all'ottavo-decimo giorno; più spinto è il differenziamento e minore è la durata dei miotubi in coltura, che iniziano a staccarsi dal fondo.

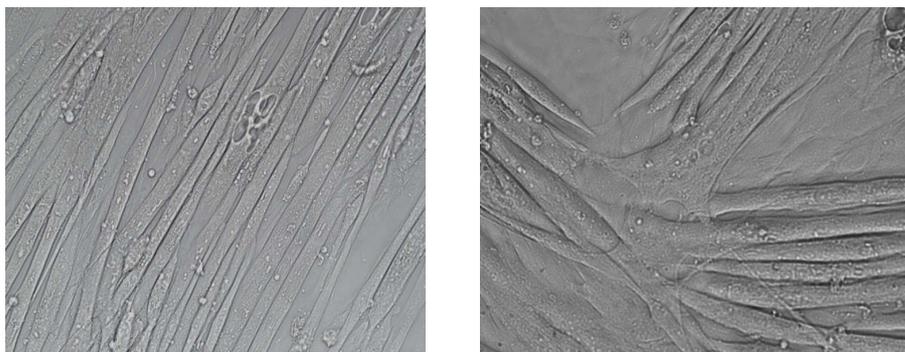


Figura 11. Coltura di C2C12 a 7 giorni di differenziamento. Le foto corrispondono a campi presi da colture distinte di C2C12. Contrasto di fase, ingrandimento 20X per la foto a sinistra e 40X per quella a destra.

Anche nelle migliori condizioni di differenziamento una sostanziale frazione di cellule è costituita da mioblasti non fusi, ancora ciclianti, il cui contenuto di dNTP e il corredo enzimatico differiscono da quelli di miotubi post-mitotici. Di conseguenza, il primo ostacolo che ho dovuto superare per poter lavorare con queste cellule è la messa a punto di un protocollo che mi permettesse di separare i miotubi da una coltura differenziata. Ho ottenuto i risultati migliori con una procedura che prevede una delicata tripsinizzazione (0.05% tripsina diluita in versene) delle cellule che, una

volta staccate, vengono risospese, sempre delicatamente, in terreno di crescita al 10% FBS e trasferite in una nuova piastra di coltura. Segue un'incubazione della sospensione cellulare in termostato a 37°C per 30 minuti. Durante questo lasso di tempo, le cellule mononucleate aderiscono al fondo della piastra, mentre i miotubi restano in sospensione. Ripetendo questo passaggio due volte, si ottiene una sospensione cellulare arricchita in miotubi che può essere utilizzata per analisi successive.

Per valutare la purezza delle frazioni così ottenute, ho misurato l'attività TK1 in estratti proteici e il livello di mRNA di due indicatori di differenziamento, miogenina e miosina, su cDNA ottenuti da estratti di RNA totale. La TK1, essendo attiva solo in fase S, è un ottimo marcatore per cellule proliferanti. In Tabella 10 sono riportati i valori di attività TK1 in mioblasti proliferanti e in colture differenziate, prima e dopo la purificazione della frazione di miotubi.

Attività TK1 (pmol/min/mg prot)	
Campione	1 μM [3H]timidina
Mioblasti proliferanti	176 \pm 47
Coltura differenziata	15 \pm 6
Mioblasti purificati	47
Miotubi purificati	0.15 \pm 0.00

Tabella 10. Attività enzimatica della timidina chinasi citosolica (TK1) come indicatore di qualità delle frazioni ottenute con la procedura di purificazione dei miotubi. L'attività TK1 può essere utilizzata come parametro per discriminare la presenza di cellule ciclanti in una popolazione di cellule differenziate. Il saggio è stato eseguito utilizzando [3 H]timidina come substrato su estratti proteici di mioblasti e miotubi a 8 giorni di differenziamento. I valori sono espressi in pmoli di prodotto/ minuto di reazione/ mg proteina e riportati come medie di due esperimenti indipendenti \pm deviazioni standard.

In una coltura differenziata di C2C12 è presente circa un 10% di attività TK1 rispetto alle cellule proliferanti e questo residuo di attività è dovuto interamente alla porzione di mioblasti non fusi ancora presenti nella coltura, ciò si deduce dall'attività misurata nella frazione di mioblasti rimasta adesa al supporto dopo il processo di separazione dei miotubi; in

questo caso l'attività TK1 è più alta rispetto a quella misurata nella coltura intera, per effetto della purificazione. Nei miotubi purificati l'attività TK1 è pressoché nulla, con risultati perfettamente riproducibili in preparazioni diverse. Ciò significa che con questa procedura di separazione è possibile ripulire i miotubi di una parte consistente di mioblasti non fusi. L'espressione dei marcatori di differenziamento conferma la purezza della frazione di miotubi (Tabella 11); la miogenina è uno dei fattori MRF (vedere introduzione paragrafo 1.8) necessario nelle prime fasi della miogenesi per il processo di fusione e formazione dei miotubi, mentre la miosina è una proteina strutturale presente in una miogenesi più avanzata. Entrambi i parametri presentano un aumento di espressione con il differenziamento e i livelli più alti di mRNA si ritrovano nella frazione di miotubi purificati. Grazie a questo protocollo di purificazione sono riuscita ad ottenere una frazione di miotubi differenziati in cui l'interferenza dovuta alla presenza di cellule mononucleate non fuse è minimizzata.

Livello di mRNA (rispetto a mioblasti proliferanti)		
Campione	miogenina	miosina embrionale
Mioblasti proliferanti	1	1
Coltura differenziata	68 ± 13	614 ± 97
Miotubi purificati	77 ± 13	676 ± 166

Tabella 11. Espressione di miosina e miogenina come indicatori di qualità delle frazioni ottenute con la procedura di purificazione dei miotubi. I campioni di miotubi provengono da colture a 8 giorni di differenziamento. Livello di mRNA determinato con real-time PCR in cDNA ricavati dagli estratti di RNA totale di colture ciclanti, differenziate e delle frazioni ottenute dopo la purificazione dei miotubi. Il gene RplpO (*ribosomal protein large P0*) è stato usato come referenza per l'analisi di espressione come suggerito da Stern-Straeter *et al.*, 2009. I valori esprimono il livello di mRNA rispetto a cellule proliferanti e sono medie di due esperimenti indipendenti misurati in triplo ± deviazione standard.

Come descritto nell'introduzione il processo di differenziamento miogenico è accompagnato da una stimolazione della biogenesi mitocondriale che, nelle cellule C2C12 in coltura, determina un'espansione del numero di copie del mtDNA. Per verificare questa condizione, ho eseguito la

quantificazione del mtDNA mediante *real-time PCR* quantitativa su campioni di DNA genomico estratto da mioblasti, colture differenziate e miotubi purificati (materiali e metodi, paragrafo 3.4). I risultati confermano un incremento del contenuto di mtDNA di circa 7-8 volte rispetto ai mioblasti proliferanti (Tabella 12). In letteratura un lavoro condotto sulle C2C12 riporta un aumento di circa 3 volte in miotubi a 7 giorni di differenziamento calcolato rispetto a mioblasti al giorno 0, ovvero al momento di induzione del differenziamento, quando le cellule si trovano a confluenza (Remels *et al.*, 2010). Presumibilmente il processo miogenico inizia prima che venga effettuata l'induzione con terreno di differenziamento, molto probabilmente come conseguenza del contatto cellula-cellula che si verifica in una coltura confluenta. Ho infatti osservato che se i mioblasti superano il 70-80% di confluenza tendono a fondersi spontaneamente nel tempo, anche se con un'efficienza molto bassa rispetto a colture indotte con terreno di differenziamento. E' quindi possibile che al giorno 0 di differenziamento i mioblasti abbiano già un contenuto di mtDNA superiore a quello di cellule proliferanti. Questo spiegherebbe il diverso grado di espansione del mtDNA riscontrato nei miei esperimenti.

n°copie mtDNA	
Mioblasti	431 ± 92
Coltura differenziata	2812 ± 593
Miotubi purificati	3721 ± 1328

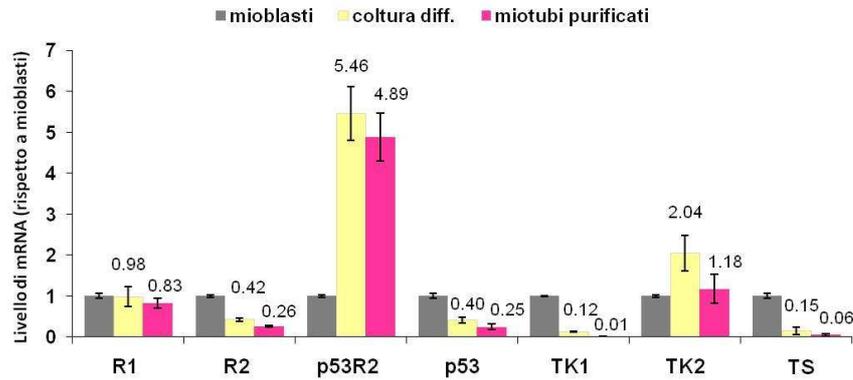
Tabella 12. Espansione del numero di copie del mtDNA con il differenziamento. I campioni di miotubi provengono da colture a 8 giorni di differenziamento. I valori rappresentano la quantità di copie del gene mitocondriale COXI corretta per il gene nucleare ACTINA-β. I dati provengono dall'analisi di cinque esperimenti diversi misurati in triplo. *Real-time PCR* quantitativa eseguita con sistema Taqman.

4.2.2 Caratterizzazione del metabolismo dei dNTP nelle cellule C2C12

Il metabolismo dei dNTP non è mai stato analizzato nella linea cellulare C2C12, ho quindi svolto una caratterizzazione di queste cellule misurando l'espressione degli enzimi coinvolti nelle vie biosintetiche dei deossinucleotidi, l'attività enzimatica degli enzimi della sintesi di recupero del dTTP e la composizione dei *pool* cellulari totali dei quattro dNTP. Il mio interesse era focalizzato sull'osservazione delle modificazioni che si instaurano con il differenziamento dei mioblasti in miotubi, alla ricerca di eventuali differenze rispetto a quanto già osservato in fibroblasti di pelle al passaggio dalla proliferazione alla quiescenza. Dal confronto tra un modello cellulare per il muscolo, tessuto bersaglio delle mutazioni di TK2 e p53R2, e fibroblasti di pelle quiescenti, modello di un tessuto non-bersaglio, avrei potuto individuare possibili elementi critici nel metabolismo dei dNTP in cellule muscolari differenziate che mi aiutassero a spiegare la vulnerabilità del muscolo a sbilanciamenti del *pool* del dTTP.

Per prima cosa ho analizzato l'espressione delle subunità della RNR e degli enzimi della sintesi di recupero del dTTP in mioblasti proliferanti, in colture differenziate e in miotubi purificati. Osservando i livelli di mRNA (Figura 12A) delle subunità della RNR si riscontra una lieve riduzione di R1 nei miotubi purificati rispetto ai mioblasti proliferanti, un declino di circa il 70% dell'espressione di R2 e una netta induzione dell'espressione di p53R2 che aumenta di circa 5 volte. L'induzione di p53R2 non è correlata ad un incremento dell'espressione di p53 che, al contrario, diminuisce. L'mRNA della TK1 scompare completamente nei miotubi purificati mentre la TK2 rimane pressoché invariata con il differenziamento. Confrontando questi dati con i livelli di espressione osservati nei fibroblasti di pelle, nel passaggio dallo stato proliferante a quello quiescente (Rampazzo *et al.*, 2007), si osserva un andamento simile per le subunità della RNR, con una riduzione un po' più spinta nei fibroblasti per R1 e R2 e un'induzione meno marcata per p53R2, mentre spicca un'interessante differenza nell'espressione della TK2 (Figura 13). Nei fibroblasti infatti l'mRNA della TK2 aumenta con il raggiungimento di uno stato post-mitotico.

A



B

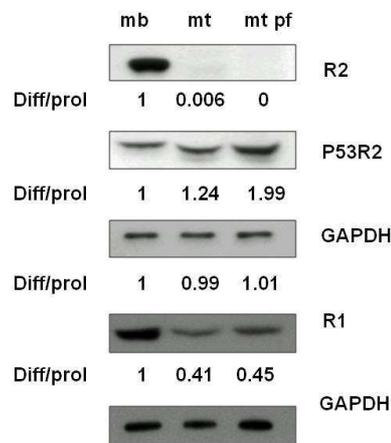


Figura 12. Espressione delle componenti della sintesi *de novo* e della via di recupero del dTTP. (A) Livello di mRNA determinato con *real-time* PCR in cDNA ricavati dagli estratti di RNA totale di colture ciclanti, differenziate e delle frazioni ottenute dopo la purificazione dei miotubi. I campioni di miotubi provengono da colture a 8 giorni di differenziamento. Il gene Rplp0 (*ribosomal protein large P0*) è stato usato come referenza per l'analisi di espressione come suggerito da Stern-Straeter *et al.*, 2009. I valori riportati nel grafico esprimono il livello di mRNA rispetto a mioblasti proliferanti e sono medie di due esperimenti misurati in triplo \pm deviazione standard. (B) *Western blot* di estratti proteici di mioblasti (mb), colture a 8gg di differenziamento (mt) e miotubi purificati (mt pf) da queste colture. Il contenuto relativo di ciascuna proteina è stato normalizzato con la proteina GAPDH. Diff/prol, rapporto dei livelli di ciascuna proteina in colture differenziate (o miotubi purificati) rispetto a cellule proliferanti. Il blot per R1 è stato ottenuto da una corsa separata per la quale è mostrato il relativo controllo GAPDH.

A livello proteico (Figura 12B) l'espressione di R2 scompare nei miotubi a 8 giorni di differenziamento e R1 è ridotta ad un 40% circa, la proteina p53R2 aumenta solo di 2 volte nonostante l'elevato incremento del suo mRNA. Per TK1 e TK2 non sono disponibili in commercio degli anticorpi adatti per un'analisi mediante *western blot*, è stata quindi saggiata l'attività enzimatica.

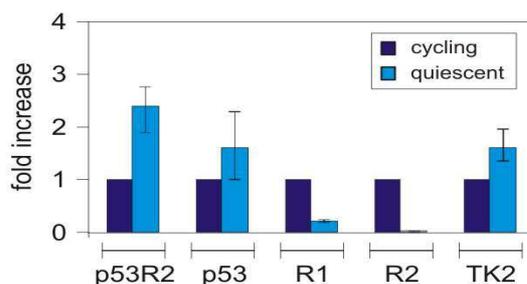


Figura 13. Espressione delle tre subunità della ribonucleotide reduttasi, p53 e TK2 in fibroblasti umani di pelle ciclanti e quiescenti. La quiescenza è stata indotta in colture confluenti di fibroblasti con terreno allo 0.1% di siero e mantenuta per 10 giorni. *Fold increase*: Livello di mRNA in colture quiescenti rispetto a fibroblasti proliferanti. La β -actina è stata usata come gene referenza. Tratto da Franzolin 2009 (tesi di dottorato).

