

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
"BIOLOGIA APPLICATA"  
XX CICLO**

**TESI DI DOTTORATO**

INTERAZIONI TRA NUCLEO E MITOCONDRI NEL LIEVITO  
*Saccharomyces cerevisiae* : IL FENOTIPO RESISTENZA  
ALLA LICORINA NELLA REGOLAZIONE RETROGRADA

Candidata  
Dr. **Paola Pontieri**

Tutore  
Ch.mo Prof.  
**Maurilio De Felice**

Co-Tutore  
Ch.mo Prof.  
**Luigi Del Giudice**

Coordinatore  
Ch.mo Prof.  
**Amalia Virzo**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	PAG.3
---------------------------	-------

## **CAPITOLO I**

1.1	I MITOCONDRI.....	PAG. 5
1.2	IL SISTEMA GENETICO MITOCONDRIALE.....	PAG. 9
1.3	IL LIEVITO: SISTEMA IDEALE PER LO STUDIO DELLE FUNZIONI MITOCONDRIALI.....	PAG. 14
1.4	INTERAZIONE TRA IL NUCLEO E I MITOCONDRI.....	PAG. 17
1.5	USO DEGLI INIBITORI PER LO STUDIO DEL RAPPORTO TRA IL NUCLEO E I MITOCONDRI.....	PAG. 20
1.6	LA LICORINA.....	PAG. 21

## **CAPITOLO II**

2.1	LA REGOLAZIONE RETROGRADA NEL DIALOGO INTRACELLULARE.....	PAG. 26
2.2	IL SEGNALE RETROGRADO E L'INVECCHIAMENTO.....	PAG. 34
2.3	SENTIERI RETROGRADI IN CELLULE DI MAMMIFERO.....	PAG. 38

## **CAPITOLO III**

3.1	LE DNA POLIMERASI.....	PAG. 43
3.2	DNA POLIMERASI MITOCONDRIALE.....	PAG. 50

## **CAPITOLO IV**

4	SCOPO DEL LAVORO.....	PAG. 56
---	-----------------------	---------

## **CAPITOLO V**

### **MATERIALI E METODI**

5.1	ELENCO DEI CEPPI.....	PAG. 61
5.2	TERRENI DI COLTURA.....	PAG. 61
5.3	SOLUZIONE DI LICORINA.....	PAG. 62

5.4	TAMPONI UTILIZZATI.....	PAG. 63
5.5	MARCATURA CON PRECURSORI RADIOATTIVI.....	PAG. 64
5.6	TRATTAMENTO CON BROMURO DI ETIDIO.....	PAG. 66
5.7	ISOLAMENTO DI MUTANTI PETITE INDOTTI DAL BROMURO DI ETIDIO.....	PAG. 66
5.8	COLORAZIONE <i>IN VIVO</i> DEL DNA CON IL DAPI.....	PAG. 67
5.9	OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA.....	PAG. 67
5.10	ESTRAZIONE E SEPARAZIONE DEL DNA NUCLEARE E MITOCONDRIALE.....	PAG. 68
5.11	CURVA DI CRESCITA.....	PAG. 71
5.12	ANALISI PER GOCCIA DI COLONIE DI LIEVITO.....	PAG. 72

## **CAPITOLO VI**

### **RISULTATI**

6.1	COSTRUZIONE DI CEPPI DI <i>S. CEREVISIAE</i> CON ALLELI “NULLI” DEI GENI RTG.....	PAG. 74
6.2	EFFETTI DELLA LICORINA SULLE SINTESI MACROMOLECOLARI.....	PAG. 74
6.3	EFFETTO DEI GENI RTG.....	PAG. 77
6.3.1	ISOLAMENTO E CONTROLLO DI MUTANTI <i>RHO</i> <sup>0</sup> .....	PAG. 78
6.3.2	INFLUENZA DELLA LICORINA SULLA CRESCITA.....	PAG. 82
6.3.3	TEST PER GOCCIA DI RESISTENZA ALLA LICORINA.....	PAG. 83

## **CAPITOLO VII**

7.1	DISCUSSIONE.....	PAG. 87
7.2	CONCLUSIONI.....	PAG. 90

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>PAG. 91</b>
--------------------------	----------------

RINGRAZIAMENTI.....	PAG. 105
---------------------	----------

## INTRODUZIONE

La caratteristica che distingue le cellule eucariotiche da quelle procariotiche è la distribuzione dei loro organelli citoplasmatici in compartimenti.

Tra i vari tipi di organelli citoplasmatici presenti nella cellula eucariotica quelli che indubbiamente hanno suscitato maggiore interesse sono i mitocondri ed i cloroplasti che oltre alla loro funzione (la fotosintesi per i cloroplasti e la respirazione per i mitocondri), contengono un proprio corredo genico ed un sistema di sintesi proteica.

Il DNA presente in questi organelli è diverso in ognuno di essi e si differenzia anche dal DNA contenuto nel nucleo.

Pertanto, la genetica della cellula eucariotica è l'espressione delle informazioni geniche presenti sia nel nucleo che nei suddetti organelli.

La ricerca del passato ha sviluppato un quadro completamente dettagliato nell'architettura dell'espressione e nell'evoluzione del genoma mitocondriale.

La ricerca attuale si concentra sul problema dell'interazione tra gli organelli e gli organelli e il nucleo.

I geni nucleari coinvolti nelle funzioni mitocondriali sono e saranno studiati allo scopo di comprenderne la complessa intercomunicazione (*Wolf and Del Giudice, 1988*).

# **CAPITOLO I**

## 1.1 I MITOCONDRI

Le cellule degli eucarioti posseggono strutture specializzate, chiamate mitocondri, contenenti tutti gli enzimi necessari per la fosforilazione ossidativa e la respirazione aerobica, un proprio sistema genetico ed un sistema di sintesi proteica.

La formazione dei mitocondri si basa sull'assemblaggio di componenti specificati da due sistemi genetici: il nucleare e il mitocondriale. La maggior parte delle proteine mitocondriali (il 90% circa) è codificata dal genoma nucleare e sintetizzata sui ribosomi citoplasmatici, mentre il 5% del totale delle proteine mitocondriali è codificato e sintetizzato all'interno del mitocondrio. Il restante 5% è un problema ancora irrisolto e riguarda, probabilmente, l'aspetto regolativo della biogenesi dei mitocondri.

La lunghezza del mitocondrio varia da 1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  con un diametro di circa 0,5  $\mu\text{m}$ .

Esso è delimitato dall'ambiente circostante da due membrane :

- una **membrana esterna** e continua simile alla membrana del reticolo endoplasmatico che ha un contenuto lipidico del 40%, per la maggior parte colesterolo e fosfatidilinositolo, permeabile agli elettroliti, all'acqua, al saccarosio ed alle molecole grosse fino a 1000 daltons

- una **membrana interna** la quale presenta ampie invaginazioni note come '*creste mitocondriali*' ed ha un contenuto di lipidi del 20% in maggior parte cardiolipine importanti per il trasporto degli elettroni. Lo strato lipidico è infiltrato da una maggior

quantità di proteine, rispetto alla membrana esterna. Inoltre è impermeabile agli ioni, al saccarosio ed utilizza specifici *'carriers'* per il trasporto di varie sostanze come l'ATP (adenosin-trifosfato) e l'ADP (adenosin-difosfato), il succinato, il citrato ed altre. Su questa membrana interna, paragonabile alla membrana batterica, sono situati gli enzimi di trasporto della catena respiratoria e della formazione di ATP, moneta di scambio energetico in tutte le cellule.

La membrana interna racchiude una **matrice** liquida dove sono localizzati tutti gli enzimi del ciclo di Krebs, i complessi della respirazione comprendenti la catena del trasporto degli elettroni (ETC) e il processo di fosforilazione ossidativa (OXPHOS), il DNA mitocondriale (mtDNA), il sistema di sintesi proteica mitocondriale. Le due membrane sono separate tra loro da uno spazio che viene comunemente detto **spazio intermembrano** o **camera esterna** (Fig. 1 e Fig. 2).

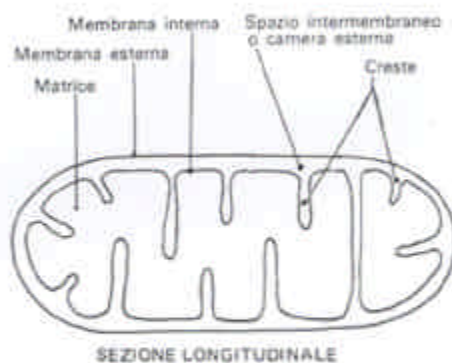


Fig.1

Schema in sezione longitudinale dell'organizzazione del mitocondrio medio

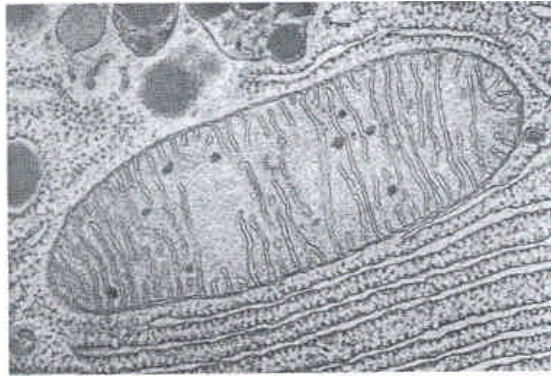


Fig.2

Microfotografia elettronica di cellula acinosa di pancreas di pipistrello (Lehninger,1973).

Come è stato detto il mitocondrio è la sede della produzione di energia, la cui fonte originaria per le cellule sono le sostanze nutritive introdotte dall'esterno. Queste sostanze contengono energia sotto forma di legami chimici di vario tipo.

Lo scopo principale dei mitocondri è quello di recuperare l'energia liberata dalla demolizione delle fonti di carbonio attraverso il ciclo di Krebs e la catena respiratoria. In questo processo intervengono reazioni di ossidazione i cui prodotti finali sono:

- acqua ( $H_2O$ );
- anidride carbonica ( $CO_2$ );
- energia , accumulata sotto forma di ATP.

I mitocondri presenti nel citoplasma delle cellule eucariotiche variano da poche a molte centinaia a seconda del fabbisogno energetico della cellula stessa .



I mitocondri dunque sono organelli a doppia membrana la cui funzione principale è quella di produrre energia mediante la fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Il processo OXPHOS avviene nella membrana interna dei mitocondri mediante una serie sequenziale di reazioni di ossidoriduzione, eseguite dai quattro complessi enzimatici della catena respiratoria mitocondriale: il **complesso I** che catalizza l'ossidazione del NADH (nicotinamide-adenin-dinucleotide nella forma ridotta perchè ha assunto un atomo di idrogeno H). Il **complesso II** che consente il trasferimento di elettroni al FAD (flavin-adenin-dinucleotide), che passa dalla forma ossidata alla forma ridotta  $\text{FADH}_2$  e all'ubichinone ma non permette il passaggio di protoni e catalizza inoltre l'ossidazione del succinato mediante l'ubichinone. L'enzima coinvolto in questa reazione è la succinico-deidrogenasi che accetta elettroni dal succinato trasferendoli, successivamente, all'ubichinone. Quest'ultimo, pertanto, occupa una posizione chiave tra i complessi I e II ed il resto della catena respiratoria. Il **complesso III** che catalizza l'ossidazione del CoQ (coenzima Q), che è presente nella forma ridotta mediante il citocromo c. Insieme al citocromo c, che fa da legame tra il complesso III ed il complesso IV, troviamo associati anche i citocromi b e  $c_1$ . Il **complesso IV** che costituisce la vera ossidasi finale della catena respiratoria. Infatti catalizza l'ossidazione del citocromo c nella sua forma ridotta mediante l'ossigeno molecolare. A questa reazione partecipano i citocromi a e  $a_3$  che costituiscono la citocromo-ossidasi.

L'energia liberata durante queste reazioni viene utilizzata dal **complesso V**, o ATP sintetasi, per produrre ATP, il “carburante” fondamentale del metabolismo cellulare (Fig. 3).

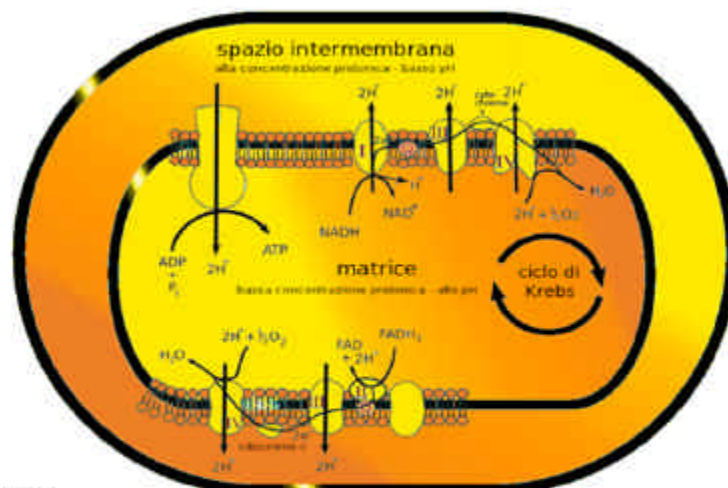


Fig.3

Schema della catena respiratoria con la sequenza di trasporto degli elettroni ed i quattro complessi enzimatici

Dal punto di vista genetico la catena respiratoria ha caratteristiche uniche, in quanto è formata da proteine codificate da due diversi sistemi genetici, il genoma nucleare ed il genoma mitocondriale. ( *Del Giudice and Wolf, 1983*)

## 1.2 IL SISTEMA GENETICO MITOCONDRIALE

Una evidenza della ereditarietà negli organelli fu presentata già quasi un secolo fa quando sia Correns che Baur, separatamente, nel 1909, scoprirono che alcuni caratteri genici, responsabili del

fenotipo di plastidi nelle piante superiori, mostravano proprietà di tipo non-mendeliano (Dujon, 1981).

La genetica dei mitocondri ebbe inizio circa 60 anni fa, quando Ephrussi e collaboratori isolarono dei mutanti respiratori difettivi (chiamati *petite* oppure *petite vegetativi*) ottenuti da una coltura del lievito *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) (Fig. 4) sia spontaneamente che dopo induzione con acriflavina.

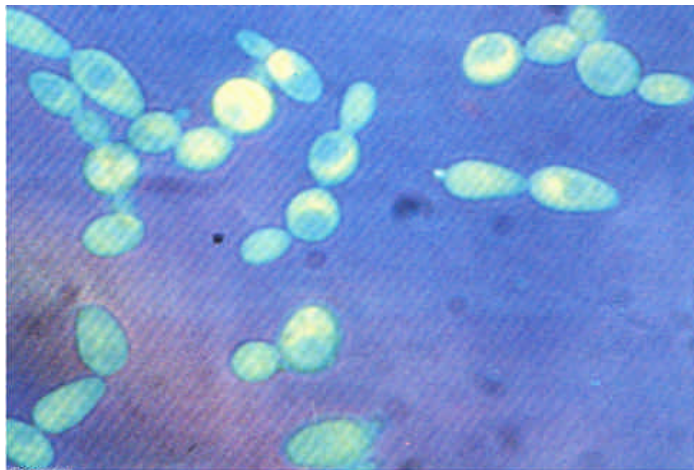


Fig.4

Cellule in fase di gemmazione del lievito  
*Saccharomyces cerevisiae*

Questi mutanti presentavano mutazioni in una serie di enzimi respiratori (Slonimski and Ephrussi, 1949) le quali non seguivano le classiche regole mendeliane sulla segregazione dei caratteri.

Infatti la segregazione di geni mitocondriali segue una statistica differente nella trasmissione dei caratteri di segno opposto con valori di 4:0, 0:4, 3:1, 1:3, 2:2 delle spore nelle tetradi, che sono differenti da quelli canonici di 2:2 per i geni nucleari.

Fu così scoperto un modo alternativo di trasmissione dei caratteri, indicativo per le particelle citoplasmatiche. Quindi diveniva chiaro che alcune funzioni mitocondriali, per esempio la formazione degli enzimi respiratori, erano sotto il controllo di un fattore citoplasmatico autoriproducibile (*Ephrussi and Slonimski, 1955; Slonimski, 1968*). Questo fattore fu successivamente chiamato fattore rho (*Sherman, 1963*).