Abbiamo visto in Tabella 10 come l'attività TK1 sia assente nei miotubi purificati e valori di attività analogamente bassi sono stati ritrovati nei fibroblasti quiescenti (Tabella 6). L'attività della TK2 è molto bassa nei mioblasti proliferanti (Tabella 13), circa il 4% di quella misurata in fibroblasti ciclanti e mentre nei fibroblasti l'attività aumenta di circa 3 volte alla quiescenza, nei miotubi non si può parlare di induzione di attività, in quanto valori così bassi sono al limite misurabile con il saggio enzimatico.

Attività TK2 (pmol/min/mg prot)	
Campione	0.2 μ M [3 H]BVDU
Mioblasti proliferanti	0.07 \pm 0.01
Coltura differenziata	0.12 \pm 0.02
Miotubi purificati	0.16 \pm 0.01
Fibroblasti proliferanti	1.7 \pm 0.2
Fibroblasti quiescenti	5.2 \pm 1.2

Tabella 13. Attività enzimatica della TK2 in cellule C2C12 proliferanti e differenziate e in fibroblasti umani di pelle proliferanti e quiescenti. L'attività è stata misurata in estratti proteici totali di C2C12 (mioblasti, colture differenziate e miotubi purificati a 8 giorni di differenziamento) e di fibroblasti umani (i controlli di tabella 6) proliferanti e a 10 giorni di quiescenza, per valutare il contenuto di TK2 in questa linea cellulare. Il saggio è stato eseguito utilizzando [3 H]BVDU come substrato. I valori sono espressi in pmoli di prodotto/ minuto di reazione/ mg proteina e riportati come medie di due esperimenti indipendenti \pm deviazioni standard.

4.2.3 Valutazione dei pool cellulari totali dei dNTP in cellule C2C12

La determinazione dei *pool* nei miotubi è complicata dal problema della normalizzazione, generalmente infatti i *pool* dei dNTP si esprimono in pmoli/ 10^6 cellule (Ferraro *et al.*, 2010) ma, essendo i miotubi costituiti da cellule fuse, non è possibile determinare il numero di cellule in una coltura differenziata e ancor meno nella frazione di miotubi purificati. Inizialmente avevamo pensato di normalizzare i *pool* per il contenuto di DNA totale estratto in parallelo da repliche di uno stesso esperimento, tuttavia ci siamo resi conto che si introducevano troppe variabili nelle determinazioni. Un esempio è l'efficienza di estrazione del DNA. Nei miotubi infatti c'è un elevato contenuto di proteine strutturali che influisce sulla resa dell'estrazione di DNA: generalmente si precipitano le proteine del campione e si recuperano gli acidi nucleici che rimangono in sospensione, ma se il *pellet* di proteine è molto grande, risulta meno compatto e quindi, per evitare contaminazioni proteiche nel DNA, si preferisce tralasciare un po' di surnatante. In questo modo si inserisce un elemento di variabilità tra campioni diversi difficile da stimare. Abbiamo quindi deciso di normalizzare i *pool* per il contenuto di macromolecole totali, un procedimento da noi usato routinariamente per la normalizzazione di valori relativi al *pool* dei dNTP nelle colture cellulari. Dopo aver estratto il *pool* cellulare totale con 60% metanolo, si lasciano asciugare le cellule e poi si dissolvono in NaOH. In questo modo si portano in soluzione tutte le macromolecole cellulari e assumendo che il contenuto medio di macromolecole sia uguale per ogni cellula, il valore di assorbanza a 260 nm è proporzionale al numero di cellule. Si tratta ovviamente di una stima approssimativa e bisogna tenere in considerazione che, nonostante le proteine generalmente non siano rilevabili a questa lunghezza d'onda, l'elevato contenuto proteico dei miotubi potrebbe determinare un'interferenza dovuta all'assorbanza dei residui aminoacidici aromatici. Il contenuto proteico differisce notevolmente tra mioblasti e miotubi, di conseguenza un confronto tra mioblasti e miotubi sarà meno affidabile di un confronto tra miotubi o tra mioblasti. Il vantaggio di questo tipo di normalizzazione è che l'estratto di NaOH proviene dallo stesso campione da cui è stato estratto il *pool* e non da un campione diverso.

Le dimensioni dei *pool* dei quattro dNTP si riducono con il differenziamento (Tabella 14). dTTP e dCTP sono i *pool* più abbondanti nei mioblasti proliferanti e il dGTP quello meno abbondante. In cellule differenziate i rapporti cambiano: nei miotubi purificati il dCTP si riduce di circa 8 volte mantenendo il primato di *pool* più elevato, mentre il dTTP subisce una riduzione di circa 30 volte che corrisponde alla variazione più ampia osservata nei quattro *pool*. Il dGTP si conferma come *pool* più basso anche dopo il differenziamento. I *pool* della coltura differenziata, in cui i miotubi non sono stati purificati, hanno valori un po' più alti che presumibilmente sono dovuti alla presenza di mioblasti non fusi.

Pool cellulari totali (pmol/ NaOH Abs. 260nm)				
Campioni	dTTP	dCTP	dGTP	dATP
mb	47.23 ± 5.26	57.43 ± 5.16	8.27 ± 1.30	22.15 ± 2.4
mt	5.06 ± 0.21	17.64 ± 1.06	0.51 ± 0.01	5.88 ± 0.25
mt pf	1.46 ± 0.15	6.59 ± 0.68	0.61 ± 0.09	2.87 ± 0.31

Tabella 14. Pool cellulari totali dei dNTP. La determinazione dei *pool* è stata fatta mediante saggio enzimatico (materiali e metodi, paragrafo 3.10) su estratti di mioblasti (mb), colture differenziate (mt) e miotubi purificati (mt pf). I *pool* sono stati normalizzati per il contenuto di macromolecole delle cellule, dissolto in NaOH e stimato dalla lettura di assorbanza (Abs.) a 260 nm della soluzione. I valori rappresentano medie di due esperimenti indipendenti misurati in doppio ± deviazione standard.

Tenendo presente la diversa normalizzazione utilizzata per i *pool*, i mioblasti si possono confrontare con i fibroblasti in termini di rapporti tra i quattro dNTP e variazioni di contenuto dei precursori nucleotidici tra lo stato proliferante e quello quiescente o differenziato. I *pool* misurati con lo stesso metodo di saggio (vedere materiali e metodi, paragrafo 3.10) in fibroblasti umani (Ferraro *et al.*, 2010) differiscono leggermente rispetto ai mioblasti per il contenuto di dTTP (Tabella 15). Esso è il *pool* più abbondante in fibroblasti proliferanti e diminuisce di circa 11 volte in colture confluenti di 14 giorni, per gli altri dNTP l'intervallo di variazione delle dimensioni dei *pool* tra stato ciclante e stato non ciclante (1.8% di fase S) è molto simile a quello osservato qui per i mioblasti.

Campioni	Pool cellulari totali (pmol/ 10 ⁶ cell)			
	dTTP	dCTP	dGTP	dATP
Fibroblasti proliferanti	92	44	18	47
Fibroblasti confluenti	8	6	1.2	8

Tabella 15. Pool cellulari totali dei dNTP in estratti di fibroblasti umani proliferanti e confluenti. Le colture confluenti avevano una fase S del 1.8%. Tratto da Ferraro *et al.*, 2010.

Riassumendo, con la caratterizzazione del metabolismo dei dNTP nella linea C2C12 di mioblasti di topo, è emerso un quadro che presenta un contenuto estremamente basso di TK2 nelle cellule muscolari che non aumenta con il differenziamento e un'induzione dell'espressione di p53R2 di circa due volte a livello proteico. Gli enzimi catabolici, timidina fosforilasi e deossinucleotidasi, non sono regolati con il ciclo cellulare (Rampazzo *et al.*, 2010) e nel muscolo sono espressi a bassi livelli (Rylova *et al.*, 2007; Wang, 2010). Questo assetto enzimatico si riflette nella drastica riduzione del *pool* del dTTP durante il differenziamento osservata nei miotubi purificati.

4.2.4 Confronto del modello cellulare con il muscolo scheletrico

I mioblasti in coltura rappresentano un buon modello di differenziamento miogenico adulto. Le C2C12 sono state ampiamente studiate in letteratura come modello di cellule satelliti e il loro differenziamento è stato caratterizzato secondo molteplici aspetti: si ritrovano studi morfologici, biochimici, di espressione genica e anche i fattori di differenziamento miogenico spesso sono stati studiati in questa linea cellulare. Ma i miotubi differenziati quanto si discostano dal muscolo scheletrico vero e proprio? Per noi è molto importante avere un'indicazione sull'affidabilità di questo modello muscolare, dato che il nostro intento è quello di cercare delle possibili spiegazioni per la tessuto-specificità delle MDS miopatiche. Ho quindi preparato degli estratti di RNA totale che sono stati analizzati in esperimenti di *microarray* da un gruppo di ricerca che collabora con il

nostro. I profili di espressione genomica di mioblasti e miotubi sono stati analizzati in concomitanza con campioni di RNA estratti da due tipi di muscolo scheletrico di topo, il soleo e l'EDL (Extensor Digitorum Longus); il primo è costituito prevalentemente da fibre di tipo I e presenta quindi un metabolismo ossidativo, mentre il secondo è costituito prevalentemente da fibre di tipo II e di conseguenza ha un fenotipo glicolitico (introduzione paragrafo 1.8.1). Nel confronto tra i diversi campioni l'attenzione è stata rivolta ai profili di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi. In Figura 14 si può osservare la stretta similarità tra miotubi e muscolo scheletrico, inoltre le differenze che emergono tra mioblasti e miotubi sono in accordo con i dati di *real-time PCR* (Figura 12A). Tra le osservazioni che si possono fare su questi risultati di *microarray* è interessante notare l'espressione estremamente bassa della timidilato sintasi e della dCMP deaminasi nel muscolo differenziato. Considerando che questi due enzimi sono coinvolti nella sintesi *de novo* del dTTP, questa condizione suggerisce un punto di vulnerabilità del muscolo nei confronti di mutazioni di p53R2. Gli enzimi catabolici, come atteso, non subiscono particolari variazioni con il differenziamento (a parte la deossinucleotidasi citosolica, che è molto espressa nei mioblasti) e tendono ad essere meno espressi nel tessuto differenziato. Questi dati sono il frutto di un'analisi preliminare in cui il confronto è stato fatto tra miotubi e tessuti interi di muscolo scheletrico. Nel laboratorio che collabora con noi è stata messa a punto una tecnica per isolare le singole fibre da campioni di tessuto muscolare e nei prossimi esperimenti è in previsione un confronto tra miotubi e singole fibre.

In conclusione, il profilo di espressione che emerge da questa prima analisi di *microarray* ci permette di affermare che i miotubi di C2C12 rappresentano un buon modello per riprodurre il muscolo scheletrico.

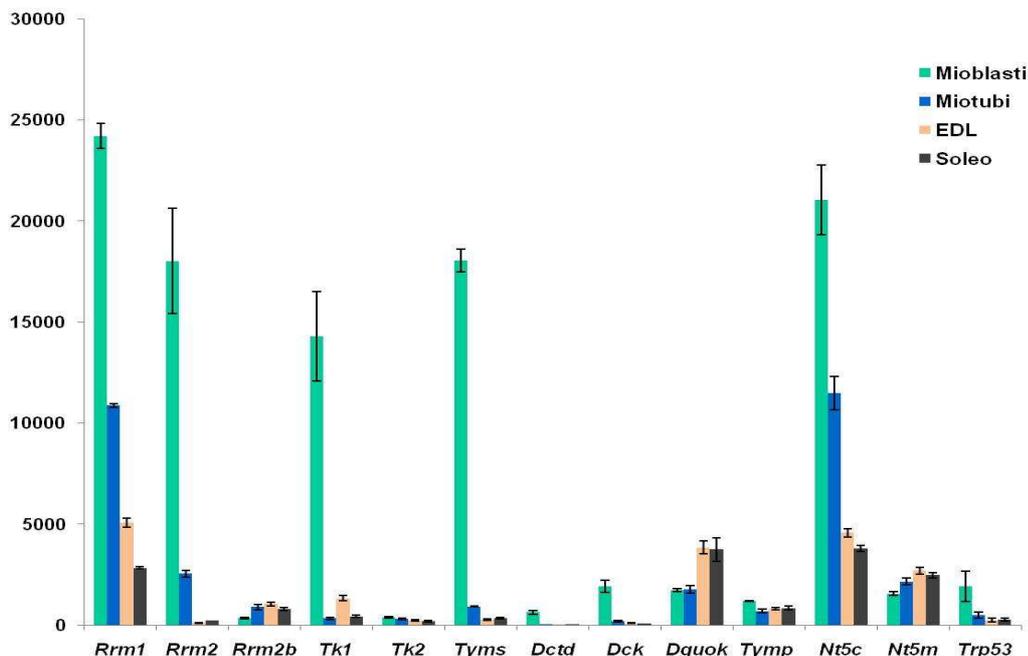


Figura 14. Analisi di *microarray*. In ascisse sono riportati i nomi dei geni analizzati. I geni *Rrm1*, *Rrm2* e *Rrm2b* codificano rispettivamente per le subunità R1, R2 e p53R2 della ribonucleotide reduttasi; *Tk1* e *Tk2* codificano per la timidina chinasi citosolica e mitocondriale rispettivamente; *Tyms*, gene che esprime l'enzima timidilato sintasi; *Dctd* codifica la dCMP deaminasi; *Dck* codifica la deossicitidina chinasi; *Dguok*, gene della deossiguanosina chinasi; *Tymp*, gene della timidina fosforilasi; *Nt5c* e *Nt5m* codificano rispettivamente per la deossinucleotidasi citosolica (cdN) e mitocondriale (mdN); *Trp53* codifica p53. La piattaforma utilizzata è *Microarray Agilent Mouse WholeGenome 4x44k*. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, partendo da tre diverse aliquote di RNA marcate in modo indipendente (repliche tecniche). Le immagini ottenute dalla scansione dei vetrini sono state processate con il software Feature Extraction™ v 10.5.1 (Agilent) per acquisire i valori di fluorescenza. Per la normalizzazione dei dati è stato utilizzato il software *Expander* che esegue una normalizzazione per quantili. Il grafico mostra i valori normalizzati delle intensità per i geni selezionati e le barre si riferiscono all'errore standard dei tre esperimenti.

4.3 Silenziamento della TK2 e di p53R2 durante il differenziamento di cellule C2C12

Una volta attestata la validità del nostro modello cellulare di muscolo scheletrico il passo successivo è stato quello di cercare di simulare *in vitro* le MDS miopatiche correlate a mutazioni di p53R2 e della TK2. Per fare questo, ci siamo proposti di silenziare l'uno o l'altro di questi geni durante il differenziamento dei mioblasti in miotubi. L'obiettivo era di ottenere un fenotipo di deplezione del mtDNA, da cui partire con l'indagine nel

metabolismo dei dNTP di possibili condizioni determinanti per l'insorgenza di MDS nel tessuto muscolare.

Abbiamo provato diversi approcci di silenziamento, valutandoli principalmente secondo due criteri: l'efficienza di silenziamento e la qualità del differenziamento dei miotubi silenziati. La prima tecnica utilizzata è stata la trasfezione dei mioblasti con plasmidi contenenti una sequenza codificante per shRNA specifici per i geni di nostro interesse. Il vantaggio di questo metodo è che consente l'isolamento di cloni stabili. Tuttavia, abbiamo riscontrato un'elevata eterogeneità tra i diversi cloni e in generale una scarsa qualità di differenziamento. La procedura di isolamento dei cloni rappresenta un elemento critico per la capacità di differenziamento delle C2C12, in quanto le cellule si ritrovano a crescere in stretto contatto tra loro e a subire numerosi passaggi in coltura; entrambe le condizioni influiscono negativamente sul potenziale differenziativo. Ho quindi provato un'altra strada per silenziare i mioblasti mediante una tecnica di elettroporazione (MicroPorator MP-100), specifica per cellule di mammifero. Questo sistema garantisce un'elevata efficienza di trasfezione e infatti, in esperimenti di controllo con GFP ho ottenuto il 90% di cellule trasfettate. Tuttavia, quando ho utilizzato il plasmide shRNA, la percentuale di silenziamento non superava il 50-60%; un risultato insoddisfacente per i nostri scopi, perché la presenza di una porzione così elevata di cellule non silenziate o poco silenziate avrebbe sicuramente mascherato gli effetti del silenziamento sul metabolismo dei dNTP. L'approccio più promettente è stata la trasfezione con *Stealth siRNA* (Invitrogen). Con questa tecnica ho ottenuto un silenziamento dell' 80-90% per p53R2 e del 60-70% per la TK2.

A questo punto mi sono dedicata all'elaborazione di un protocollo che combinasse silenziamento e differenziamento delle C2C12. Mi trovavo a dover soddisfare due condizioni importanti, da un lato dovevo garantire un buon differenziamento e dall'altro dovevo assicurare un'elevata efficienza di silenziamento che durasse per almeno dieci giorni di coltura. Per ottenere miotubi ben differenziati con le C2C12 è necessaria la sostituzione quotidiana del terreno di differenziamento, tuttavia in un protocollo di silenziamento con siRNA il frequente rinnovo del terreno di coltura rischierebbe di ridurre progressivamente l'efficienza. Dopo una

serie di tentativi, ho trovato il giusto compromesso con la procedura elencata di seguito:

- Giorno 0: Semina
- Giorno 1: -
- Giorno 2: Trasfezione in terreno di crescita (10% FBS)
- Giorno 3: -
- Giorno 4: Trasfezione in terreno di differenziamento (2% siero di cavallo)
- Giorno 5: -
- Giorno 6: Sostituzione di metà del mezzo di coltura con terreno fresco (2% siero di cavallo)
- Giorno 7: -
- Giorno 8: Sostituzione completa del terreno (nei giorni successivi fino al termine dell'esperimento)

Con la trasfezione il differenziamento procede in modo più lento rispetto a cellule non trattate, con un ritardo di un giorno o due nelle fasi iniziali, tuttavia si forma una rete interconnessa di miotubi che esibisce una frequente attività contrattile. Dal punto di vista morfologico i miotubi sono molto più sottili rispetto alle colture non trasfettate (Figura 15). Sin dal primo esperimento è emersa un'evidente differenza fenotipica tra i due silenziamenti: i miotubi silenziati per la TK2 iniziano a staccarsi dal supporto al quarto giorno di differenziamento, mentre quelli silenziati per p53R2 resistono in coltura fino al settimo-ottavo giorno.

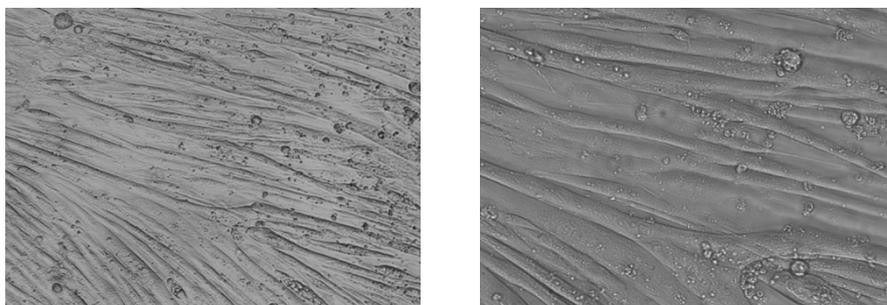


Figura 15. Coltura di C2C12 trasfettata a 7 giorni di differenziamento con siRNA per p53R2. Le foto corrispondono ad uno stesso campo preso ad ingrandimenti diversi. Contrasto di fase, ingrandimento 20X per la foto a sinistra e 40X per quella a destra.

In Figura 16 si può osservare la progressiva espansione del mtDNA nei controlli a 4, 7 e 8 giorni di differenziamento. La quantità del mtDNA risulta ridotta in modo significativo nei miotubi silenziati per la TK2, con una deplezione di circa il 50% a soli 4 giorni di differenziamento mentre, quando è p53R2 ad essere silenziata, gli effetti sul mtDNA iniziano a manifestarsi all'ottavo giorno di differenziamento (Figura 16). Questa diversa incidenza sul mtDNA potrebbe dare ragione della ridotta resistenza dei miotubi TK2^{-/-} in coltura. Una differenza temporale nella manifestazione fenotipica è stata osservata anche tra i topi TK2^{-/-} (Zhou *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2008) e p53R2^{-/-} (Kimura *et al.*, 2003), i primi iniziano a mostrare sintomi a 7 giorni dalla nascita, mentre i secondi a 8 settimane.

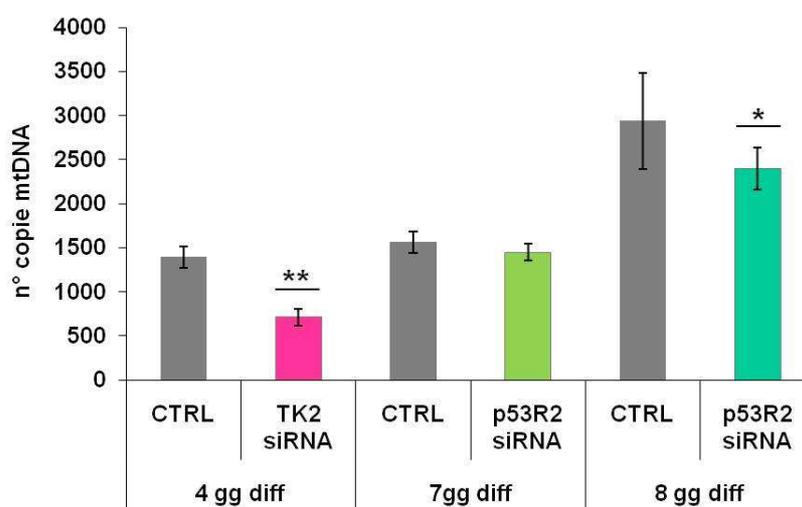


Figura 16. Numero di copie di mtDNA nei miotubi di controllo e silenziati. CTRL, miotubi trasfettati con siRNA di controllo; TK2 siRNA e p53R2 siRNA, miotubi silenziati con siRNA rispettivamente per TK2 e p53R2. DNA estratto da miotubi purificati a 4 giorni di differenziamento (4 gg diff) per il silenziamento della TK2 e a 7 e 8 giorni di differenziamento per p53R2. I valori rappresentano la quantità di copie del gene mitocondriale COX1 corretta per il gene nucleare ACTINA β . I dati provengono dall'analisi di due esperimenti diversi per il silenziamento della TK2 e di un esperimento, a giorni diversi di differenziamento, per il silenziamento di p53R2. Ciascun silenziamento è stato misurato in quadruplo. *Real-time* PCR quantitativa eseguita con sistema Taqman (materiali e metodi, paragrafo 3.4). I valori corrispondono a media \pm deviazione standard di due esperimenti diversi per il silenziamento della TK2 e media \pm deviazione standard di quattro repliche tecniche per p53R2. **P<0.01, *P<0.05 rispetto al controllo corrispondente.

La soglia di tolleranza per una deficienza della TK2 sembra essere molto più bassa rispetto a quella per p53R2, con effetti più repentini sulla sintesi del mtDNA. Sarebbe interessante capire se la deplezione osservata nei miotubi silenziati per la TK2 è il risultato di una mancata espansione del mtDNA durante il differenziamento o di una successiva riduzione del contenuto di copie del genoma mitocondriale. A questo proposito sarebbe opportuno fare una curva di quantificazione del mtDNA a diversi giorni di differenziamento con silenziamento. Per quanto riguarda p53R2, si può presumere che mantenendo i miotubi più giorni in coltura l'effetto del silenziamento sul mtDNA diventerebbe più consistente, tuttavia 8 giorni di differenziamento rappresentano già una condizione limite per le C2C12, che generalmente resistono adese al supporto fino a 8-10 giorni. Nel caso del silenziamento entrano in gioco anche fenomeni di tossicità intrinseci al trattamento di trasfezione.

Nonostante i dati necessitino di essere confermati con altri esperimenti, c'è una forte indicazione di deplezione del mtDNA che ci rende ottimisti sull'utilizzo di questo modello cellulare per lo studio delle MDS miopatiche.

4.3.1 Effetti del silenziamento sul metabolismo dei dNTP

Dopo aver valutato gli effetti del silenziamento sul mtDNA ho misurato l'espressione dei geni del metabolismo dei dNTP per vedere se ci fosse una modificazione dei profili di espressione. In Figura 17 sono riportati i livelli di mRNA dei geni di nostro interesse. Non si osserva nessuna differenza significativa tra silenziati e controlli. Eccetto nei campioni silenziati per la TK2 dove i valori di espressione di R2 e TK1 sono più alti rispetto ai controlli e ai campioni silenziati per p53R2 (7-8 giorni di differenziamento). Questa differenza si può attribuire al fatto che nelle colture a 4 giorni di differenziamento c'è una presenza più elevata di cellule non fuse. Inoltre, considerando la tendenza dei miotubi TK2⁻ a staccarsi dalla piastra di coltura, la riduzione della densità cellulare potrebbe stimolare la frazione di mioblasti a proliferare. Si può quindi presumere che vi sia una maggior contaminazione di cellule mononucleate nella frazione di miotubi purificati. Infatti, l'efficienza con cui

miotubi e mioblasti si separano nei campioni trattati per la trasfezione è inferiore rispetto a quella osservata nelle colture non trasfettate, sia nei controlli che nei silenziati. I mioblasti si attaccano in minor misura e meno velocemente al fondo della piastra di coltura e di conseguenza una frazione consistente di essi resta in sospensione con i miotubi. E' possibile che questo diverso comportamento rispetto alle cellule non trasfettate sia una conseguenza di alterazioni della membrana plasmatica dovute al trattamento con le lipofectamine.

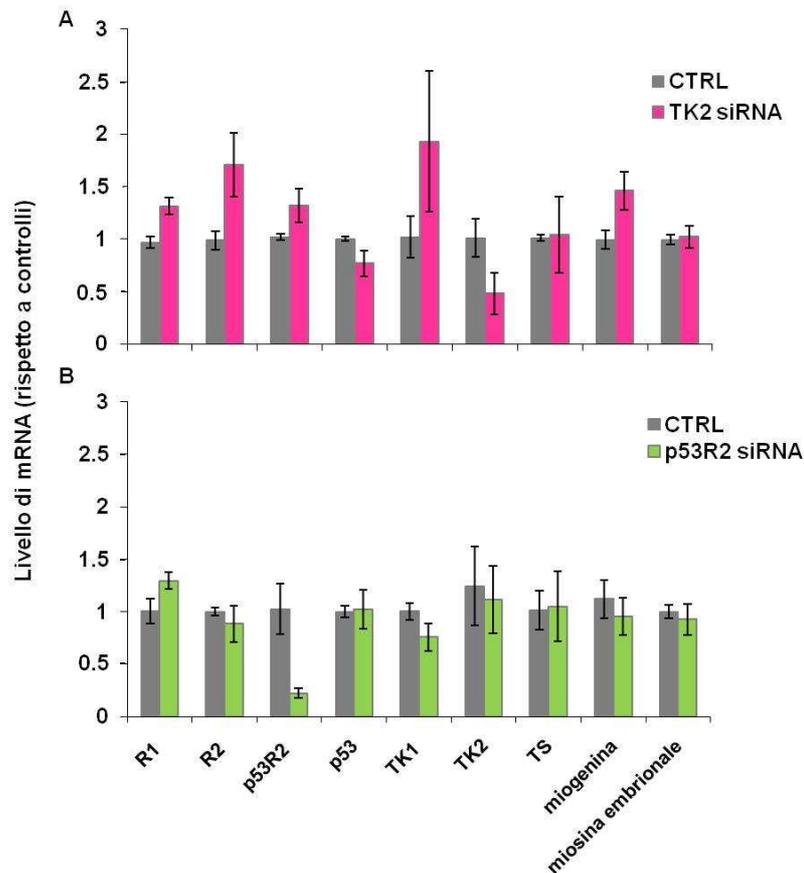


Figura 17. Espressione delle componenti della sintesi *de novo* e di recupero del dTTP e dei marcatori di differenziamento. Variazione di espressione nei miotubi silenziati rispetto ai rispettivi controlli (CTRL). *Real-time PCR* condotta su cDNA di cellule trasfettate con siRNA di controllo (a 4 e 7-8 giorni di differenziamento), (A) con siRNA per la TK2 (4 giorni differenziamento), (B) con siRNA per p53R2 (7-8 giorni di differenziamento). Il gene Rplp0 (*ribosomal protein large P0*) è stato usato come referenza per l'analisi di espressione come suggerito da Stern-Straeter *et al.*, 2009. I valori sono medie di due esperimenti indipendenti a 4gg di differenziamento per il silenziamento della TK2 e a 7-8 gg di differenziamento per il silenziamento di p53R2 misurati in triplo \pm deviazione standard.