L'esistenza di una specie di DNA, specifica per i mitocondri, fu riconosciuta parecchi anni più tardi, prima nei vertebrati e poi nei lieviti (*Schatz et al., 1964*). L'osservazione che il DNA mitocondriale (mtDNA) è altamente alterato nei mutanti rho<sup>-</sup> (questi mutanti sono deleti di parti del genoma mitocondriale), ma non nei mutanti respiratori di origine nucleare (i cosiddetti pet<sup>-</sup>), dimostrò in maniera conclusiva che il mtDNA è il materiale ereditario corrispondente al fattore rho (*Mounolou et al., 1966*).

Da questi dati appare chiaro che nella ricerca sui mitocondri è risultato determinante l'uso di eucarioti unicellulari, in particolare quello del lievito *S. cerevisiae*. Nel 1975 fu aperto un nuovo campo con la scoperta dei mutanti *petite* a mutazioni puntiformi, i cosiddetti mutanti mit<sup>-</sup> (*Tzagoloff, 1975*). Mediante questi mutanti fu possibile correlare i geni mitocondriali con i rispettivi prodotti genici.

Negli eucarioti inferiori i mitocondri codificano per un limitato numero di polipeptidi i quali sono parti costanti della catena respiratoria dell'ATP sintetasi.

Essi sono subunità enzimatiche situate sulla membrana interna:

- tre subunità della citocromo **c** ossidasi ;
- tre subunità della ATPasi ;
- il citocromo **b**.

Inoltre, i mitocondri codificano per :

- tRNA (RNA di trasferimento) (ne sono stati individuati 26);
- rRNA (RNA ribosomici) ( 15S e 21S);
- Fattori del meccanismo proteinsintetico.

Tutti gli altri componenti che costituiscono il mitocondrio, vengono codificati da geni nucleari e quindi importati nel mitocondrio. Questi componenti sono:

- le restanti proteine della membrana interna;
- proteine della matrice (intervengono nel ciclo dell'acido citrico);
- proteine della membrana esterna;
- enzimi necessari alla replicazione del mtDNA;
- enzimi necessari alla trascrizione del mtDNA;
- proteine che si combinano con l'RNA per formare i ribosomi;
- altri fattori necessari alla sintesi delle proteine mitocondriali.

*(Wolf and Del Giudice, 1988)*

L'acquisizione di una serie di mutazioni di resistenza agli antibiotici portò, inizialmente, alla compilazione delle mappe geniche mediante ricombinazione genica nei mitocondri di *S. cerevisiae* (*Dujon, 1981*).

Tuttavia queste mappe presentavano molte limitazioni per il fatto che non erano in grado di spiegare, a livello molecolare, una serie di fenomeni.

Un approccio che ha avuto successo nel mappaggio dei geni mitocondriali in *S. cerevisiae*, è stato l'utilizzazione dei mutanti di delezione rho<sup>-</sup> (Nagley et al.,1976) .

Il mappaggio fisico del genoma mitocondriale ottenuto tramite ibridazione RNA-DNA, l'uso degli enzimi di restrizione, l'impiego di DNA ricombinante e la pertinente analisi al microscopio elettronico hanno permesso di stabilire l'esatta posizione dei geni sul mtDNA di questo lievito (Fig. 5).

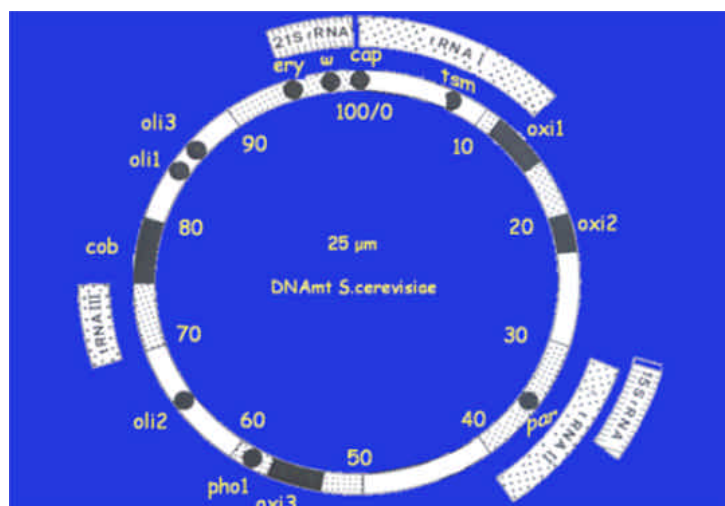


Fig.5

Mappa genetica del DNA mitocondriale del lievito *S.cerevisiae* (Del Giudice L. and Wolf K.,1983)

Pur con un contenuto genico relativamente costante, l'ordine e l'organizzazione dei geni mitocondriali varia in maniera

sorprendente nei vari organismi. L'organizzazione del genoma mitocondriale negli eucarioti inferiori, come l' *S. cerevisiae*, è meno compatta (i due terzi contengono sequenze non codificanti ricche di A-T), e molti geni, in particolare per l'apocitocromo *b*, per la subunità I della citocromo ossidasi, e per l'rRNA 21S sono discontinui per la presenza di introni e di mini inserzioni ricche di G-C e A-T il cui numero varia in dipendenza del ceppo. Alcuni introni di questi geni interrotti codificano per delle proteine coinvolte nel processamento degli RNA o nella trasposizione degli introni (*de Zamaroczy and Bernardi, 1986; Grivell, 1987*).

### **1.3 IL LIEVITO : SISTEMA IDEALE PER LO STUDIO DELLE FUNZIONI MITOCONDRIALI**

La maggior parte delle attuali conoscenze sulla genetica e biogenesi del mitocondrio, derivano dagli studi condotti sul lievito *S. cerevisiae*. Esso pur essendo un eucariota, presenta tutti i vantaggi di un microrganismo; infatti è facile da coltivare in grandi quantità in terreno di coltura contenente soltanto glucosio ed estratto di lievito ed il suo ciclo di divisione cellulare è relativamente breve, circa 2 ore, ed è sensibile ad un vasto spettro di agenti mutageni/carcinogeni.

Inoltre l'utilità di questo lievito, nello studio delle funzioni mitocondriali, deriva dalla sua capacità a ricavare la propria energia sia per via respiratoria che per via fermentativa.

Grazie a questa duplice fonte di energia è possibile isolare e coltivare i mutanti di questo organismo deficienti di una funzione fondamentale per la vita, quale è appunto la respirazione.

Analizzando le cellule di *S. cerevisiae* cresciute in un terreno con fonte di carbonio non fermentabile (glicerolo, lattato ecc...), si osservano dei mitocondri morfologicamente ben sviluppati e con un elevato grado di respirazione. In queste condizioni, si evidenziano un'alta concentrazione dei diversi citocromi ed una efficiente attività del processo ossidativo nella produzione di ATP.

Se, invece, le cellule di *S. cerevisiae* crescono in presenza di glucosio fermentabile, si nota una “*repressione*” della respirazione. Questo fenomeno, chiamato “*repressione da glucosio*”, porta ad una forte diminuzione dei componenti della catena respiratoria. Gli stessi mitocondri, in queste condizioni, si presentano più voluminosi e numericamente inferiori rispetto a quelli di una cellula in condizioni ottimali di respirazione.

Inoltre, questi mitocondri repressi, sono inibiti nella loro capacità di sintetizzare le proteine mitocondriali pur mantenendo inalterato il proprio contenuto di DNA.

La repressione da glucosio è comunque, un fenomeno reversibile. Infatti, è sufficiente diminuire la concentrazione di glucosio nella coltura per osservare la riattivazione del processo respiratorio.



Per quello che riguarda il suo ciclo vitale il lievito *S. cerevisiae* è un fungo unicellulare aploide, capace di riprodursi vegetativamente mediante gemmazione di cellule figlie. Presenta due cellule di sesso opposto, sesso **a** e sesso **α**.

Con queste lettere si indicano due alleli mendeliani che controllano la sessualità in questo lievito. Non esiste alcuna distinzione morfologica tra le cellule di sesso opposto, ma esse sono in grado di riconoscersi tra loro dal momento che, messe insieme, si fondono a due a due per formare una cellula diploide. Entrambe le cellule aploide e diploide sono stabili e, queste ultime, si riproducono anch'esse per via vegetativa mediante la gemmazione (Fig. 4). Le cellule diploidi, in determinate condizioni fisiologiche, ad esempio in terreno di coltura contenente acetato come unica fonte di carbonio, subiscono la meiosi dando quattro spore aploidi contenute in un asco. In quest'ultimo si ritrovano due spore di sesso **a** e due spore di sesso **α**.

In genere, lo stato eterozigote di ogni allele, nel nucleo zigotico, segrega con un rapporto 2:2.

Le spore sono facilmente separabili dall'asco mediante un micromanipolatore al microscopio ottico (*Del Giudice and Wolf 1983*).

#### 1.4 INTERAZIONE TRA IL NUCLEO E I MITOCONDRI

Uno dei problemi interessanti nello studio della biogenesi dei mitocondri è quello dei rapporti che intercorrono tra il nucleo e questi organelli. È noto infatti che all'espressione del genoma mitocondriale concorre l'attività di parecchi geni nucleari, ed è noto che i due sistemi concorrono nel fabbricare tutto il macchinario di sintesi proteica e quello degli enzimi respiratori (*Schatz and Mason, 1974*) (Fig. 6).

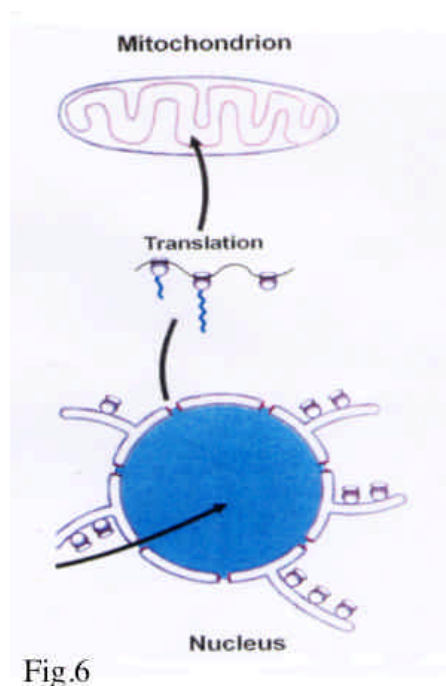


Fig.6

Illustrazione schematica della interazione nucleo - mitocondriale

Il mitocondrio è in grado di costruire autonomamente solo pochissime proteine, gli RNA di trasferimento, alcuni RNA

messaggeri e gli RNA ribosomici, mentre la maggior parte delle proteine viene sintetizzata nel citoplasma su RNA messaggeri di origine nucleare.

I prodotti della sintesi proteica mitocondriale costituiscono soltanto il 5% delle proteine totali mitocondriali, ma questi prodotti, anche se modesti, appaiono indispensabili.

Infatti i mutanti cellulari privi del mtDNA e, quindi, incapaci di sintetizzare le proteine mitocondriali, non sono in grado di assemblare la membrana interna del mitocondrio (*Wolf and Del Giudice, 1988*).

Il sistema di sintesi proteica mitocondriale si distingue da quello citoplasmatico per alcune proprietà che lo rendono più simile al sistema di sintesi proteica presente nei batteri. Esso è generalmente sensibile agli inibitori che bloccano l'attività dei ribosomi nei procarioti, come il cloramfenicolo e l'eritromicina, mentre risulta resistente almeno a due inibitori specifici dei ribosomi 80S citoplasmatici degli eucarioti e cioè all'anisomicina e alla cicloesimide. Queste caratteristiche di sensibilità e resistenza agli inibitori dei ribosomi mitocondriali hanno permesso di analizzare in vivo i siti della sintesi di specifiche proteine mitocondriali.

In particolare la sintesi di tre subunità della citocromo ossidasi (le altre 4 sono di origine nucleare), la sintesi di 1 componente del citocromo bcl (gli altri 6 componenti sono di origine nucleare) e la sintesi di tre componenti del complesso ATPasico (gli altri 7 componenti sono prodotti dal nucleo). Così, ognuno

di questi complessi della membrana interna mitocondriale, sono prodotti dalla combinazione di ogni gruppo di subunità nella membrana stessa e richiede una coordinazione tra questi due sistemi.

Poiché il numero dei geni sul genoma mitocondriale è limitato (*Del Giudice and Wolf, 1983; Wolf and Del Giudice, 1988*) risulta ovvio che un'ampio numero di geni nucleari sono coinvolti nella sintesi di componenti mitocondriali (ad esempio gli enzimi della catena respiratoria, oppure quelli della fosforilazione ossidativa). Inoltre, un numero di geni nucleari devono essere implicati direttamente nell'espressione del genoma mitocondriale dal momento che molti elementi del macchinario biosintetico mitocondriale o della replicazione oppure della trascrizione del mtDNA sono codificati dal nucleo.

I mutanti nucleari difettivi nell'attività respiratoria, sono chiamati '*petite*'-segregazionali, perché segregano, come tutti i geni mendeliani, durante la meiosi con un rapporto di 2:2. Una serie di questi *petite*-nucleari (indicati con *pet*) sono stati isolati da differenti gruppi di ricerca parecchi anni fa (*Dujon, 1981*).

La ricerca sui mitocondri è attualmente concentrata sulle funzioni genetiche del mtDNA e le malattie associate alle disfunzioni mitocondriali. È quindi molto importante definire il ruolo di questi organelli nella segnalazione intracellulare, un processo che probabilmente ha implicazioni di rilievo nello sviluppo, nell'invecchiamento, nella malattia e nell'adattamento ambientale.

## **1.5 USO DEGLI INIBITORI PER LO STUDIO DEL RAPPORTO TRA IL NUCLEO E I MITOCONDRI**

E' noto, dagli studi condotti sulle interazioni nucleo-mitochondriali, che la sintesi proteica sui ribosomi citoplasmatici è specificamente inibita dalla cicloesimide (*Siegel and Sisler, 1965*), mentre la sintesi sui ribosomi mitocondriali è specificamente inibita dagli antibiotici antibatterici come, ad esempio, il cloramfenicolo (*Rendi, 1959*) e l'eritromicina (*Clark-Walker and Linnane, 1966*).

Esperimenti di marcatura con precursori radioattivi in presenza di inibitori specifici hanno dato un contributo fondamentale per identificare l'origine biosintetica delle proteine mitocondriali. Questo approccio nello studio delle interazioni nucleo-mitochondriali è stato applicato a cellule di lievito, ad altri funghi, a protozoi, ad alghe, a cellule di mammifero e a piante (*Schatz and Mason, 1974*). Questi studi hanno messo in evidenza la stretta coordinazione tra il sistema biosintetico mitocondriale e quello citoplasmatico. In particolare hanno dimostrato che le proteine sintetizzate dal mitocondrio sono prodotte in quantità significative soltanto se sono continuamente combinate con altre proteine complementari prodotte nel citoplasma.

Secondo questo punto di vista la sintesi proteica mitocondriale nelle cellule inibite dalla cicloesimide riflette la presenza di un

eccesso di riserva delle proteine complementari e si blocca quando questa riserva è esaurita.

In altri termini, le proteine prodotte dal citoplasma controllano in qualche modo la sintesi proteica mitocondriale (*Schatz and Mason, 1974*). In particolare nei lieviti, mutazioni nel sistema genetico nucleare che controllano il sistema biosintetico mitocondriale sono stati ben caratterizzati (*Dujon, 1981*).

## 1.6 LA LICORINA

La licorina (Fig. 7) è un alcaloide presente nei bulbi di *Sternbergia Lutea* Ker-Gawel, un Amarillidacea che cresce spontaneamente in Puglia (*Manske, 1968*).

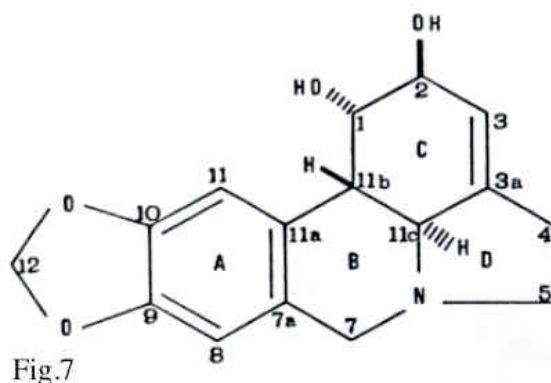


Fig.7

Formula di struttura dell'alcaloide licorina estratto dalle amarillidaceae

L'estrazione di questo alcaloide inizia con la raccolta dei bulbi al termine del periodo vegetativo in quanto è stato dimostrato

(*Evidente et al., 1984*) che, sebbene la sintesi della licorina avvenga nelle foglie, essa viene accumulata nei bulbi.

La licorina è solubile in acido, pertanto i bulbi dopo essere stati essiccati e finemente triturati, vengono messi in acido solforico 1% e successivamente alcalinizzati a pH 12-13. Si ottiene così un precipitato che viene raccolto mediante centrifugazione e che contiene l'alcaloide grezzo successivamente cristallizzato in etanolo bollente.

La licorina pura è costituita da cristalli bianchi che si sciolgono in acido (*Evidente et al., 1984*).

Negli ultimi anni quest'alcaloide ha suscitato molto interesse per le sue attività biologiche. Oltre ad alcune attività minori, come l'inibizione della clorofilla (*Hideo, 1975*), e l'attività antimicrobica (*Miyakado et al., 1975*), appaiono di notevole importanza gli effetti della licorina sulle principali vie metaboliche delle cellule vegetali; in particolare dette attività riguardano l'inibizione della crescita e dell'allungamento cellulare (*De Leo et al., 1973*).

A basse concentrazioni la licorina blocca il ciclo cellulare nell'interfase nelle piante superiori, nelle alghe e nei lieviti (*De Leo et al., 1973*). In questi sistemi, alla concentrazione di  $10^{-4}$  M, inibisce drasticamente la crescita bloccando sia la sintesi proteica che quella dell'RNA.

L'effetto della licorina sulla sintesi proteica è chiaramente un effetto indiretto, infatti è stato visto che i polisomi isolati sono sensibili alla licorina (*Arrigoni et al., 1975*).

Nei vegetali è stato riscontrato che la licorina, a basse concentrazioni, inibisce la biosintesi dell'acido ascorbico e di conseguenza previene lo sviluppo del processo respiratorio insensibile all'acido cianidrico (*Arrigoni et al., 1976; 1977*).

Questi effetti furono attribuiti alla necessità dell'acido ascorbico nel controllo biosintetico delle proteine contenenti idrossiprolina nelle piante (*Arrigoni et al., 1977*).

La relazione tra la licorina ed il sistema biosintetico dell'acido ascorbico ha permesso di studiare le reazioni che dipendono da questo acido in quei microrganismi in cui esso viene sintetizzato. In particolare è stato verificato che l'*Escherichia coli* (*E. coli*) e altri procarioti sono insensibili alla licorina in quanto riescono a degradarla. Infatti sono stati isolati e identificati alcuni prodotti metabolici della degradazione della licorina (*Evidente et al., 1985*). Tra le attività inibitorie della licorina messe in evidenza si ricordano: l'inibizione della divisione delle cellule tumorali (*Jimenez et al., 1976*) ed un effetto antivirale (*Asadov and Ismalloy, 1972*).

Negli ultimi 20 anni, la licorina si è dimostrata un potente strumento per gli studi sulle interazioni nucleo mitocondriali nei lieviti.

Infatti questo inibitore è in grado di differenziare tra ceppi del lievito *S. cerevisiae* respiratorio-competenti (sensibili alla licorina, cioè le cellule non sono in grado di crescere in sua presenza) e ceppi respiratorio-deficienti, totalmente privi del mtDNA



(resistenti alla licorina, cioè le cellule sono capaci di crescere in sua presenza) (*Del Giudice et al., 1984*).

Inoltre è stata dimostrata la capacità della licorina di evidenziare la stabilità mitotica dei genomi mitocondriali  $\text{rho}^+$  e  $\text{rho}^-$  in presenza o assenza del gene CCE1 (*Massardo et al., 2000*) e di mettere in evidenza l'influenza del genoma mitocondriale sul genoma nucleare nei lieviti (*Del Giudice et al., 2005*).

## **CAPITOLO II**

## 2.1 LA REGOLAZIONE RETROGRADA NEL DIALOGO INTRACELLULARE

Il genoma mitocondriale presenta limitate capacità di codificare e, per tale motivo è necessario che il genoma nucleare sia impegnato, in un ruolo preminente, nella biogenesi del mitocondrio. Tuttavia inizialmente, quando è stata stabilita la semi-autonomia genetica del mitocondrio, la complessità di questa dipendenza dal nucleo non è stata evidente. In virtù della relativa facilità con cui sia i geni nucleari che i geni mitocondriali possono essere sottoposti all'analisi genetica e molecolare, il lievito *S. cerevisiae* ha dimostrato essere un prezioso sistema per lo studio dei diversi modi mediante i quali il nucleo contribuisce alla biogenesi dei mitocondri.

Il fatto che entrambi i genomi sia nucleare che mitocondriale partecipino alla biogenesi di mitocondri funzionali suggerisce che, dove i prodotti di entrambi i genomi si combinano per formare complessi funzionali all'interno dell'organello, la sintesi di quei prodotti dovrebbe essere coordinata. Le interazioni tra il nucleo e i mitocondri coinvolgono due distinti sentieri di comunicazione. Il **sentiero anterogrado** o **regolazione anterograda** o **segnale anterogrado**, è una conseguenza dell'essenziale ma limitato ruolo dell' mtDNA nella biogenesi del mitocondrio, ed indica il flusso di prodotti (le proteine) codificati dal genoma nucleare e importati dal mitocondrio. Come atteso, il **sentiero anterogrado** è regolato a parecchi

livelli: dal controllo dell'espressione dei geni nucleari che codificano proteine mitocondriali all'importo e all'assemblaggio di quelle proteine in complessi funzionali nella loro collocazione all'interno dei mitocondri.

Il Segnale Anterogrado controlla ampiamente oltre all'espressione, la replicazione, il riparo, la ricombinazione e la trasmissione del genoma mitocondriale, nonché il dinamismo (la fissazione e la fusione) mitocondriale e la carica genetica dei mitocondri.

Il **sentiero retrogrado** o **regolazione retrograda** o **segnale retrogrado**, al contrario indica il flusso di segnali che dal mitocondrio vengono trasmessi al nucleo e ad altri compartimenti cellulari (*Butow and Avadhani, 2004*) (Fig. 8).

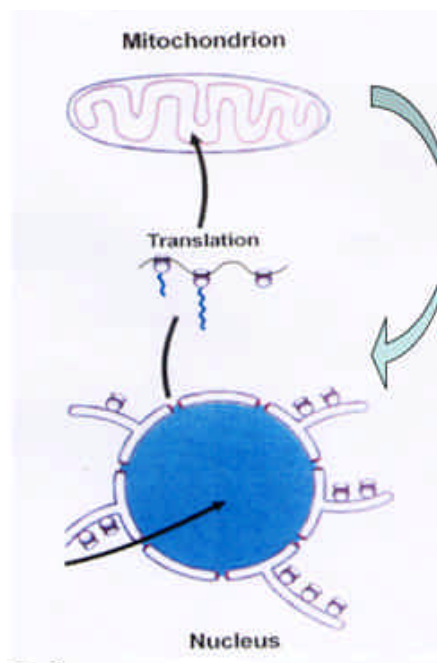


Fig.8

Illustrazione schematica della comunicazione anterograda e retrograda tra il nucleo e il mitocondrio

Il **sentiero retrogrado** è un mezzo mediante il quale le cellule possono monitorare e regolare la risposta cellulare in base ai cambiamenti dello stato funzionale dei mitocondri. La risposta retrograda ha funzioni di adattamento, nella maggior parte dei casi, in quanto rappresenta gli aggiustamenti cellulari in risposta ad un alterato stato mitocondriale o a disfunzioni mitocondriali. Di recente è stato evidenziato che processi fondamentali, sia della cellula che dell'organismo, inclusa la morte programmata della cellula (apoptosi), l'invecchiamento, lo sviluppo, molte risposte patofisiologiche e il cancro coinvolgono la **regolazione retrograda** (*Butow and Avadhani, 2004*).

Una diretta evidenza a sostegno dell'ipotesi che la compensazione sia una funzione della **regolazione retrograda** in seguito ad un cambiamento nell'espressione genica nucleare in rapporto a qualche deficienza mitocondriale, deriva da un'analisi degli effetti nel lievito *S. cerevisiae*, del cambiamento sull'espressione di un'isoforma perossisomale della citrato-sintetasi (CS2, codificata dal gene CIT2), un enzima del ciclo del gliossilato (*Liao et al., 1991*).

Nel lievito, il ciclo dell'acido tricarbossilico (ciclo TCA) nei mitocondri, ed il ciclo del gliossilato nei perossisomi sono legati metabolicamente, dal momento che entrambi i cicli contengono metaboliti comuni ed interscambiabili (sentieri anaplerotici) (Fig. 9).

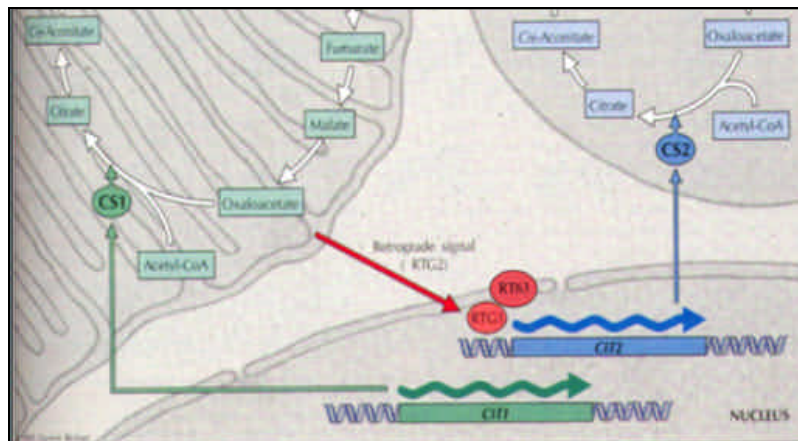


Fig.9

Rappresentazione schematica della comunicazione metabolica tra il ciclo dell'acido tricarbossilico nel mitocondrio e il ciclo del glicosilato nel perossisoma (sentieri anaplerotici) regolato dal segnale retrogrado.

La dimostrazione che questo legame metabolico rientra nel **sentiero retrogrado** è stata data dall'osservazione che nelle cellule in cui il ciclo TCA è inattivato dalla distruzione del gene CIT1, il gene che codifica per l'isoforma mitocondriale della citrato-sintetasi (CS1), si riscontra un aumento della trascrizione del gene CIT2 e dell'attività dell'enzima CS2 da esso codificato. Questo aumento può compensare parzialmente la mancanza dell'enzima CS1 attraverso la traslocazione del citrato dai perossisomi ai mitocondri (*Liao et al., 1991*).

In rapporto al ceppo, nelle cellule con disfunzioni mitocondriali, l'espressione di CIT2 può essere super regolata fino a 50-60 volte.

La **regolazione retrograda** dell'espressione del gene CIT2 è sorprendentemente complessa. Sono stati infatti descritti in letteratura tre fattori regolatori positivi: Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p

(*Liao and Butow, 1993; Jia et al., 1997*), e quattro fattori regolatori negativi: Mks1 (*Dilova et al., 2002; Sekito et al., 2002*) Lst8p, Bmh1p e Bmh2p (*Liu et al., 1999*) che controllano sia l'espressione basale che l'espressione retrograda indotta da CIT2.

Rtg1p e Rtg3p sono fattori di trascrizione a cerniera di leucina basica elica-ansa-elica (bHLH-zip) che eterodimerizzano per attivare la trascrizione ad un sito inedito, GTCAC, chiamato R-box (*Jia et al., 1997*). Rtg3p contiene entrambi i domini di transattivazione N e C terminali, mentre in Rtg1p non è stato identificato nessun dominio, di transattivazione.

Rtg2p è un altro fattore di regolazione della **risposta retrograda** in lievito. Esso presenta, all'N-terminale, un sito di legame per l' ATP simile a quello trovato nella superfamiglia delle proteine che legano ATP Hsp70/actina /zucchero chinasi (*Koonin, 1994*) la cui integrità è essenziale per la funzione di Rtg2p (*Liu et al., 2003*). Rtg2p agisce a monte del complesso trascrizionale Rtg1p/Rtg3p (*Sekito et al., 2000*) ed ha la funzione sia di agire come sensore prossimale della disfunzione mitocondriale sia di essere un trasduttore dei segnali mitocondriali che, attraverso l'attivazione del complesso Rtg1p/Rtg3p, mettono in moto la trascrizione dei geni bersaglio. Sebbene vi sia molto da imparare sul come Rtg2p avverta la disfunzione mitocondriale, stiamo iniziando a capire come esso regoli il complesso Rtg1p/Rtg3p (*Sekito et al., 2000*). Quando il sentiero RTG è interrotto, Rtg1p e Rtg3p sono sequestrati insieme nel citoplasma dove Rtg3p è

fosforilato in siti multipli della proteina; quando il sentiero retrogrado è attivato Rtg3p diventa parzialmente defosforilato ed entra nel nucleo, come anche Rtg1p. Nel nucleo queste proteine si legano ad un sito chiamato R-box (nella regione del promotore) ed attivano la trascrizione. Nelle cellule prive della proteina Rtg2p, la proteina Rtg3p diventa iperfosforilata ed il complesso Rtg1p/Rtg3p rimane citoplasmatico non più sensibile ai segnali retrogradi. Così, il sito principale di controllo della risposta retrograda dipendente da RTG, è rappresentato dalla localizzazione intracellulare del complesso Rtg1p/Rtg3p (Fig. 10).

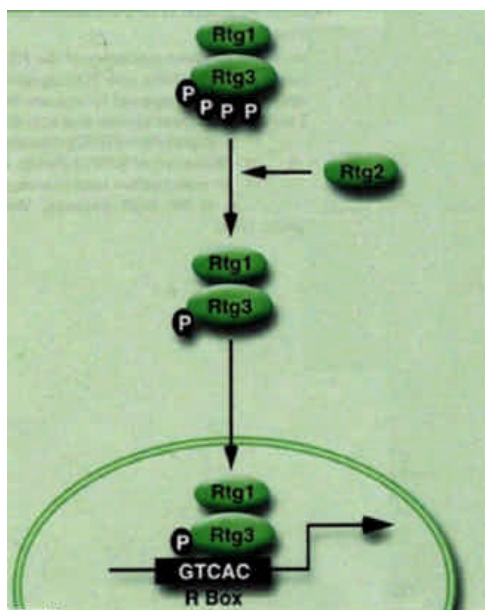


Fig.10

Rappresentazione schematica del sentiero dipendente da RTG del segnale retrogrado.



L'analisi genetica volta alla ricerca di mutanti capaci di superare la richiesta della proteina Rtg2p è stata particolarmente fruttuosa nella formulazione di questa domanda (*Liu et al., 2001; 2003; Sekito et al., 2002*).

Tra i fattori scoperti vi era il fattore MKS1, il quale, identificato indipendentemente da due diversi gruppi di ricerca, è un regolatore negativo dell'espressione genica dipendente da RTG (*Dilova et al., 2002; Tate et al., 2002*), come anche gli altri fattori regolatori negativi del sentiero RTG. L'espressione di CIT2 nelle cellule in cui MKS1 è inattivato è costitutivamente alta, insensibile alla repressione da glutammato e indipendente dalla proteina Rtg2p. La comprensione del ruolo chiave di Rtg2p, come regolatore principale, nel sentiero RTG deriva dalle osservazioni che la proteina Rtg2p interagisce dinamicamente con MKS1p (*Sekito et al., 2002; Liu et al., 2003*). Quando il sentiero RTG è attivo, MKS1p, una fosfoproteina, è presente in una forma defosforilata complessata con Rtg2p; quando il sentiero RTG è inattivo il fattore MKS1p diventa fosforilato e non interagisce più con Rtg2p.