Nonostante queste variabili, non ci sono indicazioni a favore di un meccanismo di compensazione trascrizionale per la deficienza di p53R2 e TK2 nell'espressione dei geni del metabolismo dei dNTP. Sarà comunque necessario ripetere gli esperimenti per stabilire come le variabili introdotte con la procedura di trasfezione incidano sui risultati.

A questo punto eravamo curiosi di vedere se era possibile riscontrare degli sbilanciamenti nei *pool* dei dNTP delle cellule silenziate, dai quali poter speculare sui possibili meccanismi molecolari alla base della deplezione di mtDNA osservata. In Tabella 16 sono riportati i dati preliminari ottenuti da singoli esperimenti, che vanno ripetuti; perciò, non è possibile trarre delle conclusioni da questi risultati. Ho effettuato le misurazioni dei *pool* in doppio, ripetendo i saggi due volte, in questo modo mi sono assicurata della riproducibilità di queste determinazioni.

Pool cellulari totali (pmol/ NaOH Abs. 260nm)				
Campioni	dTTP	dCTP	dGTP	dATP
4 gg diff				
CTRL	4.77	6.72	0.79	2.96
siRNA TK2	3	4.53	0.45	2.82
8 gg diff				
CTRL	1.72	1.89	0.51	1.6
siRNA p53R2	1.1	0.98	0.28	0.95

Tabella 16. Determinazione dei *pool* cellulari totali dei dNTP nei miotubi silenzianti. L'analisi dei *pool* è stata fatta su estratti di miotubi purificati di controllo (CTRL, a 4 o 8 giorni di differenziamento) e silenzianti con siRNA per la TK2 (a 4 giorni di differenziamento) o per p53R2 (8 giorni differenziamento). I *pool* sono stati normalizzati per il contenuto di macromolecole delle cellule, dissolto in NaOH e stimato dalla lettura di assorbanza (Abs.) a 260 nm della soluzione. I valori provengono da determinazioni eseguite in doppio e ripetute due volte di un solo esperimento.

I controlli a quattro giorni di differenziamento hanno un contenuto di nucleotidi paragonabile a quello dei miotubi non trasfettati a otto giorni di differenziamento (Tabella 14), ad eccezione del *pool* del dTTP, che nei controlli trasfettati è 3 volte maggiore. A otto giorni di differenziamento i *pool* dei controlli sono tutti ribassati e questa volta differiscono dai miotubi non trasfettati per un contenuto di dCTP inferiore di circa 3.5 volte. Il generale calo dei *pool* osservato nei controlli potrebbe essere un effetto

della trasfezione prolungata oppure una riduzione conseguente all'avanzare del differenziamento. Nei miotubi silenziati per la TK2 i *pool* del dTTP, dCTP e dGTP risultano ridotti di circa un 40% rispetto ai controlli, mentre i silenziati per p53R2 presentano tutti i *pool* ribassati di circa un 40-50% (Tabella 16).

Come osservato nell'analisi di *microarray*, i livelli di dCK sono estremamente bassi nel muscolo scheletrico e, dato che la deossicitidina è un substrato della TK2, è possibile che un difetto in quest'ultima abbia ripercussioni anche sul *pool* del dCTP; risulta quindi plausibile una riduzione di quest'ultimo oltre a quella attesa del dTTP. La riduzione del *pool* del dGTP potrebbe essere una conseguenza della regolazione allosterica della RNR (Tabella 1): il legame del dTTP al sito di specificità determina infatti la riduzione di GDP a dGDP e, quindi, un calo del dTTP avrà effetti anche sul *pool* del dGTP. La regolazione allosterica prevede anche una riduzione del *pool* del dATP in risposta ad una carenza di dGTP, tuttavia il dATP non mostra alcuna variazione in seguito al silenziamento della TK2; questa spiegazione è quindi poco probabile. Il ribasso generale osservato nei *pool* dei miotubi silenziati per p53R2 si può giustificare considerando che la RNR è coinvolta nella sintesi di tutti i 4 dNTP. Tuttavia, è difficile spiegare come mai a fronte di un'uguale riduzione del dTTP del 40% nei due silenziati, ci siano effetti così diversi sul mtDNA. E' possibile che il contenuto del dTTP nei miotubi TK2⁻ sia mascherato dalla presenza di una forte contaminazione di mioblasti, nei dati di espressione infatti il livello degli mRNA di R2 e TK1 sono più elevati rispetto ai controlli e ai silenziati per p53R2 (Figura 17). Non è da escludere che nei miotubi trasfettati le membrane cellulari siano meno resistenti rispetto ai non trasfettati e che subiscano danni durante il processo di purificazione, con conseguente perdita di nucleotidi. Sarà opportuno ripetere questi esperimenti provando ad estrarre i *pool* totali direttamente dalle colture differenziate, per vedere se è possibile individuare comunque l'effetto del silenziamento sul contenuto di dNTP. In questo modo, si eviterebbe di introdurre la variabilità dovuta alla scarsa efficienza di separazione dei miotubi (contaminazioni variabili di mioblasti) e alla possibile rottura delle cellule durante i vari passaggi di purificazione (perdita di nucleotidi).

In conclusione a questi esperimenti di silenziamento possiamo affermare di aver ottenuto un modello cellulare per le MDS miopatiche in cui si osserva deplezione del mtDNA. I dati ottenuti sui livelli di espressione degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei dNTP suggeriscono l'assenza di un meccanismo di compensazione. Le prime determinazioni dei *pool* non ci hanno permesso finora di chiarire le basi molecolari del fenotipo osservato e gli esperimenti andranno sicuramente ripetuti. Sarà necessario modificare la preparazione dei campioni dalle cellule trasfettate per avere una determinazione più affidabile del loro contenuto di dNTP. Inoltre, abbiamo intenzione di condurre ulteriori indagini per caratterizzare in modo più approfondito i fenotipi di questi silenziamenti e per comprendere meglio i meccanismi che li sottendono.

5. CONCLUSIONI

Comprendere la tessuto-specificità delle MDS, cioè individuare il motivo per cui alcuni tessuti non risentono di mutazioni in geni nucleari espressi ubiquitariamente, rappresenta una sfida importante. Da un lato permetterebbe di affinare le conoscenze sulle basi molecolari che rendono plastici e modulabili processi metabolici fondamentali per la cellula, come la sintesi dei precursori del DNA, per i quali si potrebbe immaginare una limitata variabilità di funzionamento tra tipi cellulari diversi; dall'altro, l'acquisizione di nuove conoscenze sull'eziologia di queste patologie consentirebbe di sviluppare delle terapie mirate per i tessuti affetti.

La deficienza della TK2 o di p53R2 determina l'insorgenza di gravi forme di MDS che colpiscono primariamente il muscolo scheletrico. Entrambe queste proteine assumono un ruolo importante per la sintesi dei dNTP in cellule post-mitotiche. Al di fuori della fase S infatti, il metabolismo dei nucleotidi si modifica (degradazione proteolitica di R2 e TK1 in tarda mitosi) per adattarsi alla ridotta richiesta di precursori, limitata alla replicazione del mtDNA e alla sintesi riparativa. In questo contesto la TK2 è l'unico enzima responsabile della sintesi di recupero del dTTP e p53R2 è l'unica subunità minore della ribonucleotide reduttasi presente che può combinarsi con la subunità R1 e garantire la sintesi *de novo* in cellule quiescenti o differenziate.

I fibroblasti di pelle generalmente non risentono di difetti genetici che in altri tessuti determinano l'insorgenza di patologie mitocondriali e, molto probabilmente, la loro scarsa sensibilità è legata alla bassa richiesta energetica di questo tipo cellulare rispetto ai tessuti più colpiti, quali muscolo, fegato e cervello. Di conseguenza, ci sono sembrati un buon modello cellulare in cui studiare le potenzialità di adattamento delle cellule per affrontare una situazione sfavorevole, di deficienza enzimatica, correlata all'insorgenza di MDS miopatiche.

Ho utilizzato dei fibroblasti provenienti da due pazienti eterozigoti composti per mutazioni diverse della TK2. Ho caratterizzato il metabolismo del dTTP in colture quiescenti di queste linee cellulari, cercando di individuare possibili meccanismi di compensazione per la ridotta attività della TK2. Nonostante le due linee mutanti presentino una marcata riduzione di

attività timidino-chinasica misurata in estratti cellulari, le dimensioni dei *pool* del dTTP e degli altri dNTP non mostrano alterazioni rispetto ai controlli *wild-type*. Non sono emerse evidenze a favore di un adattamento del *network* enzimatico coinvolto nella sintesi dei nucleotidi: nei fibroblasti mutanti non c'è una maggiore dipendenza dalla via *de novo* per la sintesi del dTTP e nemmeno una riduzione delle attività cataboliche. In forte contrasto con la ridotta attività della TK2 misurata negli estratti cellulari, le cellule mutate fosforilano la timidina *in situ* con la stessa efficienza delle cellule *wild-type*: un'attività residua molto bassa della TK2 è sufficiente a soddisfare le necessità della sintesi del dTTP senza alterazioni del metabolismo e del contenuto del mtDNA. Ciò che è emerso da questo mio lavoro è la presenza di un contenuto di TK2 nei fibroblasti selvatici largamente superiore alle necessità della cellula e solo una piccola percentuale dell'attività potenziale dell'enzima sembra sufficiente a mantenere il *pool* del dTTP. Questo surplus enzimatico potrebbe essere insufficiente a sostenere le elevate quantità di genoma mitocondriale nelle cellule muscolari, in cui è presente un'alta richiesta energetica e spiegherebbe la maggior sensibilità del muscolo a difetti della TK2.

In fibroblasti provenienti da un paziente omozigote per una mutazione missenso nel gene di p53R2, l'assenza di deplezione del mtDNA è stata attribuita ad un sistema di compensazione che vede una riduzione delle vie cataboliche attraverso i *substrate cycle* regolativi delle vie di sintesi di recupero dei dNTP (Pontarin *et al.*, 2011 in pubblicazione). Il diverso impatto sui fibroblasti osservato, a seconda che la mutazione sia a carico della TK2 o di p53R2, suggerisce una dipendenza diversa di questo tipo cellulare nei confronti delle due proteine.

Le malattie mitocondriali spesso mostrano un'elevata variabilità fenotipica e più volte è stata riportata la mancanza di una correlazione diretta tra difetto genetico (mitocondriale o nucleare) e manifestazioni patologiche delle malattie mitocondriali (Rossignol *et al.*, 2003). Diversi studi hanno mostrato che spesso il fenotipo di difetti genetici che colpiscono la catena respiratoria si manifesta con un effetto soglia e questa soglia può variare tra pazienti diversi o tra tessuti diversi di uno stesso individuo. Questo fenomeno è stato denominato effetto soglia del fenotipo mitocondriale. L'effetto soglia può dipendere da meccanismi di compensazione a livello

trascrizionale o traduzionale, a livello delle attività enzimatiche (soglia biochimica), oppure a livello dell'attività respiratoria (bilanciamento tra glicolisi e fosforilazione ossidativa in funzione della richiesta energetica e della disponibilità del substrato). Tra i meccanismi proposti per la soglia biochimica, rientra la presenza di una riserva di attività enzimatica, in accordo con il surplus di TK2 osservato nei fibroblasti, e la modulazione di un *network* enzimatico, come osservato nei *substrate cycle* regolativi dei fibroblasti p53R2`.

Il passo successivo per comprendere i motivi della tessuto-specificità delle MDS miopatiche è stato quello di rivolgere l'attenzione ad un tipo cellulare bersaglio di queste patologie, le cellule muscolari. Ho quindi iniziato a lavorare con la linea di mioblasti murini C2C12. Ho ottimizzato le condizioni di differenziamento dei mioblasti ottenendo colture ben differenziate di miotubi multinucleati che mostrano un'elevata attività contrattile. Tuttavia, è sempre presente una porzione di cellule mononucleate non fuse. Ho quindi sviluppato un protocollo che consente la purificazione della frazione di miotubi da una coltura differenziata, minimizzando l'interferenza dovuta alle cellule mononucleate non fuse. La purezza delle frazioni è stata verificata misurando l'attività della timidina chinasi citosolica (TK1), un indicatore di proliferazione per noi significativo in quanto la sua presenza rappresenta un fattore di disturbo per lo studio del metabolismo dei nucleotidi nelle cellule differenziate. Con questa procedura ho potuto verificare che effettivamente i mioblasti non fusi contengono attività TK1, rimane da stabilire se possiedono già delle caratteristiche di cellule differenziate.

Ho caratterizzato le vie biosintetiche dei nucleotidi ponendo particolare attenzione alle modificazioni che si instaurano con il differenziamento dei mioblasti in miotubi, alla ricerca di eventuali differenze rispetto a quanto già osservato in fibroblasti di pelle al passaggio dalla proliferazione alla quiescenza. La differenza che spicca maggiormente da questo confronto è la presenza di un'attività molto bassa della TK2, che non aumenta con il differenziamento.

La stretta similarità osservata in analisi di *microarray* tra i profili di espressione dei geni del metabolismo dei dNTP in cellule C2C12 e in due tipi di muscolo scheletrico di topo, ha confermato l'idoneità del nostro

modello cellulare a rappresentare il tessuto muscolare. Abbiamo quindi cercato di simulare *in vitro* le MDS miopatiche dovute a mutazioni di p53R2 e TK2 mediante esperimenti di *RNA interference*. Ho provato a trasfettare le cellule con plasmidi contenenti delle sequenze shRNA ottenendo però un livello di silenziamento insoddisfacente. L'utilizzo di siRNA *Stealth* e la messa a punto di un protocollo che combinasse trasfezione e differenziamento mi ha permesso di ottenere miotubi con un silenziamento dell'80-90% per p53R2 e del 60-70% per la TK2. A questo grado di silenziamento corrisponde una deplezione del mtDNA del 50% nei miotubi silenziati per la TK2 a soli 4 giorni di differenziamento e una forte indicazione di deplezione nei miotubi silenziati per p53R2 a 8 giorni di differenziamento. Un risultato entusiasmante per noi, perché per la prima volta abbiamo ottenuto un modello di MDS miopatica che manifesta deplezione del mtDNA *in vitro*, una piattaforma su cui poter indagare i motivi della tessuto-specificità di queste patologie, con tutti i vantaggi sperimentali offerti dall'utilizzo di una linea cellulare.