I mutanti Rtg2p con mutazioni puntiformi localizzate all'interno oppure vicine alle regioni conservate di quel dominio, non solo sono incapaci di interagire con MKS1p, ma non sono neppure in grado di determinare l'espressione del gene bersaglio RTG. Molto probabilmente, è richiesta l'idrolisi dell'ATP oppure l'ATP per ciclizzare il legame di MKS1p all'Rtg2p. Infine, nonostante vi siano molti elementi che indicano che Rtg2p è un

fattore citoplasmatico e che quindi è in grado di regolare in questa sede il sentiero RTG, sono stati anche presentati dati che mettono in evidenza una possibile funzione di Rtg2p a livello del nucleo, in questo caso tale fattore agisce direttamente sul promotore CIT2 (*Pray-Grant et al., 2002*). Quest'ultimo effetto, tuttavia, sembra non essere associato al **segnale retrogrado**.

A causa del legame tra l'attività respiratoria e la biosintesi del glutammato, l'inibizione del sentiero RTG attraverso l'inattivazione di qualcuno dei geni RTG nelle cellule respiratorio deficienti, oppure nelle cellule rho<sup>+</sup> con ridotta respirazione mitocondriale, determina l'auxotrofia da glutammato (*Liao and Butow, 1993; Liu and Butow, 1999*). Come rilevato in precedenza, ciò deriva dal fatto che l'espressione dei geni del ciclo TCA responsabili della sintesi dell'  $\alpha$ -chetoglutarato, del CIT1, dell'ACO1, dell>IDH1 e dell>IDH2, i quali sono regolati dal complesso trascrizionale Hap2,3,4 in cellule con una vigorosa attività respiratoria (*Rosenkranz et al., 1994*) vanno in maniera crescente sotto il controllo dei geni RTG in seguito al declino dell'attività respiratoria (*Liu and Butow, 1999*). Queste variazioni trascrizionali sottolineano l'importanza del sentiero RTG nell'adattamento del metabolismo dei carboidrati in cellule respiratorio deficienti. Perfino in cellule respiratorio competenti, l'affamamento da glutammato attiva in maniera forte il sentiero RTG (*Liu and Butow, 1999*); in altre parole il glutammato è un potente repressore dell'espressione dei geni dipendenti da RTG. Sebbene il sentiero RTG è chiaramente

legato all'omeostasi del glutammato, resta ancora da chiarire, quale metabolita(i) attivi (o attivino) l'espressione del gene che dipende da RTG.

## **2.2 IL SEGNALE RETROGRADO E L' INVECCHIAMENTO**

I meccanismi che definiscono e controllano la durata della vita di un organismo sono nell'insieme complessi, controversi e sconcertanti. I mitocondri hanno un posto preminente nel processo di invecchiamento, sia perchè sono sorgenti di ROS (specie di ossigeno reattive) sia perchè sono responsabili di attivare segnali che possono attenuare il processo di invecchiamento attraverso riarrangiamenti metabolici.

Una stima dell' invecchiamento del lievito di gemmazione si basa sull'osservazione della sua vita replicativa, ovvero sul numero di gemme che una cellula madre produce prima di morire (*Mortimer and Johnson, 1959*). Nella durata della vita della cellula di lievito, sono coinvolti molteplici fattori i quali possono agire in maniera indipendente, come per esempio il segnale Ras-cAMP (*Jazwinski, 1999*); il silenziamento genomico (*Imai et al., 2000*), la disponibilità di nutrienti (*Jiang et al., 2000; Lin et al., 2000*), e i livelli extracromosomici di repliconi di rDNA (DNA ribosomico) (*Sinclair and Guarente, 1997*).

Che il segnale retrogrado avesse un'influenza sulla durata della vita del lievito è stato notato per la prima volta da *Kirchman et al.*

(1999), i quali osservarono che, per alcuni ceppi, deficienti respiratori, sia per la perdita di DNA mitocondriale sia per una mutazione nucleare, si verificava una notevole estensione della durata della vita. Vi sono due evidenze che suggeriscono che il segnale retrogrado associato alla deficienza respiratoria è un fattore determinante che influisce sull'estensione della durata della vita. La prima evidenza è che tale fenomeno non si osserva in un ceppo con una debole risposta retrograda (come misurata dal livello di espressione di CIT2 in cellule deficienti respiratorie), la seconda evidenza è che l'aumento dell'estensione della durata della vita della cellula di lievito è invertito dall'inattivazione dei geni RTG. Per spiegare in maniera razionale il ruolo della risposta retrograda nell'invecchiamento bisogna aver presente che la funzione mitocondriale declina con l'età e che l'attività del **segnale retrogrado** aumenta per compensare tale declino (Kirchman et al., 1999).

In *C. elegans*, è stato osservato che la durata della vita può essere allungata negli animali con disfunzioni mitocondriali, per esempio nei mutanti *clk-1*, i quali sono difettivi nella biosintesi del coenzima Q (coQ) (Felkai et al., 1999). Nei mutanti *clk-1* vi è accumulo di dimethoxyubiquinone (DMU) il quale è un precursore del coQ che è un potente antiossidante (Miyadera et al., 2002). L'allungamento della durata della vita in tali mutanti può avvenire non soltanto a causa dell' aumentata capacità di questi animali di reagire ai ROS, ma può anche essere causata dal ridotto grado di crescita, una proprietà che può contribuire in

maniera significativa alla longevità del verme (*Guarente and Kanyon, 2000*). Due studi recenti in cui è stata impiegata la metodica dell'RNAi (l'RNA che interferisce) hanno fortemente coinvolto la funzione mitocondriale e, indirettamente, il **segnale retrogrado** il quale risulta essere un elemento determinante che svolge un ruolo critico nella durata della vita di *C. elegans* (*Dillin et al., 2002; Lee et al., 2003*). Un esauriente vagliatura di RNAi di mutanti di lunga vita ha messo in evidenza che l'inattivazione di un numero di proteine mitocondriali, che determinava l'abbassamento della capacità di fosforilazione ossidativa, estende in maniera significativa la durata della vita (*Lee et al., 2003*). L'aumentata longevità degli animali aventi la funzione mitocondriale compromessa potrebbe derivare dalla combinazione dell'aumentata capacità di rispondere allo stress ossidativo con lo slittamento metabolico verso i sentieri anaplerotici, similmente alla risposta retrograda in *S. cerevisiae*. L'inattivazione diretta da RNAi, di componenti specifici della catena del trasporto elettronico del mitocondrio ed i complessi dell'ATP sintetasi, nella fase precoce dello sviluppo risulta anche in un aumento della longevità nei vermi in concomitanza di una ridotta crescita e di un vigore comportamentale (*Dillin et al., 2002*). Ciò che è stato sorprendente è che l'inattivazione da RNAi delle proteine mitocondriali in animali adulti, la quale porta ad analoghe riduzioni nella capacità di fosforilazione ossidativa mitocondriale non estende la durata della vita. Inoltre liberando dalla inibizione da RNAi gli animali adulti trattati in

fase precoce dello sviluppo con RNAi non si ristabiliscono i (ridotti) livelli di ATP. Nell'insieme, questi studi suggeriscono che interferendo con la funzione mitocondriale nella fase precoce dello sviluppo si attivano eventi che applicati successivamente vanno ad estendere la longevità. Come in tutti gli altri organismi dove è stato analizzato, la restrizione calorica (CR) nel lievito, dove è facile provocarla limitando la quantità di glucosio nel mezzo di crescita, estende la durata della vita (*Jiang et al., 2000; Lin et al., 2000*). I meccanismi mediante i quali avviene un aumento della durata della vita sono oggetto di calorose discussioni. E' stato suggerito che l'estensione della durata della vita mediante la CR e mediante il sentiero retrogrado sono processi meccanicisticamente separati ma entrambi incidono su di una serie di geni relativi al metabolismo e allo stress (*Jazwinski, 2002*).

Apparentemente, a differenza delle scoperte che la deficienza respiratoria può estendere la durata della vita, vi sono risultati che dimostrano che la CR determina un aumento della respirazione in cellule di lievito di lunga vita e che l'estensione della durata della vita associata con il regime CR viene invertita bloccando il trasporto elettronico mitocondriale (*Lin et al., 2002*).

## 2.3 SENTIERI RETROGRADI IN CELLULE DI MAMMIFERO

L'alterata espressione di geni nucleari in risposta alla disfunzione mitocondriale, in cellule di mammifero, fu suggerita dagli studi che mostravano aumentati livelli di mRNA codificanti per varie proteine mitocondriali in differenti linee cellulari rho<sup>0</sup> (*Marusich et al., 1997; Wang and Morais, 1997*).

Segnali retrogradi mitocondriali in cellule di mammifero (riferito anche come segnale di stress mitocondriale) sono stati descritti inizialmente nei mioblasti dello scheletro C2C12 (Rabdomioblasti) e successivamente confermati nelle cellule A549 di carcinoma polmonare umano (*Biswas et al., 1999; Amuthan et al., 2002*). Lo stress mitocondriale fu definito dall'alterato potenziale  $\Delta\Psi_m$  della membrana mitocondriale indotta sia dal trattamento delle cellule con Bromuro di Etidio (EtBr) che provocava delezioni parziali del loro contenuto di mtDNA sia con lo ionoforo specifico mitocondriale, CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hidrazone). Questi trattamenti risultano in elevati ioni Ca<sup>++</sup> liberi nel citosol (Ca<sup>++</sup>)<sub>c</sub> e nell'attivazione della Calcineurina che risponde alla Ca<sup>++</sup>/calmodulina e loro fattori imparentati. In entrambi i tipi cellulari lo stress mitocondriale causava la regolazione a monte di un numero di geni coinvolti nel trasporto e nell'immagazzinamento del Ca<sup>++</sup>, incluso il Ryanodine Receptor I e II (RyR1 oppure RyR2), la Calreticolina e la Calsequestrina

(*Biswas et al., 1999; Amuthan et al., 2001*). I cambiamenti biochimici e fenotipici incluso l'espressione di geni marcatori nucleari, l'aumento del  $(Ca^{++})$  libero nel citosol, e l'alterata morfologia cellulare associata con le delezioni parziali del mtDNA, furono riportati quasi ai livelli di quelli delle cellule di controllo in cellule revertite il cui contenuto di mtDNA era aumentato in seguito alla crescita in terreno privo di EtBr. Queste scoperte forniscono un legame diretto tra lo stress mitocondriale indotto dalla riduzione del contenuto di mtDNA e la distruzione di  $\Delta\Psi_m$  e l'alterazione osservata nella fisiologia cellulare e nell'espressione del gene nucleare.

Un simile segnale retrogrado che coinvolge un aumento del  $(Ca^{++})_c$  libero nel citosol fu osservato in cellule di feocromocitoma di ratto trattate con il disaccoppiante carbonylcyanamide p-(trifluorometoxy) phenylidrazone (FCCP) (*Luo et al., 1997*). Gli aumentati livelli di  $Ca^{++}$  in cellule trattate con FCCP si correlavano con l'attivazione delle kinasi ERK1 e ERK2. Utilizzando cellule 143B rho<sup>0</sup> di fibrosarcoma umano ed una linea cellulare cybrid MERRF (epilessia mioclonica con fibre rosse a raggiera) il t-RNA<sup>lys</sup> mutato mitocondriale (A8344G) (*Arnould et al., 2002*), mostrarono che la deficienza respiratoria e l'associato aumento del  $Ca^{++}$  libero nel citosol induceva l'attivazione di CaMKIV, il quale a sua volta attivava CREB mediante la fosforilazione della proteina. In tutti questi sistemi cellulari, la rimozione del  $Ca^{++}$  mediante chelatori specifici annullava l'attivazione di vari



fattori (che rispondono al  $\text{Ca}^{++}$ ) e l'induzione della trascrizione dei geni nucleari bersaglio confermando il ruolo del  $\text{Ca}^{++}$  nel segnale retrogrado. I mitocondri anche sembrano avere un sentiero di risposta allo stress superficialmente simile alla risposta delle proteine non ripiegate nel reticolo endoplasmico (*Mori et al., 1993; Travers et al., 2000*). L'accumulo di una forma mutante di ornitina transcarbossilasi (OTC) ripiegata in forma errata nella matrice mitocondriale induce una risposta allo stress che attiva la proteina CHOP omologa a CEBP e induce l'espressione di geni nucleari che codificano per proteine che rispondono allo stress, Cpn60, Cpn10, mtDNAJ e ClpP (*Zhao et al., 2002*).

L'attività trascrizionale di CHOP è modulata dalla sua associazione con CEBP/ $\beta$  e ATF2. Interessante è la scoperta che ATF2 e alcuni membri della famiglia di fattori CEBP sono anche attivati dal segnale retrogrado in seguito alla distruzione del  $\Delta\Psi_m$  (*Biswas et al., 1999*). Inoltre, poichè il rimaneggiamento del mtDNA causa anche un aumento dell'espressione degli stessi geni chaperone nucleari (*Martinius et al., 1996*), è probabile che la risposta allo stress mediata dall'errato ripiegamento di OTC sia associata con la disfunzione mitocondriale e con il collasso di  $\Delta\Psi_m$ . È probabile che la ridotta entrata del  $\text{Ca}^{++}$  nei mitocondri ed il ridotto afflusso di  $\text{Ca}^{++}$  dal citosol, dovuto ad un basso pool di ATP cellulare, potrebbe essere responsabile per l'osservato aumento del  $\text{Ca}^{++}$  libero (*Biswas et al., 1999; Amuthan et al., 2002*). Rimane da vedere se il segnale retrogrado nelle

cellule di mammifero sia anche indotto dal cambiamento del pool di metaboliti mitocondriali come in lievito e se differenti meccanismi di segnale influenzino differenti geni bersaglio nucleari.

Anche l'ossido di azoto (NO) è considerato come un'importante molecola di segnale intramitocondriale che modula la respirazione mediante un legame diretto con la citocromo C ossidasi (Cleeter *et al.*, 1994). Questa azione cGMP-indipendente di NO è nota indurre anioni superossido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (collettivamente riferiti come ROS) e innescare il segnale redox (Brookers *et al.*, 2002, 2003). Sebbene la conseguenza patologica della produzione di ROS mediante l'NO sia invariabilmente legata all'apoptosi (Dai *et al.*, 2001), è probabile che l'NO prodotto nei mitocondri sotto condizioni fisiologiche può indurre il segnale retrogrado attraverso il  $\Delta\Psi_m$  alterato.

## **CAPITOLO III**

### 3.1 LE DNA POLIMERASI

La doppia elica del DNA è costituita da due parti tra loro complementari, per cui data la sequenza delle basi su di un filamento viene automaticamente definita la sequenza delle basi dell'altro filamento, secondo le regole di appaiamento: A-T, G-C. La replicazione del DNA in biologia è un processo fondamentale che serve a trasmettere in modo accurato l'informazione genetica (*Bielas and Loeb, 2005*). In vivo la sintesi del DNA avviene sfruttando questa caratteristica: in una molecola di DNA i due filamenti si separano e ciascuno serve da stampo per la sintesi di un nuovo filamento, in cui la sequenza delle basi è dettata dalle regole di appaiamento complementare. Il filamento neosintetizzato ha sequenza di basi complementare al filamento stampo e identica all'altro filamento. Per effetto della duplicazione da una molecola a doppia elica si ottengono due molecole a doppia elica, ciascuna costituita da un filamento vecchio e da un filamento di nuova sintesi. Le due doppie eliche sono identiche alla doppia elica madre e ciascuna molecola figlia è costituita per metà da un filamento della molecola madre.

Questo tipo di replicazione è detto "semiconservativo", in quanto le molecole figlie conservano fisicamente metà della molecola madre.

Un enzima in grado di sintetizzare un nuovo filamento di DNA su un filamento stampo è una DNA polimerasi (*Kornberg and Baker, 1991*). Sia le cellule procariotiche che quelle eucariotiche contengono diverse DNA polimerasi, però solo alcuni di questi

enzimi effettuano davvero la replicazione, per cui sono anche chiamati DNA replicasi. Gli altri svolgono ruoli sussidiari nella replicazione e/o partecipano alla sintesi di riparazione.

Tutte le DNA polimerasi procariotiche ed eucariotiche condividono lo stesso tipo di attività sintetica. Ognuno di questi enzimi catalizza la formazione di una catena di DNA aggiungendo un nucleotide alla volta a un'estremità 3'-OH. Questo determina l'allungamento del nuovo filamento sempre in direzione 5' → 3'. La scelta del nucleotide da aggiungere alla catena in crescita è dettata dalle leggi dell'appaiamento delle basi con il filamento stampo. Mano a mano che la DNA polimerasi si sposta in avanti, la doppia elica si svolge anteriormente all'enzima ad opera sia di un altro enzima, chiamato elicasi, il quale separa i filamenti di un acido nucleico a doppia elica, sia di una proteina chiamata SSB (da single-strand binding protein), la quale si lega ai filamenti singoli del DNA impedendogli così di formare un duplex. La DNA polimerasi opera in corrispondenza della cosiddetta forcella di replicazione, che è la zona del DNA dove la doppia elica si svolge (*Garg and Burgers, 2005*). Poiché essa sintetizza il nuovo filamento sempre e soltanto in direzione 5' → 3', la sintesi può essere continua su un filamento stampo, il cosiddetto filamento principale (leading strand) mentre la sintesi che procede sull'altro filamento il cosiddetto filamento ritardato (filamento "lagging"), è discontinua. In questo caso la sintesi avviene per piccoli segmenti, i cosiddetti frammenti di Okazaki, brevi tratti di DNA sintetizzati lunghi 1000-2000 basi, i quali

vengono successivamente uniti, ad opera della DNA ligasi, mediante legami covalenti in un unico filamento continuo. La DNA polimerasi non è in grado di iniziare la sintesi “da zero” (ex novo) di una nuova catena. Essa può solo aggiungere un nucleotide su un gruppo preesistente 3'-OH. Per questo motivo, la DNA polimerasi, ha bisogno di un “primer” (innesco), una breve catena nucleotidica che si lega al filamento stampo per formare un segmento di DNA duplex.

I “primer” sono sintetizzati da un gruppo di proteine chiamato **primisoma**. Un componente fondamentale del **primisoma** è l'enzima primasi, un tipo di RNA polimerasi che sintetizza un breve pezzo di RNA (circa 8-12 nucleotidi) complementare ad una specifica regione del DNA da replicare. Il processo di replicazione del DNA richiede una complessità di reazioni che devono essere compiute in prossimità della forcella replicativa in modo da assicurare sia la velocità che l'accuratezza della copia. Questo è possibile in quanto la DNA polimerasi fa parte di un grande complesso nucleoproteico che coordina tutte le attività in atto alla forcella di replicazione.

Questo complesso, che è un esempio di “macchina molecolare” è chiamato **replisoma** (Johnson and O'Donnel, 2005).

La Fig. 11 mostra alcune delle componenti interagenti del **replisoma** di *E. coli*.



controllati con precisione dall'assemblaggio ordinato del **replisoma** in un sito ben definito detto origine. Nel cromosoma circolare dei procarioti la replicazione procede in entrambe le direzioni a partire da una singola origine. Negli eucarioti la replicazione procede in entrambe le direzioni partendo da centinaia o migliaia di origini sparse su ogni cromosoma lineare. Attraverso questo processo viene replicata la maggior parte del DNA cromosomico.

Le estremità dei cromosomi lineari, ossia le regioni dette Telomeri, sono un problema per il sistema di replicazione perché su un filamento rimane sempre un piccolo pezzo che non può essere replicato. L'enzima telomerasi aggiunge alcune brevi sequenze ripetute per conservare la lunghezza del cromosoma; questo enzima porta un breve RNA che funziona da stampo per la sintesi delle sequenze ripetute telomeriche (*Collins, 1996*).

Come già accennato, alcune DNA polimerasi funzionano come enzimi indipendenti, ma altre (soprattutto le replicasi) sono incorporate in grandi complessi proteici. La subunità che sintetizza DNA è soltanto una delle funzioni della replicasi, che in genere contiene molte altre attività coinvolte nello svolgimento del DNA, nell'inizio di nuovi filamenti, e così via. Il batterio *E.coli* ha cinque DNA polimerasi. La polimerasi III è la replicasi. La DNA polimerasi I è coinvolta nella riparazione del DNA danneggiato e, con un ruolo sussidiario, nella replicazione semiconservativa. La DNA polimerasi II è necessaria per riavviare la replicazione quando la forcella si



arresta su un sito in cui vi è un danno del DNA. Le DNA polimerasi IV e V partecipano a specifiche reazioni di riparazione e sono chiamate DNA polimerasi translesione perché possono sintetizzare su un filamento stampo che contiene basi danneggiate.

Le cellule eucariotiche possiedono numerose DNA polimerasi che, con un criterio molto generale, si possono suddividere in polimerasi necessarie per la replicazione semiconservativa e in polimerasi coinvolte nella sintesi riparativa del DNA danneggiato. La replicazione del DNA nucleare richiede le DNA polimerasi  $\alpha$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ , mentre la replicazione del DNA mitocondriale richiede la DNA polimerasi  $\gamma$ . Tutti gli altri enzimi sono coinvolti nella sintesi di tratti di nuovo DNA per sostituire materiale danneggiato.

Ognuna delle tre replicasi nucleari svolge una funzione diversa:

- 1) La DNA polimerasi  $\alpha$  inizia la sintesi di nuovi filamenti.
- 2) La DNA polimerasi  $\delta$  allunga il filamento principale (filamento leader).
- 3) La DNA polimerasi  $\epsilon$  può essere coinvolta nella sintesi del filamento ritardato, ma ha anche altri ruoli.

Tutte le replicasi nucleari sono grandi enzimi eterotetramerici, in cui una delle subunità è sempre responsabile della catalisi mentre le altre hanno funzioni accessorie, come la formazione del primer, la processività o la correzione delle bozze. Tutti questi enzimi replicano il DNA con fedeltà elevata, cosa che fa anche l'

enzima mitocondriale, per quanto un po' meno complesso. Le polimerasi di riparazione hanno strutture molto più semplici, che spesso consistono di una singola unità monomerică. Degli enzimi coinvolti nella riparazione, soltanto la DNA polimerasi  $\beta$  ha una fedeltà che si avvicina a quella delle replicasi; mentre le altre hanno frequenze di errore molto maggiori.

Sulla base di sequenze omologhe, le DNA polimerasi possono essere suddivise in sette differenti famiglie: A, B, C, D, X, Y, RT.

Le polimerasi della famiglia A comprendono polimerasi sia replicative che di riparo.

Le polimerasi della famiglia B comprendono per la maggior parte polimerasi replicative e includono la quasi totalità delle DNA polimerasi eucariotiche.

Le polimerasi della famiglia C sono gli enzimi replicativi del cromosoma batterico e quindi hanno attività polimerasica e attività 3'  $\rightarrow$  5' esonucleasica.

Le polimerasi della famiglia D non sono state ancora ben caratterizzate. Tutti gli esempi noti sono stati trovati tra gli Euryarchaeota sottodominio degli Archea e si ritiene siano polimerasi replicative.

Le polimerasi della famiglia X sono le ben note polimerasi eucariotiche Pol e la desossinucleotidiltrasferasi terminale (TdT).

Le polimerasi della famiglia Y sono chiamate DNA polimerasi translesione (TLS). Queste polimerasi, in funzione della lesione,

possono sintetizzare DNA senza errori o in alternativa con errori ad alto livello di mutagenesi.

Le polimerasi della famiglia RT appartengono alla famiglia della trascrittasi inversa e utilizzano come stampo l'RNA per sintetizzare un filamento di DNA. Un esempio classico di queste polimerasi sono le trascrittasi inverse dei retrovirus (*Pavlov et al., 2006*).

### **3.2 DNA POLIMERASI MITOCONDRIALE**

I mitocondri sono organelli essenziali presenti in tutte le cellule eucariotiche dove viene prodotta l'energia sottoforma di ATP attraverso il processo della fosforilazione ossidativa. Questa energia è necessaria alla cellula per tutti i suoi fenomeni vitali. La forma, le dimensioni e la distribuzione intracellulare dei mitocondri non sono stabili ma sono soggette a continui cambiamenti in rapporto allo stato funzionale della cellula. Il numero di mitocondri in una cellula varia a seconda dell'organismo, unicellulare o pluricellulare, e nell'ambito di quest'ultimo, a seconda del tipo cellulare ed anche in rapporto alla sua attività funzionale. Nei mammiferi è stato calcolato che una cellula epatica normale contiene da 1.000 a 2.000 mitocondri, mentre taluni ovociti possono contenere fino a 30.000 mitocondri.

I mitocondri contengono DNA, capace di duplicarsi e di codificare per la sintesi di alcune proteine costitutive, nonché

ribosomi e tutto l'apparato per le biosintesi proteiche. I mitocondri costituiscono, quindi, un genoma extracromosomico che conferisce loro una relativa autonomia. Nell'ambito del ciclo cellulare, questi organelli debbono essere continuamente prodotti, sia in conseguenza della divisione cellulare, sia per sostituire quelli che degenerano ("turnover" mitocondriale).

I mitocondri presentano molte caratteristiche simili a quelle dei batteri, tra queste è il loro modo di duplicarsi. Infatti, come i batteri, i mitocondri, nella fase di duplicazione, prima si accrescono e quando hanno raggiunto una dimensione limite si dividono per fissione in due mitocondri figli. Questa divisione, tuttavia, segue necessariamente la replicazione del DNA mitocondriale che avviene secondo la classica replicazione semiconservativa del DNA nucleare. L'enzima coinvolto nella replicazione del mtDNA è la DNA polimerasi  $\gamma$  (Poly) la quale fu identificata, per la prima volta, all'inizio degli anni '70 nelle cellule umane HeLa (Kaguni, 2004, Gziewicz et al., 2006). Successivamente, la Poly è stata caratterizzata in molte specie sia dal punto di vista biochimico che genetico. Essa contiene una subunità catalitica dotata di un'attività polimerasica nella direzione 5' → 3' della molecola di DNA ed un'attività esonucleasica nella direzione 3' → 5' in grado di correggere gli errori di replicazione (proofreading). Sebbene la Poly presenti una omologia del 23% con la sequenza degli aminoacidi del frammento klenow della DNA PolI di *E. coli*, altre sequenze conservate nella regione del gene che codifica le sue subunità

catalitiche rinforzano la designazione di una sottoclasse di Poly entro la famiglia del gruppo A delle DNA polimerasi eucariotiche (*Pavlov et al., 2006*).

Il modello di replicazione prevede la replicazione unidirezionale e asimmetrica del mtDNA riguardante il filamento principale (filamento “leading”) e il filamento ritardato (filamento “lagging”) della molecola di mtDNA duplex (*Lecrenier and Foury, 2000*). Come per il replisoma nucleare, anche la replicazione del mtDNA è richiesto l'intervento di una serie di proteine accessorie associate alla replicasi e di altre proteine richieste alla forza di replicazione come la primasi, la proteina SSB che si lega ai filamenti singoli del DNA, la elicasi, la topoisomerasi e la ligasi.

La maggior parte delle conoscenze sui meccanismi della replicazione del mtDNA e sugli enzimi polimerasici in essi coinvolti derivano dagli studi sulle cellule di mammiferi.

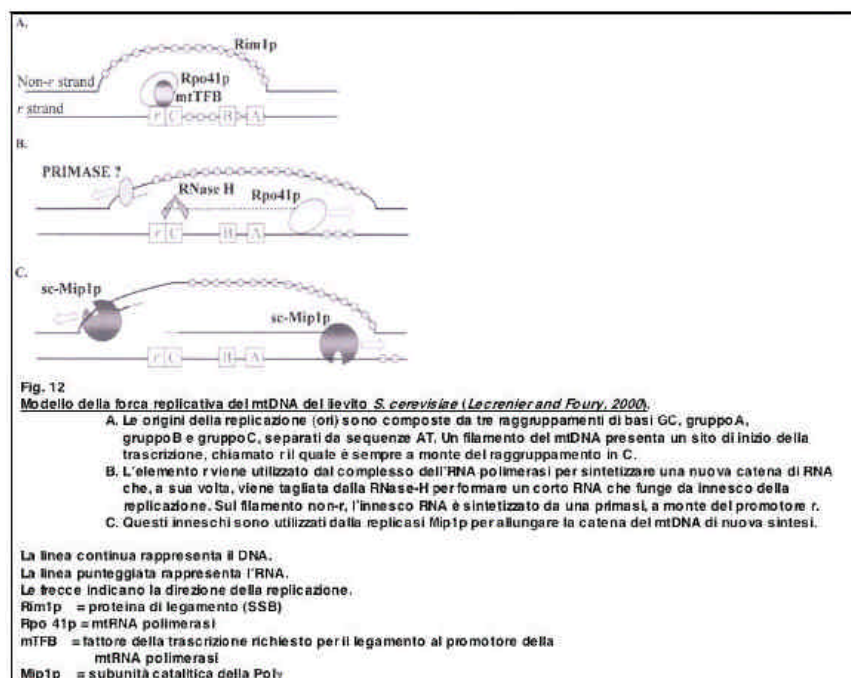
Nel lievito *S. cerevisiae* i meccanismi della replicazione del mtDNA sono meno noti rispetto a quelli dei mammiferi, probabilmente perché il lievito potrebbe avere sviluppato un percorso di replicazione alternativo. Nei mammiferi è stata individuata una sola origine di replicazione sia sul filamento di DNA leggero ( $O_L$ ) che sul filamento di DNA pesante ( $O_H$ ). Questa origine di replicazione si ritrova nella regione che circonda i due promotori della trascrizione: LSP (promotore del filamento leggero) e HSP (promotore del filamento pesante). In particolare, nell'uomo è stato dimostrato che la replicazione su

entrambi i filamenti è unidirezionale e continua, mentre la partenza della replicazione è leggermente distanziata nel tempo e nello spazio in quanto le origini della replicazione  $O_L$  ed  $O_H$  sono distanziate tra loro sui due filamenti complementari.

La struttura di inizio della replicazione del mtDNA nell'uomo è costituita dal cosiddetto D-loop (displacement-loop) dove partendo dal promotore LSP viene sintetizzata una corta molecola di RNA sul filamento leggero come stampo. Questa molecola di RNA viene prima tagliata da una RNase-H e poi utilizzata come innesco per l'inizio della replicazione da parte della replicasi Poly per allungare il filamento di DNA pesante a partire da  $O_H$ . Durante la fase di nuova sintesi del filamento pesante, parte della sequenza di questo filamento funge da stampo per la sintesi di un innesco mediante una primasi per iniziare la replicazione del filamento leggero a partire da  $O_L$ . La direzione della replicazione, come quella della trascrizione è opposta tra i due filamenti del mtDNA.

Nel lievito *S. cerevisiae* sono state individuate sette origini di replicazione del mtDNA nei ceppi  $\rho^+$  dove è presente l'intera molecola del mtDNA. Tuttavia, poiché questo eucariota semplice può vivere senza la presenza dell'intero genoma mitocondriale esso può presentare delezioni del mtDNA tali da essere presenti soltanto 35 coppie di basi che reiterandosi vanno a costituire la lunghezza originale del genoma mitocondriale presente nei ceppi  $\rho^+$ . Da ciò è stato dedotto che oltre alle sette origini canoniche della replicazione del mtDNA, qualsiasi

sequenza del mtDNA di *S. cerevisiae* è una origine potenziale di replicazione (Dujon, 1981). Nei mitocondri di *S. cerevisiae* le strutture replicative a D-loops sono state raramente trovate. Pertanto, un modello di replicazione proposto per il mtDNA è ancora ipotetico ed è limitato alle fasi iniziali della replicazione (Fig.12).