In questi esperimenti preliminari è emersa una diversa modalità temporale con cui si manifesta la deplezione del mtDNA nei due tipi di silenziamento, in accordo con quanto osservato nei topi TK2^{-/-} (Zhou *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2008) e p53R2^{-/-} (Kimura *et al.*, 2003), i primi iniziano a mostrare sintomi a 7 giorni dalla nascita, mentre i secondi a 8 settimane. Non ho riscontrato differenze tra controlli e silenziati nell'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei dNTP. Perciò, nelle cellule muscolari, come nei fibroblasti mutanti per la TK2 (Frangini *et al.*, 2009) o per p53R2 (Pontarin *et al.*, 2011 in pubblicazione), ci sono evidenze che inducono ad escludere l'esistenza di un meccanismo di espressione genica che sia sensibile all'assenza di un'attività enzimatica appartenente al *network* regolativo della sintesi dei dNTP.

Le determinazioni dei *pool* nucleotidici non ci hanno permesso finora di chiarire le basi molecolari del fenotipo osservato, il contenuto di dNTP nelle cellule differenziate è molto basso e con il silenziamento si ha una riduzione ulteriore di queste quantità. Perciò, per avere delle stime affidabili sarà necessario introdurre dei miglioramenti nella preparazione dei campioni per l'estrazione dei *pool* totali dalle cellule trasfettate e ripetere gli esperimenti parecchie volte. Tuttavia, siamo consapevoli delle

potenzialità di questo modello sperimentale che ha aperto il nostro orizzonte offrendoci numerose prospettive di lavoro.

Sarà interessante misurare il contenuto di mtDNA a diversi giorni di differenziamento con silenziamento, per capire se la deplezione osservata nei miotubi silenziati per la TK2 è il risultato di una mancata espansione del mtDNA durante il differenziamento o di una successiva riduzione del contenuto di copie del genoma mitocondriale. A questo proposito, sarà utile verificare se intervengono fenomeni di mitofagia nel processo di deplezione del mtDNA.

Per capire se il basso contenuto di attività dCK presente nel muscolo scheletrico contribuisce a rendere questo tessuto vulnerabile a difetti della TK2, si potrà fornire alle cellule silenziata deossicitidina (sfruttando la via di sintesi del dTTP a partire dal dCMP) e osservare se ci sono effetti di complementazione nel *pool* del dTTP.

Una conferma che il fenotipo di deplezione osservato in queste cellule dipende esclusivamente dal silenziamento della TK2 o di p53R2 potrà provenire dal silenziamento nei miotubi della dGK. Difetti in questo enzima infatti colpiscono fegato e cervello, ma non il muscolo scheletrico.

Una caratterizzazione più approfondita del fenotipo dei miotubi silenziati, sia per la TK2 che per p53R2, prevede la misurazione del consumo di ossigeno per verificare se la deplezione ha effetti sulle funzionalità degli enzimi della catena respiratoria, come spesso accade nelle MDS.

Sono inoltre in programma esperimenti di trans-differenziamento di fibroblasti di pelle in mioblasti. In questo modo, utilizzando i fibroblasti di pazienti mutanti per la TK2 o per p53R2, si avrebbe un modello di MDS in cellule muscolari senza i limiti determinati dalla tossicità intrinseca ai protocolli di trasfezione. Un grande vantaggio offerto da questo sistema è quello di studiare gli effetti delle mutazioni in condizioni di differenziamento diverse, ottenute a partire da uno stesso corredo genetico.

6. RIASSUNTO

Il DNA mitocondriale (mtDNA), a differenza di quello nucleare, è sottoposto ad un continuo *turnover* e si replica lungo tutto il ciclo cellulare. Affinché la sintesi e la riparazione del DNA avvengano correttamente è necessario che vi sia un apporto bilanciato di deossiribonucleosidi trifosfato (dNTP). Le cellule di mammifero contengono due *pool* di dNTP separati, uno citosolico e uno mitocondriale, che si trovano in comunicazione tra loro e il cui mantenimento avviene attraverso due vie di sintesi: la via *de novo* e la via di recupero citosolica e mitocondriale. Nelle cellule proliferanti il dTTP è sintetizzato principalmente nel citosol attraverso la via *de novo* il cui enzima chiave è la ribonucleotide reduttasi (RNR), in fase S costituita dalle subunità R1/R2, e in misura minore dalla via di recupero di deossiribonucleosidi, dove la timidina viene fosforilata a dTMP dalla timidina chinasi citosolica (TK1). All'interno delle cellule la TK1 ha un'attività cento volte superiore a quella della timidina chinasi mitocondriale (TK2) e perciò il suo ruolo è predominante nella sintesi di recupero della timidina in fase S. Le vie anaboliche sono bilanciate dalle vie cataboliche catalizzate dalla timidina fosforilasi (TP), che degrada la timidina a deossiuridina, e dalle deossinucleotidasi citosolica (cdN) e mitocondriale (mdN), che convertono il dTMP in timidina costituendo un *substrate cycle* regolativo rispettivamente con la TK1 e la TK2. Sia la subunità R2 della RNR che la TK1 sono regolate con il ciclo cellulare e subiscono una degradazione proteolitica in tarda mitosi. Nelle cellule non ciclanti la sintesi *de novo* si riduce ad un 2% di quella presente in condizioni di proliferazione e dipende da R1/p53R2, mentre la timidina chinasi mitocondriale, TK2, è l'unico enzima responsabile della fosforilazione della timidina nella sintesi di recupero del dTTP. Il risultato di questa riorganizzazione comporta un ridimensionamento dei *pool* nucleotidici citoplasmatici e mitocondriali, che si riducono entrambi di circa 10 volte nelle cellule di mammifero quiescenti. In questo modo le cellule ricalibrano la produzione dei dNTP in funzione del ridotto consumo di precursori, limitato alla replicazione del mtDNA (una piccola percentuale rispetto al DNA totale).

In questo contesto i ruoli della TK2 e di p53R2 assumono notevole rilevanza e ciò è dimostrato dal fatto che mutazioni in questi enzimi causano patologie caratterizzate da deplezione del mtDNA (sindromi da deplezione del mtDNA o MDS). Esse rappresentano una classe di malattie mitocondriali ereditarie, a trasmissione autosomica recessiva, clinicamente eterogenea e caratterizzata da una riduzione quantitativa del numero di copie di mtDNA e sono causate da mutazioni in geni nucleari codificanti proteine coinvolte nel metabolismo dei dNTP o nella replicazione del mtDNA. Le MDS sono caratterizzate da un'elevata tessuto-specificità e interessano tessuti differenziati, dove le cellule non sono in attiva proliferazione. L'inattivazione genica della TK2 o di p53R2 è correlata all'insorgenza di una forma miopatica di MDS, in cui il muscolo è il principale tessuto colpito. La patologia è stata attribuita ad uno sbilanciamento dei *pool* dei dNTP nei tessuti affetti.

Lo scopo del mio lavoro di dottorato è quello di individuare le basi molecolari che determinano la tessuto-specificità nelle MDS miopatiche dovute a mutazioni della TK2 o di p53R2. Nella prima parte mi sono dedicata allo studio di colture quiescenti di fibroblasti di pelle provenienti da pazienti con deficienza della TK2. Il mio obiettivo era quello di capire se nei tipi cellulari non colpiti dalla miopatia, come i fibroblasti, ci fossero dei meccanismi di compensazione in grado di tamponare gli effetti di una ridotta attività della timidina chinasi mitocondriale. Nella seconda parte mi sono dedicata allo studio di un modello di cellule muscolari differenziate in coltura, per cercare di individuare che cosa rende il tessuto muscolare così vulnerabile all'inattivazione di TK2 e p53R2. Nel confronto di questi due modelli cellulari abbiamo mirato all'individuazione di elementi divergenti che potessero costituire punti di fragilità del muscolo rispetto a una deficienza genetica delle due proteine.

In cellule proliferanti la deficienza della TK2 o di p53R2 è ininfluenza per il mantenimento del *pool* mitocondriale del dTTP, prodotto principalmente nel citosol attraverso l'attività di R1/R2 e della TK1. Di conseguenza ho eseguito tutti gli esperimenti in colture quiescenti o differenziate, in cui il mantenimento del *pool* del dTTP è garantito dall'attività della TK2 e della via *de novo* catalizzata da R1/p53R2.

Nei fibroblasti la quiescenza è stata indotta in colture confluenti riducendo la percentuale di siero nel mezzo di coltura dal 10% allo 0.1% e mantenendo le cellule in condizioni quiescenti per 10 giorni, prima di eseguire gli esperimenti. Ho studiato colture quiescenti di due linee di fibroblasti di pelle provenienti da pazienti (Pa e Pb), genotipicamente distinti, portatori di mutazioni in eterozigosi nel gene della TK2 (T77M/R161K e R152G/ K171del). Le due linee di pazienti sono state confrontate con due linee di fibroblasti di controllo (Ca e Cb) provenienti da biopsie di soggetti sani di età corrispondente. Ho misurato l'attività enzimatica della TK2 negli estratti cellulari. Le cellule dei pazienti mostrano una notevole riduzione di attività TK2, gli estratti Pa hanno un'attività TK2 più bassa (circa il 5% dei controlli) rispetto agli estratti Pb (circa il 40% dei controlli). Tuttavia a questa riduzione di attività enzimatica della TK2 non corrisponde uno sbilanciamento dei *pool* dei dNTP: le dimensioni dei *pool* citosolici e mitocondriali del dTTP sono paragonabili a quelle dei controlli e anche la composizione dei *pool* dei quattro dNTP non subisce modificazioni. Ricercando possibili meccanismi che potessero compensare la deficienza della TK2 nelle linee mutanti, ho misurato le attività enzimatiche della timidina fosforilasi e delle deossinucleotidasi e l'espressione delle tre subunità della RNR, valutata a livello di mRNA mediante *real-time* PCR e a livello proteico mediante *western blot*. Nelle linee mutate non ho ritrovato meccanismi di adattamento metabolico quali una riduzione delle vie cataboliche o una maggior dipendenza dalla via *de novo* di R1/p53R2. Confrontando le dinamiche del *pool* del dTTP nei mutanti e nei controlli, in esperimenti di marcatura con timidina triziata, ho osservato che nonostante la ridotta attività TK2 i mutanti fosforilano il precursore con la stessa efficienza dei controlli. Dall'analisi del *turnover* del dTTP, attraverso esperimenti di *pulse-chase*, risulta che le cellule di controllo sintetizzano il dTTP *in situ* con la stessa efficienza delle cellule mutate, ad un tasso 10 volte inferiore a quello misurato nei saggi enzimatici eseguiti negli estratti proteici. L'espressione della TK2 aumenta in fibroblasti di pelle *wild-type* quiescenti (Rampazzo *et al.*, 2007), ma l'enzima sembra lavorare a livelli inferiori alle sue potenzialità. Dai risultati ottenuti in questo mio lavoro, una piccola percentuale dell'attività potenziale della TK2 sembra venga effettivamente utilizzata per

mantenere il *pool* del dTTP nei fibroblasti *wild-type*. Nelle cellule mutanti, invece, i tassi di fosforilazione *in vitro* (in estratti proteici) e *in situ* (in colture cellulari) non differiscono. Si potrebbe pensare che queste cellule siano in grado di mantenere adeguati livelli del *pool* del dTTP sfruttando completamente la loro attività TK2 residua. Ciò spiegherebbe l'assenza di deplezione del mtDNA riscontrata in queste linee mutate (Frangini *et al.*, 2009).

Nella linea di mioblasti murini C2C12 si può indurre il differenziamento sostituendo il terreno di coltura con un mezzo al 2% di siero di cavallo (terreno di differenziamento) : i mioblasti diventano miociti post-mitotici e si fondono in sincizi multinucleati detti miotubi, che esibiscono attività contrattile. Tuttavia, colture differenziate di C2C12 contengono una frazione significativa di cellule mononucleate, in cui la quantità di dNTP e l'assetto enzimatico differiscono rispetto ai miotubi differenziati. Ho quindi messo a punto un protocollo che permette di separare la frazione di miotubi da quella di mioblasti a partire da una coltura differenziata. La purezza delle frazioni è stata valutata misurando l'attività enzimatica della TK1 (marcatore di cellule proliferanti) e l'espressione di proteine muscolo-specifiche, la miogenina e la miosina, da cui si può stimare il grado di differenziamento. Grazie a questo protocollo di purificazione sono riuscita ad ottenere una frazione di miotubi differenziati in cui la presenza di cellule mononucleate non fuse è minimizzata. Ho quindi svolto una caratterizzazione dei miotubi misurando l'espressione degli enzimi coinvolti nelle vie biosintetiche dei deossinucleotidi, l'attività enzimatica degli enzimi della sintesi di recupero del dTTP e la composizione dei *pool* cellulari totali dei quattro dNTP. Ho preso in esame in particolare le modificazioni che si instaurano con il differenziamento dei mioblasti in miotubi, alla ricerca di eventuali differenze rispetto a quanto già osservato in fibroblasti di pelle al passaggio dalla proliferazione alla quiescenza. La differenza che spicca maggiormente da questo confronto è la presenza di un'attività molto bassa della TK2, che non aumenta con il differenziamento (nei fibroblasti che entrano in quiescenza aumenta invece di circa 3 volte). Dal confronto del modello mioblasti/miotubi con il muscolo scheletrico, effettuato in collaborazione con un altro laboratorio mediante analisi di *microarray*, è emersa una stretta similarità tra i profili di espressione dei

geni del metabolismo dei dNTP nei miotubi e nel muscolo. Abbiamo quindi deciso usare questo modello cellulare per simulare *in vitro* le MDS miopatiche correlate a mutazioni di p53R2 e della TK2. Ho messo a punto un protocollo di trasfezione con *siRNA Stealth* (Invitrogen) che combinasse trasfezione e differenziamento ottenendo un silenziamento dell'80-90% per p53R2 e del 60-70% per la TK2. Nelle C2C12 in coltura il differenziamento determina un'espansione del numero di copie del mtDNA di circa 7-8 volte rispetto ai mioblasti proliferanti, in conseguenza della stimolazione della biogenesi mitocondriale che accompagna la miogenesi. La quantificazione del mtDNA mediante *real-time* PCR quantitativa nei miotubi silenziati per la TK2 mostra una deplezione di circa il 50% a soli 4 giorni di differenziamento; quando è p53R2 ad essere silenziata, gli effetti sul mtDNA iniziano a manifestarsi all'ottavo giorno di differenziamento. Una differenza temporale nella manifestazione fenotipica è stata osservata anche tra i topi TK2^{-/-} (Zhou *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2008) e p53R2^{-/-} (Kimura *et al.*, 2003), i primi iniziano a mostrare sintomi a 7 giorni dalla nascita, mentre i secondi a 8 settimane.