La maggior differenza tra la replicazione del mtDNA umano e quella del mtDNA di *S. cerevisiae* sta nel fatto che le origini della replicazione del mtDNA nel lievito è bidirezionale e ogni origine è formata da tre raggruppamenti di basi GC, gruppo A, gruppo B e gruppo C separati da sequenze di basi AT.

## **CAPITOLO IV**



#### 4. SCOPO DEL LAVORO

I mitocondri sono organelli essenziali per la cellula vivente la cui funzione primaria è la sintesi dell'ATP attraverso il processo della fosforilazione ossidativa.

I mitocondri sono anche il luogo dove avvengono molte importanti reazioni metaboliche e biosintetiche, come il ciclo dell'acido tricarbossilico, la biosintesi degli aminoacidi e dell'eme. La biogenesi dei mitocondri richiede la formazione di prodotti da entrambi i genomi quello nucleare e quello mitocondriale.

Il genoma mitocondriale contribuisce con un sistema genetico molto piccolo dedicato all'espressione di circa una dozzina di polipeptidi, la maggior parte dei quali sono componenti del complesso della fosforilazione ossidativa.

L'interazione tra il nucleo e i mitocondri è un meccanismo molto complesso e coinvolge un ampio numero di geni nucleari i cui prodotti sono richiesti per l'assemblaggio di mitocondri funzionali e per l'espressione di un numero relativamente piccolo di geni mitocondriali (*Costanzo and Fox, 1990*). Nel lievito, ad esempio, sono stati identificati geni nucleari i cui prodotti funzionano a vari livelli dell'espressione di geni mitocondriali e al mantenimento del genoma mitocondriale inclusa la trasmissione dei mitocondri (*Steward and Yaffe, 1991*), la replicazione e la trasmissione del DNA mitocondriale (*Jones and Fangman, 1992*), la traduzione (*Costanzo and Fox, 1988; Poutre*

*and Fox, 1987*) e il controllo gene-specifico dei processi post-trascrizionali mitocondriali (*Gampel and Tzagoloff, 1987; Stapien et al., 1992*).

Mentre il controllo dei geni nucleari sulle attività mitocondriali è stato dimostrato fin dall'inizio dello studio della biogenesi mitocondriale, soltanto nell'ultimo decennio è stata evidente l'influenza del sistema genetico mitocondriale sull'espressione di geni nucleari (*Butow and Avadhani, 2004*).

Il lievito *S. cerevisiae* è in grado di vivere in assenza del mtDNA a condizione che nel terreno di crescita sia presente una fonte di carbonio fermentabile come il glucosio.

Questa capacità del lievito fornisce un utile sistema sperimentale per analizzare la risposta della cellula ai cambiamenti dello stato funzionale dei mitocondri.

Le cellule di lievito rispondono alle disfunzioni mitocondriali modificando l'espressione di un insieme di geni nucleari (*Parikh et al., 1989*). Questa risposta è stata chiamata regolazione retrograda, e serve per meglio adattare la cellula alle disfunzioni mitocondriali. Nelle cellule derepresse, cellule respiratorio - deficienti come quelle che hanno perso il mtDNA (mutanti  $\rho^0$ ), l'espressione di geni coinvolti in un sentiero anaplerotico, il trasporto di piccole molecole, l'attività perossisomale e la risposta allo stress, sono regolate a monte (*Liu and Butow, 1999; Hallstrom and Moye-Rowley, 2000; Traven et al., 2000; Epstein et al., 2001*). In molti casi, questi cambiamenti nell'espressione dei geni riflettono attività che dovrebbero compensare il blocco del ciclo

degli acidi tricarbossilici (TCA) causato da disfunzioni respiratorie.

L'espressione di un certo numero di geni coinvolti nella risposta retrograda, come i geni CIT2, DLD3, e PDH1 che codificano rispettivamente: l'isoforma della citrato sintetasi nel ciclo del glicossilato, una D-lattato deidrogenasi del citosol, e una proteina coinvolta nel metabolismo del propionato, è controllata dai geni RTG1, RTG2, e RTG3.

Le proteine Rtg1p e Rtg3p prodotte dai geni RTG1 e RTG3 sono fattori di trascrizione elica-ansa-elica, (*Jia et al., 1997*) mentre Rtg2p è una proteina citoplasmatica con un dominio che lega ATP nella regione N-terminale simile a quello della superfamiglia di actina/zuccheri chinasi/hsp 70 (*Bork et al., 1992*).

La proteina Rtg2p gioca un ruolo fondamentale nel sentiero retrogrado perchè è sia un sensore dello stato funzionale dei mitocondri sia perchè è richiesta per l'attivazione dell'espressione dei geni RTG-dipendenti in quanto favorisce la traslocazione di Rtg1p e Rtg3p dal citoplasma al nucleo (*Sekito et al., 2000*). Inoltre, Rtg2p è richiesta per la parziale defosforilazione di Rtg3p associata al suo accumulo all'interno del nucleo.

In lavori precedenti, *Del Giudice e collaboratori (Del Giudice et al., 1984; Massardo et al., 2000)*, hanno dimostrato che l'alcaloide licorina (*Davey et al., 1998*), è in grado di differenziare tra le cellule rho<sup>0</sup>, totalmente prive di mtDNA, dalle cellule sia rho<sup>+</sup>

che  $\rho^-$  in cui è presente il mtDNA. Infatti, mentre le cellule selvatiche  $\rho^+$ , le cellule mutanti  $\rho^-$  neutre e  $\rho^-$  moderatamente soppressive sono sensibili alla licorina cioè sono bloccate nella crescita in sua presenza, le cellule mutanti  $\rho^0$  sono resistenti all'attività inibente di questo alcaloide (*Del Giudice et al., 1984*).

Inoltre è stata dimostrata l'efficacia di utilizzo del fenotipo resistenza alla licorina quale potenziale strumento per evidenziare la stabilità mitotica dei genomi mitocondriali delle cellule  $\rho^+$  e  $\rho^-$  in presenza o in assenza del prodotto del gene CCE1 un'endonucleasi che determina tagli cruciformi (*Scofield et al., 1998; Massardo et al., 2000*).

Nella continuità della linea di ricerca con la licorina, e dal momento che le cellule  $\rho^0$  sono al massimo della disfunzione mitocondriale, ci si è posti la domanda se il fenotipo resistenza alla licorina nel lievito *S. cerevisiae* fosse coinvolto nella regolazione retrograda.

Lo scopo del presente lavoro è di controllare la crescita dei ceppi  $\rho^0 \Delta rtg$  di *S. cerevisiae* deleti dei geni RTG e totalmente privi del mtDNA.

## **CAPITOLO V**

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 ELENCO DEI CEPPI

**Tabella 1. Ceppi utilizzati del lievito *Saccharomyces cerevisiae***

Ceppi	Genotipo nucleare	Genotipo mitocondriale	Origine
<b>Sc57 = YM654</b>	<i>a ura3-52 his3-D200 ade2-101 lys2-801 tyr1-501</i>	rho <sup>+</sup>	M. Johnston
<b>Sc57-R3</b>	<i>a ura3-52 his3-D200 ade2-101 lys2-801 tyr1-501</i>	rho <sup>0</sup>	L. Del Giudice
<b>RB4 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52</i>	rho <sup>+</sup>	R.A. Butow
<b>RB5 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52</i>	rho <sup>0</sup>	Questo lavoro
<b>RB6 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52 rtg1::URA3</i>	rho <sup>+</sup>	R.A. Butow
<b>RB7 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52 rtg1::URA3</i>	rho <sup>0</sup>	Questo lavoro
<b>RB8 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52 rtg2::LEU2</i>	rho <sup>+</sup>	R.A. Butow
<b>RB9 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52 rtg2::LEU2</i>	rho <sup>0</sup>	Questo lavoro
<b>RB10 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52 rtg3::LEU2</i>	rho <sup>+</sup>	R.A. Butow
<b>RB11 = PSY142</b>	<i>a leu2-2 leu2-112 lys2-801 ura3-52 rtg3::LEU2</i>	rho <sup>0</sup>	Questo lavoro

### 5.2 TERRENI DI COLTURA

#### a. **Brodo Massimo Glucosio (YEPD)**

Yeast extract	1 %
Bacto Peptone	0,5 %
D+ Glucosio	2 %

#### b. **Brodo Massimo Glicerolo (YEPGD)**

Yeast extract	1 %
Bacto Peptone	0,5 %
Glicerolo	3 %
D+ Glucosio	0,05%

Per la preparazione di terreno solido per entrambi i terreni viene aggiunto Agar Difco al 2,2%. Sterilizzare in pentola a pressione per 40 minuti.

**c. *Terreno minimo (SD)***

Yeast Nitrogen Base 0,67%

D+ Glucosio 2 %

Agar 2,8 %

I nutrizionali aggiunti al terreno minimo all'occorrenza sono :

Uracile 20 mg/l

Adenina solfato 20 mg/l

L-istidina-HCl 20 mg/l

L-triptofano 20 mg/l

L-tirosina 30 mg/l

L-lisina-HCl 30 mg/l

L-leucina 30 mg/l

### **5.3 SOLUZIONE DI LICORINA**

La soluzione di licorina si prepara al momento dell'uso sciogliendo x µg di licorina in 5ml di HCl 0,1 M. Successivamente si aggiunge NaOH 0,1M fino a portare la soluzione a pH 5,8.

Un pH più alto provoca la precipitazione della licorina.

La soluzione finale si sterilizza mediante filtro MILLIPORE da 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### **5.4 TAMPONI UTILIZZATI**

##### **a. NS**

20 mM Tris-HCl pH 7,6

0,25 M saccarosio

1 mM EDTA

Sterilizzare a vapore fluente per 10 minuti e dopo aggiungere le soluzioni saline sterilizzate per filtro

Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ :

1 mM  $\text{MgCl}_2$

0,1 mM  $\text{ZnSO}_4$

0,1 mM  $\text{CaCl}_2$

e aggiungere:

0,8 mM PMSF

0,05% 2-mercaptoetanolo

##### **b. S**

50 mM tampone Sörensen pH 7,5

25 mM EDTA

Sterilizzare a vapore fluente per 10 minuti e aggiungere:

1% 2-mercaptoetanolo

##### **c. TES**



200 mM Tris-HCl pH 9,5

80mM EDTA

1% Na dodecyl sulfate

Sterilizzare a vapore fluente per 10 minuti.

**d. TE**

10 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA pH 8

Sterilizzare a vapore fluente per 10 minuti.

**e. Sodio Acetato 3M pH 5,3**

Sciogliere 40,81g di sodio acetato 3·H<sub>2</sub>O in 80 ml di H<sub>2</sub>O, portare a pH 5,3 con acido acetico glaciale. Portare a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidistillata con un matraccio e sterilizzare a vapore fluente per 30 minuti.

## **5.5 MARCATURA CON PRECURSORI RADIOATTIVI**

Si fa crescere una precoltura del ceppo di lievito *S. cerevisiae* da utilizzare in 5ml di brodo YEPD a 28°C per 3 giorni.

Si centrifugano le cellule a 6000 rpm per 10 minuti, si lavano 2 volte con H<sub>2</sub>O distillata e si risospendono in 5 ml di H<sub>2</sub>O distillata sterile. Si inoculano 1ml della sospensione cellulare in 50ml di brodo minimo SD contenente galattosio al 2% e gli opportuni nutrizionali e si lascia in incubazione per 40 h a 28°C

a 140 rpm. Le cellule vengono raccolte per centrifugazione e lavate 3 volte con brodo SD contenente 1% di galattosio e gli opportuni nutrizionali. Il sedimento di cellule viene risospeso in un volume di brodo SD fino a raggiungere il titolo di  $5-8 \times 10^8$  cellule/ml. Questa sospensione cellulare viene suddivisa in 4 aliquote. Si lascia in agitazione per 20min a  $28^\circ\text{C}$ , e si aggiungono le soluzioni di inibitori (cicloesimide:  $500 \mu\text{g/ml}$  e licorina  $100 \mu\text{g/ml}$ ). La cicloesimide viene aggiunta 3 minuti prima dell'inoculo dei precursori radioattivi. Mentre la licorina viene aggiunta 15 minuti prima dell'inoculo dei precursori radioattivi. La reazione di marcatura viene bloccata aggiungendo 1% di Casamino acid (Difco) e un eccesso di nutrizionali non marcati a  $0^\circ\text{C}$ . L'incorporazione viene misurata nel materiale precipitato mediante TCA al 5% e Etanolo al 95%. La radioattività viene misurata in un Liquid Scintillation Counter (Nuclear Chicago).

La sintesi proteica viene misurata come incorporazione di una miscela di NEC 445 L- aminoacid-  $^{14}\text{C}$  (U) ( $100 \mu\text{Ci/ml}$ , attività specifica  $3425 \text{ mCi/mM}$ , ottenuta da NEN). Il periodo di marcatura è di 20 minuti.

La sintesi del DNA viene misurata come incorporazione di  $^{14}\text{C}$  Adenina ( $1,5 \mu\text{Ci/ml}$  attività specifica  $276 \text{ mCi/mM}$ , ottenuta da Amersham Bucks, England). Il tempo di marcatura è di 4h. Le aliquote vengono idrolizzate tutta la notte a  $37^\circ\text{C}$  con NaOH ( $0,5\text{M}$ ) per digerire l'RNA. I campioni vengono raffreddati e il DNA co-precipitato con BSA ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) mediante TCA. La

sintesi dell' RNA viene misurata come incorporazione di  $^3\text{H}$ -Uridina (100  $\mu\text{Ci/ml}$ , attività specifica 30 Ci/mM ottenuta da Amersham Bucks, England). Il tempo di marcatura è di 1h.

## **5.6 TRATTAMENTO CON BROMURO DI ETIDIO**

Si inocula il ceppo di *S. cerevisiae* da utilizzare in 5 ml di YEPD e si lasciano crescere le cellule per 24 ore a 28°C in agitazione a 130 rpm. Si lavano le cellule con H<sub>2</sub>O distillata sterile. Si inoculano 1 ml di cellule lavate in 9 ml di SD in cui sono stati aggiunti gli opportuni nutrizionali e si lascia in incubazione come sopra per circa 16 ore in modo da avere le cellule nella fase logaritmica della crescita. Si aggiungono alla coltura 10mg/ml di Bromuro di Etidio (EtBr) (*Massardo et al., 1994*) e incubare al buio a 28°C con lenta agitazione (90-100 rpm) per circa 12 ore. Si spatola una diluizione della coltura trattata in modo da ottenere 200-300 colonie per piastra di YEPD.

## **5.7 ISOLAMENTO DI MUTANTI PETITE INDOTTI DAL BROMURO DI ETIDIO**

Le colonie di lievito isolate su piastra di YEPD derivati dalla coltura trattata con EtBr vengono strisciate singolarmente su una piastra matrice di YEPD. La matrice di strisci si lascia in incubazione a 28°C per circa 20 ore e si replica, mediante velluto di replicazione, su una piastra di YEPGD e su una piastra di

YEPD, nell'ordine. Gli strisci di colonie che crescono sulla piastra con glucosio ma che non crescono sulla piastra con glicerolo sono i potenziali mutanti *petite* deficienti respiratori.

## **5.8 COLORAZIONE *IN VIVO* DEL DNA CON IL DAPI**

Le cellule del lievito *S. cerevisiae* vengono cresciute in una coltura di 5 ml di brodo YEPD a 28°C a 130 rpm fino alla fase logaritmica (circa 16 ore dopo l'inoculo). Inizialmente le cellule vengono fissate aggiungendo direttamente nella coltura gluteraldeide al 4% finale e lasciando in incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente si lavano le cellule due volte mediante centrifugazione in Sorvall a 6000 r.p.m per 10 minuti con tampone NS. Dopo il lavaggio, le cellule vengono stratificate su vetrino da microscopio e colorate con una soluzione 1µg/ml di DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) sciolto nel tampone NS. Si lascia asciugare il campione di cellule colorate e si procede con l'osservazione con il microscopio a fluorescenza (*Williamson and Fennel, 1979*).