Da questi esperimenti preliminari di silenziamento possiamo affermare di aver ottenuto un modello cellulare per le MDS miopatiche in cui si osserva deplezione del mtDNA. Non emergono indicazioni a favore di un meccanismo di compensazione trascrizionale per la deficienza di p53R2 e TK2 nell'espressione dei geni del metabolismo dei dNTP. Le prime determinazioni dei *pool* dei dNTP nelle colture silenziate non ci hanno permesso finora di chiarire le basi molecolari del fenotipo osservato. Gli esperimenti andranno sicuramente ripetuti. In particolare il procedimento della trasfezione determina una riduzione dell'efficienza di purificazione dei miotubi trasfettati, minando la riproducibilità dei risultati tra esperimenti diversi. Sarà necessario introdurre dei miglioramenti nella preparazione dei campioni per l'estrazione dei *pool* nucleotidici dalle cellule trasfettate per avere una determinazione più affidabile del loro contenuto di dNTP. Prevediamo che ulteriori indagini ci consentiranno di chiarire meglio il fenotipo di questi silenziamenti e di mettere in luce le relazioni tra la deplezione o la mancata espansione del mtDNA durante il differenziamento e la carenza di precursori.

7. SUMMARY

Mitochondrial DNA (mtDNA), in contrast to nuclear DNA, undergoes a continuous turnover and replicates throughout the cell cycle. Cells need a balanced supply of deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) to replicate and repair their DNA properly. Mammalian cells contain two separate pools of dNTPs, a cytosolic-nuclear pool and a mitochondrial pool, which are in communication and are synthesized through two pathways: cytosolic *de novo* synthesis and the salvage pathway (two parallel pathways, one cytosolic and one mitochondrial). In proliferating cells dTTP is predominantly provided by the S-phase specific *de novo* synthesis catalyzed by ribonucleotide reductase (RNR) in the form R1/R2 and secondarily by the cytosolic salvage pathway, where thymidine is phosphorylated into dTMP by the action of cytosolic thymidine kinase (TK1). Inside cells, TK1 has a 100-fold higher activity compared to mitochondrial thymidine kinase (TK2), this is why TK1 has a main role in the salvage of thymidine during S-phase. In the synthesis of dTTP anabolic reactions are counterbalanced by catabolic ones, catalyzed by thymidine phosphorylase (TP), that degrades thymidine to deoxyuridine, and by the cytosolic (cdN) and the mitochondrial (mdN) deoxynucleotidases, that convert dTMP to thymidine building up a regulatory substrate cycle with TK1 and TK2 respectively. Both TK1 and the R2 subunit of RNR are cell-cycle regulated and undergo proteolytic degradation in late mitosis. In non-cycling cells *de novo* synthesis is reduced to about 2% as compared to the rate of synthesis during proliferation and depends on R1/p53R2, while TK2 is the only enzyme responsible for the salvage synthesis of dTTP. As a result of these changes both cytosolic and mitochondrial pools are ten-fold lower in quiescent mammalian cells. Thus dNTPs production changes in parallel with the reduced consumption of DNA precursors, limited to mtDNA synthesis (a small percentage compared to the total DNA content of the cell).

In this context the roles of TK2 and p53R2 become more relevant in non-cycling cells and this is confirmed by the existence of mtDNA depletion

syndromes (MDS) linked to mutation in either TK2 or p53R2 genes. MDS are a group of autosomal recessive disorders, clinically heterogeneous and characterized by reduced copy numbers of mtDNA. MDS show marked tissue-specificity and affect post-mitotic cells. Mutations in genes involved in dNTP metabolism or in mtDNA replication have been found to cause MDS. Genetic inactivation of TK2 or p53R2 is linked to myopathic MDS, which primarily affects skeletal muscle. The pathology is attributed to a dNTP pools imbalance in the affected tissues.

The aim of my work is to explore the metabolic mechanisms which could account for the muscle vulnerability in TK2 and p53R2 deficiencies. In the first part I studied quiescent cultures of TK2-mutated skin fibroblasts isolated from two patients affected by myopathic MDS. My purpose was to assess if cell types not affected by TK2 mutations are endowed with some mechanism of compensation that buffers the effects of the genetic deficiency. In the second part I studied differentiated culture of muscle cells in order to understand what makes muscle so vulnerable to genetic inactivation of TK2 or p53R2.

By comparing these two cellular models we aimed to find out differences that could account for the tissue-specificity observed for the mutations in these genes.

In cycling cells dTTP synthesis is not affected by TK2- or p53R2-deficiency because dTTP is primarily synthesized in the cytosol by R1/R2 and TK1. For this reason I performed my experiments in quiescent or differentiated cultures, where dTTP pool depends exclusively on TK2 activity and R1/p53R2 *de novo* synthesis.

Quiescence in skin fibroblasts can be obtained by shifting the medium of confluent cultures from 10% to 0.1% serum and keeping them in these conditions for at least 10 days before performing the experiments. I studied quiescent cultures of two lines of skin fibroblasts obtained from patients (Pa and Pb) that are compound heterozygotes and harbored two different pairs of TK2 mutations (T77M/R161K and R152G/ K171del). I compared them with two wild-type lines coming from biopsies obtained from healthy subjects of corresponding ages. I measured TK2 enzymatic activity in cellular extracts. Patient cells contained 5% (Pa) or 40% (Pb) residual TK2 activity. However, the marked reduction in TK2 activity did

not affect the dNTP pools: both cytosolic and mitochondrial dTTP pools were unchanged and also the overall composition of dNTP pools was normal. Looking for possible mechanisms that could compensate TK2 deficiency in the mutant lines, I measured the enzymatic activities of thymidine phosphorylase, and the two deoxynucleotidases cdN and mdN and I evaluated the expression of the three RNR subunits both by real-time PCR and western blot analysis. I did not find any sign of metabolic adaptation in the mutated cells, such as a down-regulation of catabolic pathways or an up-regulation of *de novo* R1/p53R2 synthesis. When I compared the dynamics of the dTTP pool in mutated and control fibroblasts by incubating the cells with radioactive thymidine, in striking contrast to the low TK2 activity measured in cell extracts, the mutated cells phosphorylated thymidine as efficiently as the wild-type cells. By pulse-chase experiment I compared dTTP turnover in control and patient cells and I found that the control cells *in vivo* synthesized dTTP with the same efficiency as the mutant cells, i.e. at a rate 10-fold lower than that observed in TK2 enzymatic assays. The expression of TK2 increases when wild-type cultured fibroblasts become quiescent (Rampazzo *et al.*, 2007), but the enzyme does not work at its full potential. These data show that a small fraction of such potential TK2 activity is sufficient to maintain the dTTP pools of wild-type fibroblasts. In the mutants, however, the *in situ* (in cultured cells) and *in vitro* (in protein extracts) rates of TK2 activity coincide, and by fully exploiting their TK2 complement, the cells preserve their dTTP pools, which might explain the lack of mtDNA depletion in these cells (Frangini *et al.*, 2009).

C2C12 mouse myoblasts can be induced to differentiate by shifting them to a 2% horse serum medium (differentiation medium): myoblasts become post-mitotic myocytes and fuse into multinucleated cells called myotubes, which exhibit spontaneous contraction. Differentiated cultures of C2C12 cells contain a significant fraction of mononucleated cells whose dNTP pool sizes and enzymatic setup differ from those of multinucleated myotubes. I set up a protocol for the separation of myotubes and myoblasts from differentiated cultures. The purity of the fractions was evaluated by measuring TK1 activity (expected to be present in mononucleated cells only) and the expression of muscle-specific proteins,

myogenin and myosin (characteristic of myotubes). The latter parameter was also an index of the degree of differentiation within experiments. Thanks to this procedure I obtained a fraction of differentiated myotubes with a minimal contamination by mononucleated unfused cells.

I first characterized the dNTP metabolism in these cells by measuring the expression of the key anabolic and catabolic enzymes, the activity of the enzymes of dTTP salvage synthesis and the composition of the four total dNTP pools. I focused on all the changes that take place at the onset of a post-mitotic status. A clear difference between muscle cells and fibroblasts was an exceedingly low activity of TK2 in the former that did not increase at differentiation (in fibroblasts at the onset of quiescence there is a 3-fold induction).

This cellular model was compared to mouse skeletal muscle by microarray analysis. The results show a strict similarity between the expression profiles of the enzymes of dNTP metabolism. So, we decided to use this cellular system to reproduce *in vitro* the myopathic phenotype of MDS linked to TK2 or p53R2 deficiencies. I set up a protocol for transfection with Stealth siRNA (Invitrogen) that combines transfection and differentiation and obtained 80-90% and 60-70% silencing for p53R2 and TK2, respectively.

As a result of mitochondrial biogenesis during myogenesis, differentiating C2C12 cells usually show a 7-8 fold mtDNA expansion with differentiation. The evaluation of the mtDNA content by quantitative realtime PCR revealed 50% mtDNA depletion in TK2-silenced myotubes at only 4 days of differentiation, while in p53R2 silenced cells the first sign of mtDNA depletion appeared at the 8th day of differentiation. Also TK2^{-/-} (Zhou *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2008) and p53R2^{-/-} (Kimura *et al.*, 2003) mice differ for the time of onset of the pathological phenotype, the former show the first symptoms 7 days after birth, while the latter only after 8 weeks.

Even if these are preliminary experiments, we can say that we obtained a cellular model for myopathic MDS that showed mtDNA depletion *in vitro*. We did not find indications for a mechanism of transcriptional compensation for TK2 and p53R2 deficiencies in the expression of key enzymes of dNTP metabolism. The preliminary pool determination in the silenced myotubes do not allow to draw conclusions on the molecular

basis of the observed phenotype. The experiments must be repeated. In particular the transfection procedure decreases the efficiency of myotube purification, affecting the reproducibility between experiments. We need to improve the procedure of sample preparation for the extraction of nucleotide pools from the transfected muscle cells, in order to reduce the variability in dNTP content. More investigation are also needed to clarify the molecular phenotype of silenced myotubes.

8. BIBLIOGRAFIA

Akman HO, Dorado B, Lopez LC, Garcia-Carzola A, Vilà MR, Tanabe LM, Dauer WT, Bonilla E, Tanji K and Hirano M. *Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotides pools for mitochondrial DNA maintenance 2.* **2008 Hum. Mol. Genet. 17:2433-2440.**

Arnér ESJ and Eriksson S. *Mammalian deoxyribonucleoside kinases.* **1995 Pharmac. Ther. 67:155-186.**

Bartesaghi S, Betts-Henderson J, Cain K, Dinsdale D, Zhou X, Karlsson A, Salomoni P and Nicotera P. *Loss of thymidine kinase 2 alters neuronal bioenergetics and leads to neurodegeneration.* **2010 Hum. Mol. Genet. 19:1669-1677.**

Barthélémy C, Ogier de Baulny H, Diaz J, Cheval MA, Frachon P, Romero N, Goutieres F, Fardeau M and Lombés A. *Late-onset mitochondrial DNA depletion:DNA copy number, multiple deletions, and compensation.* **2001 Ann Neurol 49:607–617.**

Baruffini E, Lodi T, Dallabona C, Puglisi A, Zeviani M and Ferrero I. *Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans.* **2006 Hum. Mol. Genet. 15:2846-2855.**

Berk AJ and Clayton DA. *Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence.* **1974. J. Mol. Biol. 86:801–824.**

Bianchi V, Pontis E, and Reichard P. *Interrelations between substrate cycles and de novo synthesis of pyrimidine deoxyribonucleoside triphosphates in 3T6 cells.***1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:986-990.**

Bianchi V, Pontis E and Reichard P. *Regulation of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism by substrate cycles in dCMP-deaminase deficient V79 hamster cells.* 1987 **Mol. Cell. Biol.** 7: 4218–4224.

Bianchi V and Spychala J. *Mammalian 5'-nucleotidases.* 2003 **J Biol Chem.** 278:46195-46198.

Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD, Anandatheerthavarada HKA, Vijayasarathy C, Zaidi M, Kotlikoff M and Avadhani NG. *Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk.* 1999 **EMBO J.** 18:522–533.

Bogenhagen DF and 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.* 1976 **J. Biol. Chem.** 251: 2938-2944.

Bogenhagen DF and Clayton DA. *The mitochondrial DNA replication bubble has not burst.* 2003. **Trends Biochem. Sci.** 28:357–360

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 and Rötig A. *Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion.* 2007 **Nat. Genet.** 39:776-780.

Bornstein B, Area E, Flanigan KM, Ganesh J, Jayakar P, Swoboda KJ, Coku J, Naini A, Shanske S, Tanji K, Hirano M and DiMauro S. *Mitochondrial DNA depletion syndrome due to mutations in the RRM2B gene.* 2008 **Neuromuscul. Disord.** 18:453-459.

Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA and Holt IJ. *Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone.* 2003. **J. Biol. Chem.** 278:50961-50969.

Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* **1976 Anal. Biochem.** **72:248-54.**

Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH and Jaenisch R. *Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death.* **1992 Cell** **71:369-382**

Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C and Clayton DA. *Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism.* **2005 Genes Dev.** **19:2466-2476.**

Brown TA, Tkachuk AN and Clayton DA. *Native R-loops persist throughout the mouse mitochondrial DNA genome.* **2008 J. Biol. Chem.** **283:36743-36751.**

Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F and Falcieri E. *C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization.* **2004 Europ. J. of Histochem.** **48:223-234.**

Carozzi AJ, Ikonen E, Lindsay MR and Parton RG. *Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-Tubule and caveolae biogenesis.* **2000 Traffic.** **1:326-341.**

Chabes A and 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.* **2000 J. Biol. Chem.** **275:17747-17753.**

Chabes A, Pflieger CM, Kirschner MW and Thelander L. *Mouse ribonucleotide reductase, R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex Cdh1-mediated proteolysis.* **2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **100:3925-3929.**

Chabes AL, Björklund S, Thelander L. *S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive*

E2F-binding site and an upstream promoter activating region. **2004 J. Biol. Chem.** **279:10796-10807.**

Charge SB and Rudnicki MA. *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration.* **2004 Physiol. Rev.** **84:209–238.**

Clayton DA. *Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA.***1991. Annu. Rev. Cell Biol.** **7:453–478.**

Darè E, Zhang LH, Jenssen D and Bianchi V. *Molecular analysis of mutations in the hprt gene of V79 hamster fibroblasts: effects of imbalances in the dCTP, dGTP and dTTP pools.* **1995 J. Mol. Biol.** **252: 514–521.**

Davis RL, Weintraub H and Lassar AB. *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.* **1987 Cell. Dec** **51:987-1000.**

Dorado B, Area E, Akman HO and Hirano M. *Onset and organ specificity of Tk2 deficiency depends on Tk1 down-regulation and transcriptional compensation.***2011 Hum. Mol. Genet.** **20:155-64.**

Dou QP and Pardee AB. *Transcriptional activation of thymidine kinase, a marker for cell cycle control.* **1996 Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** **53:197-217.**

Engström Y, Rozell B, Hansson HA, Stemme S and Thelander L. *Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells.* **1984 EMBO J.** **3:863-867.**

Engström Y and Rozell B. *Immunocytochemical evidence for the cytoplasmic localization and differential expression during the cell cycle of the M1 and M2 subunits of mammalian ribonucleotide reductase.* **1988 EMBO J.** **7:1615–1620.**

Eriksson S, Munch-Petersen B, Johansson K and Eklund H. *Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases.* **2002 Cell. Mol. Life Sci.** **59:1327-1346.**

Falkenberg M, Larsson NG and Gustafsson CM. *DNA replication and transcription in mammalian mitochondria.* 2007 **Annu. Rev. Biochem.** 76:679-699.

Ferraro P, Pontarin G, Crocco L, Fabris S, Reichard P and Bianchi V. *Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE).* 2005 **J. Biol. Chem.** 280:24472–24480.

Ferraro P, Nicolosi L, Bernardi P, Reichard P and Bianchi V. *Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate.* 2006 **Procl. Natl. Acad. Sci. USA** 103:18586-18591.

Ferraro P, Franzolin E, Pontarin G, Reichard P and Bianchi V. *Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates.* 2010 **Nucleic Acids Res.** 38:e85.

Fontes MRM, Teh T, Jans D, Brinkworth RI and Kobe B. *Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by Importin- α .* 2003 **J. Biol. Chem.** 278:27981-27987.

Frangini M, Rampazzo C, Franzolin E, Lara MC, Vilà MR, Martí R and Bianchi V. *Unchanged thymidine triphosphate pools and thymidine metabolism in two lines of thymidine kinase 2-mutated fibroblasts.* 2009 **FEBS J.** 276:1104-1113.

Franzolin E, Rampazzo C, Pérez-Pérez M, Hernández A, Balzarini J and Bianchi V. *Bromovinyl-deoxyuridine: a selective substrate for mitochondrial thymidine kinase in cell extracts.* 2006 **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 344:30-36.

Franzolin E. *Modelli cellulari di deficienze per la timidina chinasi mitocondriale.* 2009 **Tesi di dottorato.**

Fusté JM, Wanrooij S, Jemt E, Granycome CE, Cluett TJ, Shi Y, Atanassova N, Holt IJ, Gustavsson CM and Falkenberg M. *Mitochondrial RNA polymerase*

is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. **2010 Mol. Cell. 37:67-78.**

Gayraud-Morel B, Chretien F, Flamant P, Gomes D, Zammit PS, Tajbakhsh S. *A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis.* **2007 Dev Biol. 312:13-28**

Gazziola C, Ferraro P, Moras M, Reichard P and Bianchi V. *Cytosolic high K(m) 5'-nucleotidase and 5'(3')-deoxyribonucleotidase in substrate cycles involved in nucleotide metabolism.* **2001 J. Biol. Chem. 276:6185-6190.**

Gianakopoulos' PJ, Mehta V, Voronova A, Cao Y, Yao Z, Coutu J, Wang X, Waddington ML, Tapscott SJ and Skerjanc IS. *MyoD directly upregulates premyogenic mesoderm factors during induction of skeletal myogenesis in stem cells.* **2011 J. Biol. Chem. in press.**

Gleyzer N, Vercauteren K and Scarpulla RC. *Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators.* **2005 Mol. Cell Biol. 25:1354–1366.**

Gotz A, Isohanni P, Pihko H, Paetau A, Herva R, Saarenpaa-Heikkila O, Valanne L, Marjavaara S and Suomalainen A. *Thymidine kinase 2 defects can cause multi-tissue mtDNA depletion syndrome.* **2008 Brain 131:2841–2850.**

Govindarajan R, Leung G, Zhou M, Tse C, Wang J and Unadkat J. *Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3.* **2009 Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol. 296:G9100-9122.**

Gross NJ, Getz GS and Rabinowitz M. *Apparent turnover of mitochondrial deoxyribonucleic acid and mitochondrial phospholipids in the tissues of the rat.* **1969 J. Biol. Chem. 244:1552-1562.**

Guittet O, Hakansson P, Voevodskaya N, Fridd S, Graslund A, Arakawa H, Nakamura Y and Thelander L. *Mammalian p53R2 protein forms an active*

ribonucleotide reductase in vitro with R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. **2001 J. Biol. Chem. 276:40647-40651.**

Håkansson P, Hofer A, Thelander L. *Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells.* **2006 J Biol Chem. 281:7834-7841.**

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN and Klein WH. *Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene.* **1993 Nature 364:501-506.**

Hatzis P, Al-Madhoon AS, Jullig M, Petrakis TG, Eriksson S and Talianidis L. *The intracellular localization of deoxycytidine kinase.* **1998 J. Biol Chem. 273:30239-30243.**

Herzberg NH, Zwart R, Wolterman RA, Ruiter JP, Wanders RJ, Bolhuis PA and van den Bogert C. *Differentiation and proliferation of respiration-deficient human myoblasts.* **1993 Biochim. Biophys. Acta 1181:63–67.**

Höglund L, Pontis E and Reichard P. *Effects of deoxycytidine and thymidine kinase deficiency on substrate cycles between deoxyribonucleosides and their 5'-phosphates.* **1988 Cancer Res. 48:3681-3687.**

Höglund L and Reichard P. *Nucleotidase activities in soluble and membrane fractions of three different mammalian cell lines.* **1990 Exp. Cell. Res. 190:204-208.**

Hu CM and Chang ZF. *Mitotic control of dTTP pool: a necessity or a coincidence?* **2007 J. Biomed. Sci. 14(4):491-497.**

Hubeek I, Giovannetti E, Broekhuizen A, Pastor-Anglada M, Kaspers G and Peters G. *Immunocytochemical detection of hENT1 hCNT1 in normal tissues, lung cancer cell lines, and NSCLC patient samples.* **2008 Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 27:787-793.**

Ingemarson R and Thelander L. *A kinetic study on the influence of nucleoside triphosphate effectors on subunit interaction in mouse ribonucleotide reductase.* **1996 Biochemistry 35:8603–8609.**

Johansson E, Hjortsberg K, Thelander L. *Two YY-1-binding proximal elements regulate the promoter strength of the TATA-less mouse ribonucleotide reductase R1 gene.* **1998 J. Biol. Chem. 273:29816-29821.**

Johansson M and Karlsson A. *Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2.* **1997 J. Biol. Chem. 272:8454-8458.**

Johansson K, Ramaswamy S, Ljungcrantz C, Knecht W, Piškur J, Munch-Petersen B, Eriksson S and Eklund H. *Structural basis for substrate specificities of cellular deoxyribonucleoside kinases.* **2001 Nat. Struct. Biol. 8:616-620.**

Kai Y, Takamatsu C, Tokuda K, Okamoto M, Irita K and Tkahashi S. *Rapid and random turnover of mitochondrial DNA in rat hepatocytes of primary culture.* **2006 Mitochondrion 6:299-304.**

Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V and Tajbakhsh S. *Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice.* **2004 Nature 431:466-471.**

Kaukoken J, Juselius JK, Tiranti V, Kittälä A, Zeviani M, Comi GP, Keränen S, Peltonen L and Suomalainen A. *Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance.* **2000 Science 289:782-785.**

Ke PY and Chang ZF. *Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome- CDH1-mediated pathway.* **2004 Mol. Cell Biol. 24:514-526.**

Ke PY, Kuo YY, Hu CM and Chang ZF. *Control of dTTP pool size by anaphase-promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability.* **2005 Genes Dev.19(16):1920-1933.**

Kim K, Lecordier A and Bowman LH. *Both nuclear and mitochondrial cytochrome c oxidase mRNA levels increase dramatically during mouse postnatal development.* 1995 **Biochem. J.** 306:353–358.

Kimura T, Takeda S, Sagiya Y, Gotoh M, Nakamura Y and Arakawa H. *Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools.* 2003 **Nat. Genet.** 34:440-445.

Kulawiec M, Ayyasamy V and Singh K. *p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway.* 2009 **J. Carcinogenesis** 1-9.

Kunz BA and Kohalmi SE. *Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels.* 1991 **Annu. Rev. Genet.** 25:339-359.

Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CH, McIntosh EM and Reidy J.A. *Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability.* 1994 **Mutat. Res.** 318:1-64.

Lambeth DO, Mehus JG, Ivey MA and Milavetz BI. *Characterization and cloning of a nucleoside-diphosphate kinase targeted to matrix of mitochondria in pigeon.* 1997 **J. Biol. Chem.** 272:24604:24611.

Lai Y, Tse CM and Unadkat JD. *Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs.* 2004 **J. Biol. Chem.** 279:4490-4497.

Larsson N, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh G and Clayton D. *Mitochondrial transcription factor A is necessary for mitochondrial DNA maintenance and embryogenesis in mice.* 1998 **Nat. Genet.** 18:231-236.

Lawson MA and Purslow PP. *Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific.* 2000 **Cells Tissues Organs** 167:130-137.

Le Grand F and Rudnicki MA. *Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis.* **2007 Curr. Opin. Cell. Biol.** 19:628–633.

Leanza L, Ferraro P, Reichard P and Bianchi V. *Metabolic interrelations within guanine deoxynucleotide pools for mitochondrial and nuclear DNA maintenance.* **2008 J. Biol. Chem.** 283 (24): 16437-16445.

Leary SC, Battersby BJ, Hansford RG and Moyes CD. *Interactions between bioenergetics and mitochondrial biogenesis.* **1998 Biochim Biophys Acta** 1365:522-530.

Lebedeva M, Eaton J and Shadel G. *Loss of p53 causes mtDNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis.* **2009 Biochem. Biophys. Acta.** 1787:328-334.

Lee E, Lai Y, Zhang H and Unadkat J. *Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine.* **2006 J. Biol. Chem.** 281:16700-16706.

Lesko N, Naess K, Wibom R, Solaroli N, Nennesmo I, von Döbeln U, Karlsson A and Larsson NG. *Two novel mutations in thymidine kinase-2 cause early onset fatal encephalomyopathy and severe mtDNA depletion.* **2010 Neuromuscul. Disord.** 20:198–203.

Li CL, Lu CY, Ke PY and 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.* **2004 Biochem. Biophys. Res. Commun.** 313:587-593.

Liu C, Powell KA, Mundt K, Wu L, Carr AM and Caspari T. *Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms.* **2003 Genes Dev** 17:1130–1140.

Luo Y, Bond JD and Ingram VM. *Compromised mitochondrial function leads to increased cytosolic calcium and to activation of MAP kinases.* 1997 **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:9705–9710.

Mancuso M, Salviati L, Sacconi S, Otaegui D, Camano P, Marina A, Bacman S, Moraes CT, Carlo JR, Garcia M, Garcia-Alvarez M, Monzon L, Naini AB, Hirano M, Bonilla E, Taratuto AL, DiMauro S and Vu TH. *Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA.* 2002 **Neurology** 59:1197–1202.

Martì R, Spinazzola A, Tadesse S, Nishino I, Nishigaki Y and Hirano M. *Definitive diagnosis of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by biochemical assays.* 2004 **Clin. Chem.** 50:120-124.

Mathews C and Song S. *Maintaining precursors pool for mitochondrial DNA replication.* 2007 **FASEB J.** 21:2294-2303.

McKee EE, Bentley AT, Hatch M, Gingerich J and Susan-Resiga D. *Phosphorylation of thymidine and AZT in heart mitochondria: elucidation of a novel mechanism of AZT cardiotoxicity.* 2004 **Cardiovasc. Toxicol.** 4:155-167.

Miki A, Mizoguchi A and Mizoguti H. *Histochemical studies of enzymes of the energy metabolism in postimplantation rat embryos.* 1988 **Histochem.** 88:489–495.

Milon L, Rousseau-Merk MF, Munier A, Erent M, Lascu I, Capeau J and Lancombe ML. *nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localized on chromosome 16p13.* 1997 **Hum. Genet.** 99:550-557.

Milon L, Meyer P, Chiadmi M, Munier A, Johansson M, Karlsson A, Lascu I, Capeau J, Janin J and Lancombe ML. *The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase.* 2000 **J. Biol. Chem.** 275:14264-14272.

Miner JH and Wold B. *Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes.* 1990 **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 87:1089-1093.

Moares CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andretta F, Bonilla E, Schon EA and DiMauro S. *mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases.* 1991 **Am. J. Hum. Genet.** 48:492-501.

Mokranjac D and Neupert W. *Protein import into mitochondria.* 2005 **Biochem. Soc. Trans.** 33:1019–1023

Munch-Petersen B and Tyrsted G. *Induction of thymidine kinases in phytohemagglutini-stimulated human lymphocytes.* 1977 **Biochim. Biophys. Acta.** 478:363-375.

Munch-Petersen B, Cloos L, Tyrsted G and Eriksson S. *Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides.* 1991 **J. Biol. Chem.** 266:9032-9038.

Munch-Petersen B. *Reversible tetramerization of human TK1 to the high catalytic efficient form is induced by pyrophosphate, in addition to tripolyphosphates, or high enzyme concentration.* 2009 **FEBS J.** 276:571-580.

Munch-Petersen B. *Enzymatic regulation of cytosolic thymidine kinase 1 and mitochondrial thymidine kinase 2: a mini review.* 2010 **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.** 29:363-369.

Nakano K, Bálint E, Ashcroft M and Vousden KH. *A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73.* 2000 **Oncogene** 19:4283-4289.

Nevo Y, Soffer D, Kutai M, Zelnik N, Saada A, Jossiphov J, Messer G, Shaag A, Shahar E, Harel S and Elpeleg O. *Clinical characteristics and muscle pathology in myopathic mitochondrial DNA depletion.* 2002 **J. Child Neurol.** 17:499-504.