## **5.9 OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA**

Il campione di cellule di lievito fissato e colorato con DAPI viene osservato con un microscopio a fluorescenza. In questo lavoro di tesi le osservazioni sono state effettuate con un

microscopio a fluorescenza modello BHS-RFK equipaggiato con gli appropriati obiettivi (Dplan Apo 100UVPL e 100UV; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Le cellule trattate con DAPI sono state osservate alla luce UV e fotografate con una pellicola Neopan 1600 (ASA 1600; Fuji, Tokyo, Japan), con un tempo di esposizione di 12.8 sec. (*Miyakawa et al., 1994*).

#### **5.10 ESTRAZIONE E SEPARAZIONE DEL DNA NUCLEARE E MITOCONDRIALE DI LIEVITO MEDIANTE GRADIENTE DI CsCl-BISBENZIMIDE**

Si prepara una precoltura del ceppo da utilizzare inoculando 1ml di coltura da collezione conservata a -20°C in glicerolo al 60%, in 30ml di brodo YEPD inoculando a 28°C in agitazione a 130 rpm.

Dopo circa 36 ore di crescita si inoculano tutti e 30ml della precoltura in 3 litri di brodo YEPD e si incuba a 28°C in agitazione a 150 rpm per circa 24 ore.

Si centrifugano le cellule in fase stazionaria a 6000 rpm per 10 minuti e si raccoglie il sedimento di cellule in due tubi da centrifuga. Si lavano le cellule due volte con H<sub>2</sub>O distillata sterile centrifugando come sopra.

Si pesano le cellule, avendo cura di pesare inizialmente il tubo da centrifuga dove sono state raccolte, e si risospendono in 50ml di tampone S (vedi tamponi utilizzati in Materiali e Metodi) per ogni tubo.

Alla sospensione cellulare si aggiunge la zimoliasi 6000 (1mg per grammo di cellule) e si lascia in incubazione a 37°C fino alla rottura delle cellule. La rottura delle cellule si controlla mediante osservazione con il microscopio a contrasto di fase e con la verifica della viscosità del mezzo con le cellule rotte.

Ad ogni tubo si aggiungono 50ml di tampone TES si lascia in incubazione a 70°C a bagno maria per 30 minuti e si raffredda subito in ghiaccio.

Si aggiungono gradualmente alla miscela 50ml di potassio acetato 5M e si incuba in ghiaccio per 45 minuti. Si centrifuga a 8000 rpm per 10 minuti e al supernatante si aggiungono 150ml di isopropanolo lasciando, poi, a -20°C per almeno 1 ora.

Si centrifuga a 8000 rpm per 15 minuti, si elimina il supernatante e si risospende il sedimento in 15ml di tampone TE lentamente con una pipetta di plastica. Si centrifuga a 20.000 rpm per 30 minuti e si elimina il sedimento. Al supernatante si aggiunge il tampone TE fino a raggiungere il volume finale di 30ml. Da una soluzione madre di Bisbenzamide 10mg/ml si aggiungono prima 24 µl per 1ml di preparazione di DNA in TE e dopo 1,16 g di CsCl per 1ml di preparazione di DNA in TE con Bisbenzamide. Dopo ben sciolto il CsCl si centrifuga con tubi Optiseal da 30ml a 50.000 rpm a 20°C sottovuoto in ultracentrifuga Beckman Optima L-90K con rotore Type 70Ti per 16 ore. In queste condizioni si formano due bande di DNA nel gradiente di equilibrio CsCl-bisbenzamide visibili con luce ultravioletta di cui la banda superiore è formata da DNA mitocondriale mentre la

banda inferiore più intensa è formata da DNA nucleare. Si prelevano le bande di DNA aspirando con siringhe da 1ml facendo attenzione a non contaminare le bande tra loro. Si allontana la Bisbenzimidide con almeno 3 estrazioni di isopropanolo equilibrato con CsCl. Successivamente si elimina il CsCl con una breve dialisi contro TE. In alternativa si diluisce la soluzione di DNA 5 volte il volume con TE. Si solubilizza il DNA con 1/10 del volume iniziale di una soluzione 3M di Na-acetato pH 5.3 tenuto a 4°C, si agita e si aggiunge il doppio del volume di alcool etilico assoluto, tenuto a -20°C. Si agita, capovolgendo la provetta chiusa con parafilm e si lascia precipitare il DNA a -20°C per almeno 2 ore.

Dopo che è precipitato il DNA, la soluzione viene centrifugata a 0°C per 10 minuti a 10.000 rpm.

Si butta via il supernatante, lasciando gocciolare quanto più è possibile, e il DNA sedimentato può essere lavato aggiungendo alcool etilico al 70% (tenuto a -20°C) fino a riempire per i 2/3 il tubo da centrifuga. Si agita leggermente e si ricentrifuga a 10.000 rpm per 10-15 minuti a 0°C. Si elimina il supernatante e si asciuga il DNA sedimentato in essiccatore sottovuoto per 10-15 minuti. Si risospende in tampone TE e si conserva a 4°C oppure a -20°C.

## 5.11 CURVA DI CRESCITA

Si prepara una precoltura di un ceppo di lievito *S. cerevisiae* in 5 ml di brodo YEPD inoculando 0.1 ml di una coltura conservata in glicerolo al 60% a -20°C. Si incuba questa precoltura in termostato a 28°C per 2-3 giorni senza agitazione. Dopo la crescita si portano in sospensione le cellule agitando e si inoculano 0.1ml di questa sospensione in 10ml di brodo YEPD. Si incuba questa coltura in termostato a bagnomaria a 28°C in agitazione a 120 rpm. Al momento dell'inoculo si fa un prelievo di 0.1ml della coltura (tempo 0 della curva di crescita) e successivamente i prelievi, sempre di 0.1ml, si effettuano ogni 2 ore.

Si seguono due procedimenti per le conta delle cellule, quello colorimetrico Klett-Summerson e quello di conferma mediante piastramento di diluizioni opportune della coltura su piastre di YEPD e conta delle colonie dopo incubazione a 28°C per 2-3 giorni.

Su un foglio di carta millimetrata si riportano sulle ordinate le unità di Klett misurate oppure il logaritmo del numero delle cellule ottenuto dalla conta delle colonie cresciute su piastra, mentre sulle ascisse si riportano i tempi corrispondenti del prelievo.



## 5.12 ANALISI PER GOCCIA DI COLONIE DI LIEVITO

Da una precoltura del ceppo di *S. cerevisiae* in 5 ml di brodo YEPD cresciuta a 28°C statica per 2-3 giorni si prelevano 0.1 ml e si inoculano in 5ml di brodo YEPD. Si lascia crescere questa coltura a 28°C in agitazione a 130 rpm per 24 h. Da questa coltura si fa un piastramento di cellule singole su piastra di YEPD, in modo da ottenere 100-200 colonie per piastra.

Per l'analisi della resistenza alla licorina, del fenotipo competenza respiratoria o deficienza respiratoria, ogni singola colonia si risospende in 200ml di H<sub>2</sub>O distillata sterile. Successivamente si gocciolano 2ml di questa sospensione cellulare rispettivamente su una piastra di YEPGD, su una piastra di YEPD e infine su una piastra di YEPD contenente 500 µg/ml di licorina. Dopo 5 giorni di incubazione a 28°C si confronta la crescita delle cellule inoculate per goccia sulle piastre.

## **CAPITOLO VI**

## RISULTATI

### **6.1 COSTRUZIONE DI CEPPI DI *S. cerevisiae* CON ALLELI “NULLI” DEI GENI RTG**

I ceppi utilizzati di *S. cerevisiae* con alleli  $\Delta$ rtg (ceppo  $\Delta$ rtg1 ceppo  $\Delta$ rtg2 ceppo  $\Delta$ rtg3) sono stati costruiti e selezionati con la tecnica della sostituzione genica nel laboratorio del Prof. Ron Butow negli Stati Uniti (*Chelstowska et al., 1999*). Questi ceppi sono stati ottenuti mediante trasformazione genica del ceppo selvatico PSY142 (MATa, leu2, lys2, ura3 RTG rho<sup>+</sup>) con costrutti plasmidici che hanno permesso di sostituire:

- 1) la sequenza HindIII-Sst1 di 674bp del gene RTG1 con la sequenza XhoI-HindIII di 1200bp del gene URA3 per costruire l'allele  $\Delta$ rtg1.
- 2) la sequenza SalI-XbaI di 570bp del gene RTG2 con la sequenza di 2200bp del gene LEU2 per costruire l'allele  $\Delta$ rtg2.
- 3) le sequenze codoniche 175-340 del gene RTG3 con la sequenza di 1600bp del gene LEU2 per costruire l'allele  $\Delta$ rtg3.

### **6.2 EFFETTI DELLA LICORINA SULLE SINTESI MACROMOLECOLARI**

Il requisito principale nello studio delle funzioni cellulari mediante l'uso di inibitori è il passaggio di questi dal mezzo di crescita all'interno della cellula stessa. Non tutti i ceppi di *S.*

*cerevisiae* selezionati in laboratorio permettono il passaggio di un inibitore, in generale, all'interno della cellula dovuto a fattori strutturali della loro membrana esterna che funge da barriera per questi inibitori.

Per verificare l'efficacia dell'azione inibente della licorina sul ceppo parentale RB4 di *S. cerevisiae* sono stati eseguiti esperimenti di incorporazione in vivo con precursori radioattivi specifici, rispettivamente, per la sintesi proteica, per la sintesi del DNA e per la sintesi dell'RNA in presenza ed in assenza nel mezzo di crescita di questo alcaloide. Per controllo è stata utilizzata la cicloesimide, un inibitore della sintesi proteica citoplasmatica negli eucarioti.

I dati riportati nella Tabella 2 dimostrano che la licorina ha solo un debole effetto inibente sulla sintesi proteica totale, mentre la cicloesimide inibisce per il 96% la sintesi proteica totale. Infatti, il rimanente 4%, che rappresenta la sintesi proteica mitocondriale, non è inibito in maniera significativa dall'aggiunta di licorina.

	<b>Sintesi proteica (<sup>14</sup>C-amino-acid mixture)</b>	<b>Sintesi del DNA (<sup>14</sup>C-adenine)</b>	<b>Sintesi dell'RNA (<sup>3</sup>H-uridine)</b>
<b>Controllo</b>	3640 100%	5394 100%	2082 100%
<b>+ Licorina</b>	3108 85,4%	1942 36%	791 38%
<b>+ Cicloesimide</b>	153 4,2%	2773 51,4%	878 42,2%
<b>+ Licorina + Cicloesimide</b>	102 2,8%	785 14,5%	281 13,5%

**Tabella 2**

Effetti della Licorina (100µg/ml) e della cicloesimide (500µg/ml) sulla sintesi proteica, sulla sintesi del DNA e sulla sintesi dell'RNA nel ceppo RB4 rho<sup>+</sup>.

I valori di incorporazione dei precursori radioattivi sono dati in numero di conte al minuto moltiplicato per 10<sup>-2</sup> e in percentuale rispetto al ceppo di controllo senza aggiunta degli inibitori.

Questi risultati confermano le precedenti scoperte che le cellule di *S. cerevisiae* deficienti respiratorie di ceppi mit<sup>-</sup> (con mutazioni puntiformi del mtDNA) capaci di sintetizzare le proteine mitocondriali e di ceppi rho<sup>-</sup> (con mutazioni per delezione del mtDNA) incapaci di sintetizzare le proteine mitocondriali sono inibite in uguale misura. Da ciò si evince che né la respirazione né il processo di sintesi proteica sono responsabili dell'effetto differenziale della licorina tra le cellule rho<sup>0</sup> (totalmente prive del mtDNA) resistenti ad essa e le cellule rho<sup>+</sup>, mit<sup>-</sup> e rho<sup>-</sup> (in cui è presente il mtDNA) sensibili ad essa (*Del Giudice et al., 1984*).

Al contrario di quanto accade per la sintesi proteica, la licorina presenta un effetto inibitorio sulla sintesi del DNA e su quella dell'RNA come descritto nella Tabella 2. È noto che la cicloesimide ha un effetto inibitorio su entrambe queste due ultime vie sintetiche macromolecolari.

Infatti, *Grossman e collaboratori (1969)* misero in evidenza che con l'aggiunta di cicloesimide la sintesi del DNA nucleare viene immediatamente bloccata, mentre la sintesi del DNA mitocondriale è anche inibita quasi completamente ma con qualche ritardo rispetto all'inibizione della sintesi del DNA totale (*Udem and Warner, 1972; Mayo et al., 1968*).

Come risulta dalla Tabella 2, i livelli di incorporazione dei precursori radioattivi dopo l'aggiunta della cicloesimide sono del 51% per il DNA e del 41% per l'RNA, rispettivamente, in rapporto ai livelli di incorporazione del controllo senza aggiunta dell'inibitore.

L'aggiunta contemporanea della cicloesimide e della licorina abbassa il livello di incorporazione dei precursori radioattivi del 14% per il DNA e del 13% per l' RNA, rispettivamente.

Da questi dati si può concludere, pertanto, che l'effetto inibente della licorina influenza, almeno in parte, la sintesi del DNA e la sintesi del RNA mitocondriale.

### **6.3 EFFETTO DEI GENI RTG**

Nel lievito *S. cerevisiae*, l'mtDNA non è essenziale per la crescita finché le cellule sono cresciute in presenza di una fonte di carbonio fermentabile come il glucosio. Questa caratteristica fornisce un conveniente sistema sperimentale per analizzare come le cellule rispondono ai cambiamenti dello stato funzionale dei mitocondri. Una simile risposta è la regolazione retrograda, un sentiero di comunicazione tra organelli dove l'espressione di alcuni geni nucleari è alterata in cellule con disfunzioni mitocondriali (*Parikh et al., 1987*). L'espressione di questi geni nucleari nel sentiero retrogrado è direttamente dipendente da tre geni regolatori RTG1, RTG2, RTG3 (*Butow and Avadhani, 2004*). *Del Giudice e collaboratori (1997)* hanno dimostrato che le cellule rho<sup>0</sup> sono resistenti alla licorina fino alla concentrazione di 600 µg/ml mentre le cellule rho<sup>+</sup> e rho<sup>-</sup> sono in grado di crescere fino a un massimo di concentrazione di 100 µg/ml di licorina.

Dal momento che la cellula di lievito  $\rho^0$  è al massimo della disfunzione mitocondriale e per verificare il coinvolgimento del fenotipo licorina-resistenza nel sentiero retrogrado sono stati indotti e isolati mutanti  $\rho^0$  dal ceppo selvatico RB4 e dai ceppi  $\Delta rtg$  da esso derivati, rispettivamente.

### **6.3.1 ISOLAMENTO E CONTROLLO DI MUTANTI $\rho^0$**

I mutanti  $\rho^-$ , respiratori deficienti, vengono prodotti ad alta frequenza, 1%-2%, in colture del lievito *S. cerevisiae* in fase logaritmica della crescita (Dujon, 1981).

Questa frequenza può essere di molto elevata trattando la coltura cellulare con agenti mutageni intercalanti come l'acriflavina e il Bromuro di Etidio, che inducono con molta efficacia delezioni del mtDNA.

Il Bromuro di Etidio è il mutageno più comunemente utilizzato per indurre mutazioni  $\rho^-$  e  $\rho^0$ . In particolare per la formazione di mutanti  $\rho^0$ , totalmente privi del mtDNA, è necessario un trattamento più prolungato in presenza del mutageno della coltura sia in fase logaritmica che in fase stazionaria della crescita. Per la formazione dei mutanti  $\rho^0$  è stato ipotizzato un meccanismo di intercalazione del mutageno nella catena di DNA circolare mediante legami covalenti e la successiva degradazione del DNA per azione di DNasi stimulate dallo stesso mutageno (Dujon, 1981).

Sono stati indotti e isolati mutanti  $\rho^0$  rispettivamente da colture dei ceppi RB4  $\rho^+$  RTG selvatico parentale, RB6  $\rho^+$   $\Delta\rho$ 1, RB8  $\rho^+$   $\Delta\rho$ 2, RB10  $\rho^+$   $\Delta\rho$ 3 dopo prolungato trattamento con EtBr a 28°C.