Newsholme EA, Chaliss RAJ and Crabtree B. *Substrate cycles: their role in improving sensitivity in metabolic pathways.* **1984 Trends Biochem. Sci. 9:277-280.**

Nishino I, Spinazzola A and Hirano M. *Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder.* **1999 Science 283:689-692.**

Nordlund P and Reichard P. *Ribonucleotide reductases.* **2006 Annu. Rev. Biochem. 75:681-706.**

Olson EN. *MyoD family: a paradigm for development?* **1990 Genes Dev. 4:1454-1461.**

Olson EN. *Interplay between Proliferation and Differentiation within the Myogenic Lineage.* **1992 Develop. Biol. 154:261-272.**

Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, Erazo R, Gurgel-Giannetti J, Krishna S, Bonilla E, De Vivo DC, Shanske S and DiMauro S. *Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene.* **2006 Arch. Neurol. 63:1122-1126.**

Patapoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang S, Stark K and Wold B. *Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome.* **1995 Development 121:3347-3358.**

Pfaffl MW. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* **2001 Nucleic Acids Res. 29:e45.**

Pontarin G, Gallinaro L, Ferraro P, Reichard P and Bianchi V. *Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools.* **2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:12159-12164.**

Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, Hirano M, Reichard P and Bianchi V. *Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a*

cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. **2006 J. Biol. Chem. 281:22720-22728.**

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.* **2007 J Biol Chem. 282:16820-16828.**

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.* **2008 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:17801-17806.**

Pontarin G, Ferraro P, Rampazzo C, Kollberg G, Holme E, Reichard P and Bianchi V. *Deoxyribonucleotide metabolism in cycling and resting fibroblasts with a missense mutation in p53R2, a subunit of ribonucleotide reductase.* **2011 in press.**

Poyton RO and McEwen JE. *Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes.* **1996 Annu. Rev. Biochem. 63:563–607.**

Prem veer Reddy G and Pardee AB. *Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication.* **1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3312–3316.**

Rampazzo C, Gallinaro L, Milanesi E, Frigimelica E, Reichard P and Bianchi V. *A deoxyribonucleotidase in mitochondria: involvement in regulation of dNTP pools and possible link to genetic disease.* **2000a Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8239-8244.**

Rampazzo C, Johansson M, Gallinaro L, Ferraro P, Hellman U, Karlsson A, Reichard P and Bianchi V. *Mammalian 5'(3')-deoxyribonucleotidase, cDNA cloning, and overexpression of the enzyme in Escherichia coli and mammalian cells.* **2000b J. Biol. Chem. 275:5409-5415.**

Rampazzo C, Kost-Alimova M, Ruzzenente B, Dumanski JP and Bianchi V. *Mouse cytosolic and mitochondrial deoxyribonucleotidases: cDNA cloning of the mitochondrial enzyme, gene structures, chromosomal mapping and comparison with the human orthologs.* **2002 Gene 294:109-117.**

Rampazzo C, Ferraro P, Pontarin G, Fabris S, Reichard P and Bianchi V. *Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation.* **2004 J. Biol. Chem. 279:17019-17026.**

Rampazzo C, Fabris S, Franzolin E, Crovatto K, Frangini M and Bianchi V. *Mitochondrial thymidine kinase and the enzymatic network regulating thymidine triphosphate pools in cultured human cells.* **2007 J. Biol. Chem. 282:34758-34769.**

Rampazzo C, Miazzi C, Franzolin E, Pontarin G, Ferraro P, Frangini M, Reichard P and Bianchi V. *Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances.* **2010 Mutat. Res. 703:2-10.**

Reichard P. *Interactions between deoxyribonucleotides and DNA synthesis.* **1988 Ann. Rev. Biochem. 57:349-374.**

Remels AHV, Langen RCJ, Schrauwen P, Schaart G, Schols AMWJ and Gosker HR. *Regulation of mitochondrial biogenesis during myogenesis.* **2010 Mol. and Cell. Endocrinol. 315:113–120.**

Ridgeway AG, Wilton S, Skerjanc IS. *Myocyte enhancer factor 2C and myogenin up-regulate each other's expression and induce the development of skeletal muscle in P19 cells.* **2000 J. Biol. Chem. 275:41-46**

Rochard P, Rodier A, Casas F, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Dauray L, Wrutniak C and Cabello G. *Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors.* **2000 J. Biol. Chem. 275:2733–2744.**

Rofougaran R, Vodnala M and Hofer A. *Enzymatically active mammalian ribonucleotide reductase exists primarily as an alpha6beta2 octamer.* **2006 J. Biol. Chem. 281:27705-27711.**

Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP and Letellier T. *Mitochondrial threshold effects.* **2003 Biochem. J. 370:751-762.**

Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S and Jaenisch R. *Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development.* **1992 Cell 71:383-390.**

Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH and Jaenisch R. *MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle.* **1993 Cell 75:1351-1359.**

Rylova S, Mirzaee S, Albertioni F and Eriksson S. *Expression of deoxynucleoside kinases and 5'-nucleotidases in mouse tissues: implications for mitochondrial toxicity.* **2007 Biochem Pharmacol 74:169-175.**

Saada A, Shaag H, Nevo Y, Eriksson S and Elpeleg O. *Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy.* **2001 Nat. Gen. 29:342-344.**

Saada A, Ben-Shalom E, Zyslin R, Miller C, Mandel H and Elpeleg O. *Mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate pools in thymidine kinase 2 deficiency.* **2003 Biochem. Biophys. Res. Commun. 310:963-966.**

Saada A, Shaag A and Elpeleg O. *mtDNA depletion myopathy: elucidation of the tissue specificity in the mitochondrial thymidine kinase (TK2) deficiency.* **2003 Mol. Genet. Metab. 79:1-5.**

Sandri M and Carraro U. *Apoptosis of skeletal muscles during development and disease.* **1999 Int. J. Biochem. Cell Biol. 31:1373-1390.**

Sandrini MP and Piškur J. *Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction.* **2005 Trends Biochem. Sci. 30:225-228.**

Sarzi E, Bourdon A, Chrétien D, Zarhrate M, Corcos J, Slama A, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Munnich A and Rötig A. *Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood.* **2007 J. Pediatr. 150:531-534.**

Shamir R, Maron-Katz A, Tanay A, Linhart C, Steinfeld I, Sharan R, Shiloh Y and Elkon R. *EXPANDER—an integrative program suite for microarray data analysis.* **2005 BMC Bioinformatics 6:232.**

Sherman PA and Fyfe JA. *Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers.* **1989 Anal. Biochem. 180:222-226.**

Spinazzola A, Invernizzi F, Carrara F, Lamantea E, Donati A, DiRocco M, Giordano I, Meznaric-Petrusa M, Baruffini E, Ferrero I and Zeviani M. *Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndrome.* **2009 J. Inherit. Metab. Dis. 32:143–158.**

Spyrou G and Reichard P. *Dynamics of the thymidine triphosphate pool during the cell cycle of synchronized 3T3 mouse fibroblasts.* **1988 Mutat. Res. 200 (1-2): 37-43.**

Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Hörmann K, Kinscherf R and Goessler UR. *Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts.* **2009 BMC Molec. Biol. 10:66.**

Suomalainen A and Isohanni P. *Mitochondrial DNA depletion syndromes - many genes, common mechanisms.* **2010 Neuromuscul. Disord. 20:429-437.**

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.* **2000 Nature 404:42-49.**

Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H and Lassar AB. *MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts.* 1988 **Science** 242:405-411.

Taylor S, Zhang H, Eaton J, Rodeheffer M, Lebedeva M, O'rourke T, Siede W and Shadel G. *The conserved Mec1/ Rad53 nuclear checkpoint pathway regulates mitochondrial DNA copy number in *Saccharomyces cerevisiae*.* 2005 **Mol. Biol. Cell.** 16:3010-3018.

Tyynismaa H, Sembongi H, Bokori-Brown M, Granycome C, Ashley N, Poulton J, Jalanko A, Spelbrink JN, Holt IJ and Suomalainen A. *Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number.* 2004 **Hum Mol Genet** 13:3219-3227.

Tyynismaa H and Suomalainen A. *Mouse models of mitochondrial DNA defects and their relevance for human disease.* 2009 **EMBO reports** 10:137-143.

Vilà MR, Segovia-Silvestre T, Gamez J, Marina A, Naini AB, Meseguer A, Lombés A, Bonilla E, Di Mauro S, Hirano M and Andreu AL. *Reversion of mtDNA depletion in a patient with TK2 deficiency.* 2003 **Neurology** 60:1203–1205.

Vilà MR, Villaroya J, Garcia-Arumi E, Castellote A, Meseguer A, Hirano M and Roig M. *Selective muscle fiber loss and molecular compensation in mitochondrial myopathy due to TK2 deficiency.* 2008 **J. Neurol. Sci.** 267:137–141.

Villaroya J, de Boloés C, Meseguer A, Hirano M and Vilà MR. *Altered gene transcription profiles in fibroblasts harboring either TK2 or DGUOK mutations indicate compensatory mechanisms.* 2009 **Exp. Cell Res.** 1429-1438.

Wang H and Morais R. *Up-regulation of nuclear genes in response to inhibition of mitochondrial DNA expression in chicken cells.* 1997 **Biochim. Biophys. Acta** 1352:325–334.

Wang L and Eriksson S. *Cloning and characterization of full length mouse thymidine kinase 2: the N-terminal sequence directs import of the precursor protein into mitochondria.* **2000 J. Biochem. 351:469-476.**

Wang L, Saada A and Eriksson S. *Kinetic properties of mutant human thymidine kinase 2 suggest a mechanism for DNA depletion myopathy.* **2003 J. Biol. Chem. 278:6963-6968.**

Wang L, Limongelli A, Vila MR, Carrara F, Zeviani M and Eriksson S. *Molecular insights into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes.* **2005 Mol. Genet. Metab. 84:75–82.**

Wang L. *Deoxynucleoside salvage enzymes and tissue specific mitochondrial DNA depletion.* **2010 Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 29:370-381.**

Wang L and Eriksson S. *Tissue specific distribution of pyrimidine deoxynucleoside salvage enzymes shed light on the mechanism of mitochondrial DNA depletion.* **2010 Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 29:400-403.**

Wanrooij S, Fusté JM, Farge G, Shi Y, Gustavsson CM and Falkenberg M. *Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro.* **2008 Procl. Nat. Acad. Sci. USA 105:11122-11127.**

Watkins L and Lewis R. *The metabolism of deoxyguanosine in mitochondria: relationship of the uptake of deoxyguanosine to the electron transport chain and adenosine triphosphate.* **1987 Arch. Biochem. Biophys. 253:315-321.**

Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB and Miller AD. *Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD.* **1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5434-5438**

Welin M, Kosinska U, Mikkelsen NE, Carnrot C, Zhu C, Wang L, Eriksson S, Munch-Petersen B and Eklund H. *Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin.* **2004 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:17970-17975.**

Wintersberger E, Rotheneder H, Grabner M, Beck G and Seiser C. *Regulation of thymidine kinase during growth, cell cycle and differentiation.* 1992 **Adv. Enzyme Regul.** 32:241-254.

Wong TW and Clayton DA. *In vitro replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis.* 1985. **Cell** 42:951–958.

Wong TW and Clayton DA. *DNA primase of human mitochondria is associated with structural RNA that is essential for enzymatic activity.*1986. **Cell** 45:817–825.

Xu Y, Johansson M and Karlsson A. *Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria.* 2008 **J. Biol. Chem.** 283: 1563-1571.

Xue L, Zhou B, Liu X, Qiu W, Jin Z, Yen Y. *Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits.* 2003 **Cancer Res** 63:980–986.

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.* 2001 **Cancer Res.** 61:8256-8262.

Yao R, Zhang Z, An X, Bucci B, Perlstein DL, Stubbe J, Huang M. *Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways.* 2003 **Proc Natl Acad Sci USA** 100:6628–6633.

Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jakobs HT and Holt IJ. *Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand.* 2006 **EMBO J.** 25:5358-5371.

Zhou B, Liu X, Mo X, Xue L, Darwish D, Qiu W, Shih J, Hwu EB, Luh F and Yen Y. *The human ribonucleotide reductase subunit hRRM2 complements*

p53R2 in response to UV-induced DNA repair in cells with mutant p53. **2003** **Cancer Res.** **63:6583-6594.**

Zhou X, Solaroli N, Bjerke M, Stewart JB, Rozell B, Johansson M and Karlsson A. *Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2-deficient mice 1.* **2008** **Hum. Mol. Genet.** **17:2329-2335.**

9. PUBBLICAZIONI E CONGRESSI INERENTI L'ATTIVITA' DI RICERCA SVOLTA

Publicazioni:

1. Rampazzo C, Miazzi C, Franzolin E, Pontarin G, Ferraro P, **Frangini M**, Reichard P and Bianchi V. *Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances*. **2010 Mutat. Res. 703:2-10.**
2. **Frangini M**, Rampazzo C, Franzolin E, Lara MC, Vilà MR, Martí R, Bianchi V. *Unchanged thymidine triphosphate pools and thymidine metabolism in two lines of thymidine kinase 2-mutated fibroblasts*. **2009 FEBS J. 276:1104-1113.**

Abstract:

1. **Frangini M**, Franzolin E, Ciaghi M, Bianchi V, and Rampazzo C. *Analysis of the enzymes involved in mtDNA precursor synthesis in quiescent fibroblasts and differentiated muscle cells*. **2009**
FEBS advanced lecture course, mitochondria in life, death and disease.
2. **Frangini M**, Franzolin E, Ciaghi M, Bianchi V, and Rampazzo C. *Different expression of enzymes for mtDNA precursor synthesis in quiescent fibroblasts and differentiated muscle cells in culture*. **2009**
13th International symposium on purine and pyrimidine metabolism in man, PP09.
3. Lara MC, Dorado B; **Frangini M**, Rampazzo C, Franzolin E, Bianchi V, Hirano M and Martí R. *Deoxyribonucleoside triphosphate pools in cultured cells from patients with defects in the nucleoside salvage pathways (mutations in TYMP and TK2)*. **2009**

13th International symposium on purine and pyrimidine metabolism in man, PP09.

4. Bianchi V, Rampazzo C, Ferraro P, Pontarin G, **Frangini M**, Franzolin E, Leanza L, Poletti V, Ruzzenente B and Reichard P. *Deoxynucleotide pool imbalance, mitochondrial DNA maintenance and disease*. **2009**
Telethon Scientific convention.
5. Franzolin E, Rampazzo C, **Frangini M**, Pontarin G, Bianchi V. *Multiple pathways for mitochondrial thymidine triphosphate synthesis and regulation in non proliferating human cells*. **2008**
International symposium on "Mitochondrial physiology and pathology".
6. **Frangini M**, Rampazzo C, Franzolin E e Bianchi V. *Contributo della timidina chinasi mitocondriale e della ribonucleotide reduttasi R1-p53R2 nella sintesi dei precursori del DNA mitocondriale*. **2008**
Riunione nazionale dottorandi ABCD.
7. Rampazzo C, Franzolin E, **Frangini M** and Bianchi V. *Mitochondrial thymidine triphosphate synthesis and regulation in quiescent human fibroblasts*. **2008**
EUROMIT 7, The seventh European meeting on mitochondrial pathology, (From basic mechanisms to disease and ageing).