Dal successivo piastramento su piastre di YEPD di ognuna di queste colture sono state analizzate colonie singole e selezionate per il fenotipo deficienza respiratoria in base alla mancata capacità di crescere su terreno contenente glicerolo, una fonte di carbonio non fermentabile.

Successivamente, le colonie deficienti respiratorie selezionate e purificate sono state analizzate per il contenuto di mtDNA nelle cellule mediante colorazione con il DAPI e osservazione al microscopio a fluorescenza per individuare i mutanti  $\rho^0$  mancanti del mtDNA.

La colorazione con il DAPI evidenzia, oltre al DNA nucleare, i condrioliti che sono piccoli corpi distinti indicativi del mtDNA.

La Fig. 13 mostra l'architettura delle cellule di *S. cerevisiae*  $\rho^+$ ,  $\rho^-$  e  $\rho^0$ , rispettivamente. Il tipo 1 sono cellule  $\rho^+$  in cui è ben distinto, oltre al DNA nucleare, il mtDNA a struttura filiforme. Il tipo 2 mostra cellule  $\rho^-$  con evidenti solo i corpi colorati di mtDNA in quanto in questa microfotografia, il DNA nucleare è fuori fuoco. Il tipo 3 sono cellule  $\rho^0$  totalmente prive del mtDNA.



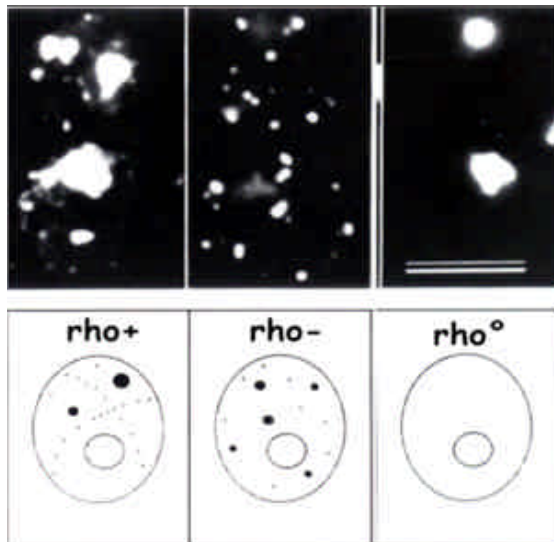


Fig.13

Microfotografia di cellule di lievito colorate con DAPI e rappresentazione schematica di 3 tipi di strutture di nucleoidi mitocondriali.

**Tipo 1 - cellula rho<sup>+</sup>:** il DNA mitocondriale appare sia come piccoli granuli disposti in fila, sia con una predominanza di masse mitocondriali.

**Tipo 2 - cellula rho<sup>-</sup>:** non si osservano granuli disposti in fila ma solo masse mitocondriali di piccola o media grandezza. Da notare che in questa microfoto i nuclei sono fuori fuoco e quindi non è visibile il DNA nucleare.

**Tipo 3 - cellula rho<sup>0</sup>:** non si osservano masse mitocondriali. Il DNA mitocondriale è totalmente assente.

Per un'ulteriore verifica dell'assenza del mtDNA nelle cellule dei ceppi rho<sup>0</sup> controllati per la mancata crescita su terreno contenente glicerolo e per la mancata colorazione di corpi citoplasmatici con DAPI, sono stati preparati lisati di cellule dei ceppi in esame e successiva separazione del DNA nucleare dal mtDNA mediante gradiente di CsCl-Bisbenzimidide in ultracentrifuga. La Bisbenzimidide si intercala nella catena del mtDNA circolare e la rende più leggera in maniera da far raccogliere il mtDNA in una zona meno densa del gradiente di equilibrio che si va a formare con la sospensione di CsCl-

Bisbenzimide-DNA. La Fig. 14 mostra le bande di mtDNA (banda 1) in alto, e di DNA nucleare (banda 2) in basso di un lisato di cellule di lievito dopo ultracentrifugazione in gradiente CsCl-bisbenzimide visualizzate con lampada UV. I gradienti di CsCl-bisbenzimide dei lisati dei ceppi  $\rho^0$  RB5 RTG, RB7  $\Delta$ rtg1, RB9  $\Delta$ rtg2 e RB11  $\Delta$ rtg3 presentano solo la banda di DNA nucleare, confermando così l'assenza totale del mtDNA nei ceppi  $\rho^0$  isolati.

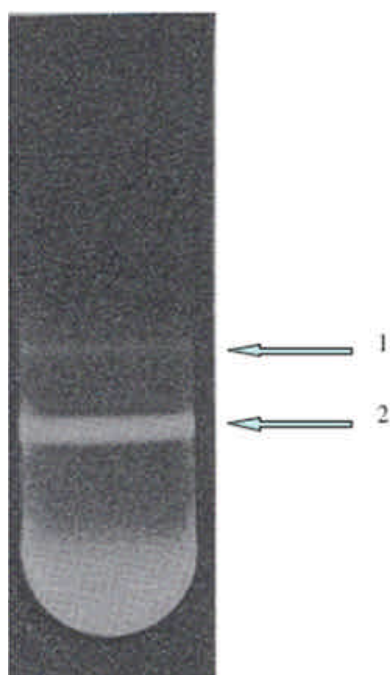


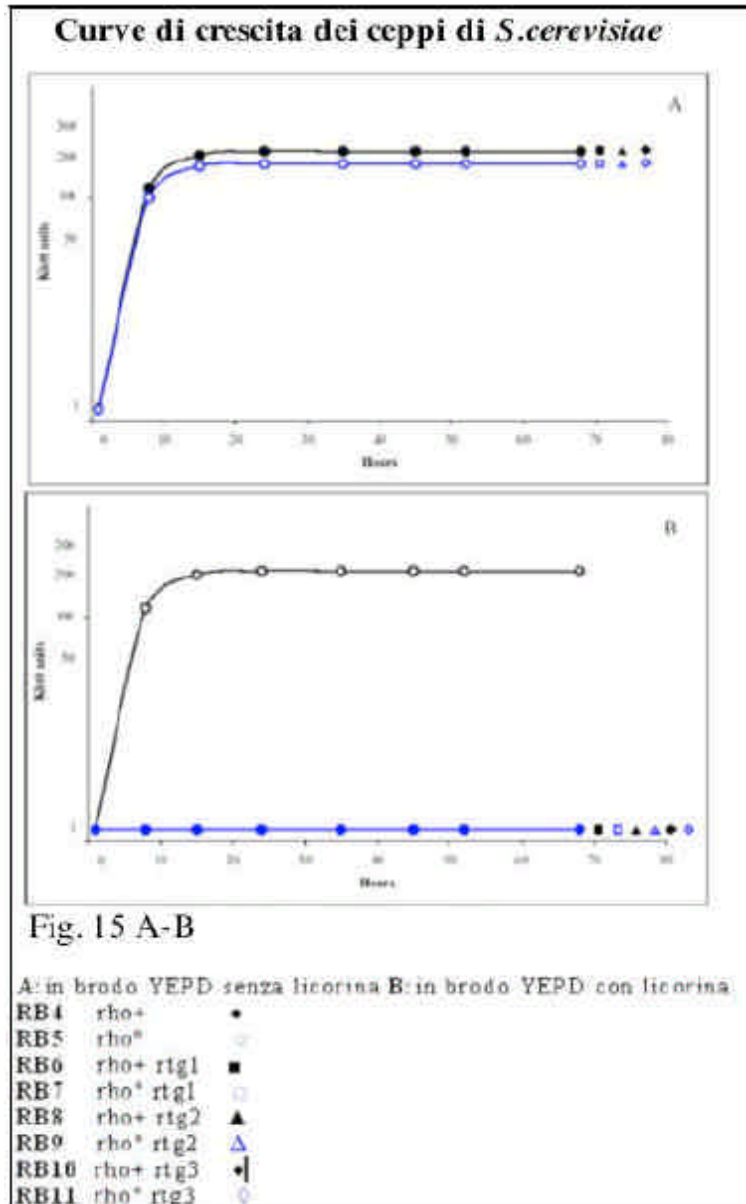
Fig.14  
Bande di DNA di un lisato di cellule di lievito dopo ultracentrifugazione in gradiente di CsCl-Bisbenzimide e visualizzate con lampada UV.

Banda 1:DNA mitocondriale  
Banda 2:DNA nucleare

### **6.3.2 INFLUENZA DELLA LICORINA SULLA CRESCITA**

È stata monitorata la crescita di tre serie di ceppi isogenici contenenti i rispettivi alleli nulli  $\Delta rtg$ , due ceppi  $\Delta rtg1$   $\rho^+$  e  $\rho^0$ , due ceppi  $\Delta rtg2$   $\rho^+$  e  $\rho^0$  e due ceppi  $\Delta rtg3$   $\rho^+$  e  $\rho^0$ . Per controllo è stata monitorata la crescita anche di ceppi isogenici parentali contenenti gli alleli selvatici RTG, due ceppi RTG  $\rho^+$  e  $\rho^0$ . Allo scopo di analizzare l'effetto della licorina in rapporto al genotipo RTG e al genotipo  $\Delta rtg$ , questi ceppi sono stati cresciuti e monitorati in terreno massimo contenente glucosio sia in assenza che in presenza di licorina alla concentrazione di 500 $\mu$ g/ml. Come mostrato nella Fig. 15A, in assenza di licorina la cinetica di crescita è simile per i ceppi  $\rho^+$  e  $\rho^0$  utilizzati indipendentemente dalla presenza o assenza dei geni RTG.

Al contrario come mostrato nella Fig. 15B in presenza di licorina solo il ceppo parentale RB5  $\rho^0$  che contiene i geni RTG selvatici risulta essere resistente, mentre il ceppo parentale RB4  $\rho^+$  e tutti i ceppi contenenti gli alleli nulli  $\Delta rtg$  sono completamente inibiti nella crescita, indipendentemente se sono  $\rho^+$  o  $\rho^0$ .



### 6.3.3 TEST PER GOCCIA DI RESISTENZA ALLA LICORINA

Per analizzare ulteriormente l'effetto della licorina in rapporto ai genotipi RTG e  $\Delta$ rtg dei ceppi di *S. cerevisiae* utilizzati e indicati nell'elenco dei ceppi (Materiali e Metodi) è stato messo in opera

un test di analisi per goccia in modo da verificare la crescita comparata di cellule provenienti da una colonia singola su tre piastre indipendenti con terreno massimo contenenti:

- a piastra con glucosio per la crescita sia di cellule  $\text{rho}^+$  che  $\text{rho}^0$ .
- b piastra con glicerolo per selezionare le cellule  $\text{rho}^+$  capaci di crescere dalle cellule  $\text{rho}^0$  non in grado di crescere.
- c piastra con glucosio con aggiunta di licorina per selezionare le cellule  $\text{rho}^0$  resistenti.

Da ciascuno dei ceppi indicati nell'elenco, sono state analizzate 500 colonie singole risospendendo ognuna in 200 $\mu\text{l}$  di acqua sterile. Da ogni singola sospensione cellulare sono stati prelevati 2 $\mu\text{l}$  per volta e pipettati per goccia sui tre rispettivi terreni nelle suddette piastre a, b e c. Dopo 5 giorni di incubazione a 28°C è stata osservata la crescita.

I risultati riportati in Tabella 3 dimostrano che soltanto la progenie di cellule  $\text{rho}^0$  contenenti gli alleli RTG selvatici esprimono la resistenza (sono in grado di crescere) alle alte concentrazioni di licorina.

<b>Ceppo</b>	<b>Genotipo mitocondriale</b>	<b>RC (%)</b>	<b>RD (%)</b>	<b>R/S a 500 mg/ml di Licorina</b>
<b>Sc57 RTG</b>	rho <sup>+</sup>	98	2	S
<b>Sc57-R3 RTG</b>	rho <sup>0</sup>	0	100	R
<b>RB4 RTG</b>	rho <sup>+</sup>	97	3	S
<b>RB5 RTG</b>	rho <sup>0</sup>	0	100	R
<b>RB6 Drtg1</b>	rho <sup>+</sup>	96	4	S
<b>RB7 Drtg1</b>	rho <sup>0</sup>	0	100	S
<b>RB8 Drtg2</b>	rho <sup>+</sup>	97	3	S
<b>RB9 Drtg2</b>	rho <sup>0</sup>	0	100	S
<b>RB10 Drtg3</b>	rho <sup>+</sup>	98	2	S
<b>RB11 Drtg3</b>	rho <sup>0</sup>	0	100	S

**Note:** RC = respiratorio competente; RD = respiratorio deficiente; R = resistente; S = sensibile

### **Tabella 3**

Test per goccia per la: competenza respiratoria (RC), deficienza respiratoria (RD), resistenza (R) e sensibilità (S) alla Licorina di colonie di ceppi rho<sup>+</sup> e rho<sup>0</sup> di *S. cerevisiae*.

## **CAPITOLO VII**

## 7.1 DISCUSSIONE

Nelle cellule di lievito con disfunzione mitocondriale come la deficienza respiratoria dovuta alla perdita di DNA mitocondriale, i maggiori riarrangiamenti del metabolismo di Carboidrati e Azoto trovano spazio attraverso sentieri di segnali intracellulari che vanno dal mitocondrio al nucleo, questa risposta è chiamata **regolazione retrograda**.

Questa risposta coinvolge cambiamenti nell'espressione di un gruppo di geni nucleari, la cui conseguenza è l'adattamento della cellula alle disfunzioni mitocondriali.

Il fenomeno base del segnale retrogrado fu inizialmente definito in lievito (*Parik et al., 1987*) e molti dei dettagli molecolari del sentiero sono stati successivamente elaborati. Un ruolo centrale del segnale retrogrado lo hanno tre proteine di regolazione: Rtg1p, Rtg2p e Rtg3p.

Questi fattori sono richiesti per l'espressione di alcuni geni della risposta retrograda, come CIT2 e DLD3, la cui espressione aumenta di 10 volte o più in cellule con disfunzione mitocondriale (*Jia et al., 1997; Liao and Butow, 1993; Chelstowska et al., 1999*).

La licorina e altri alcaloidi della famiglia delle *Amaryllidaceae* sono conosciuti come inibitori della sintesi proteica dei ribosomi eucarioti (*Vazquez, 1974*).

In lavori precedenti è stato dimostrato che la licorina inibisce la crescita dei ceppi rho<sup>+</sup>, rho<sup>-</sup> e mit<sup>-</sup> mentre i ceppi rho<sup>0</sup> (privi del



mtDNA) di *S. cerevisiae* sono resistenti ad alte concentrazioni dell'alcaloide (Del Giudice et al., 1984; Massardo et al., 2000).

Al fine di individuare nuovi geni la cui espressione è dipendente da RTG nel percorso di segnali dai mitocondri al nucleo è stata analizzata la crescita di ceppi  $\rho^0 \Delta rtg$  in presenza di differenti dosi di licorina.

In questo lavoro è stato dimostrato che tutti i ceppi  $\rho^0$  hanno mostrato la stessa velocità di crescita in mezzo completo di glucosio in assenza dell'alcaloide, indipendentemente se essi fossero ceppi wild-type o mutanti  $\Delta rtg$  nucleari (Fig. 15A).

Usando 500 $\mu$ g/ml di licorina in mezzo completo con glucosio (Fig. 15B) la crescita dei ceppi isogenici  $\rho^+$  RTG e  $\rho^{0?} rtg$  è stata inibita completamente, mentre la crescita dei ceppi  $\rho^0$  isogenici con genotipo nucleare RTG è risultata resistente all'inibitore. Inoltre, il test di resistenza alla licorina (Tabella 3) su cellule respiratorio competenti e cellule respiratorio deficienti, conferma i risultati ottenuti dalle curve di crescita in mezzo liquido, che gli isogenici ceppi  $\rho^0$  con delezione dei geni RTG sono sensibili alla licorina. Questi risultati hanno dimostrato che il fenotipo resistenza alla licorina è coinvolto nel sentiero retrogrado.

Gli esperimenti di marcatura con precursori radioattivi hanno confermato che la sintesi proteica nel citoplasmatica e quella mitocondriale è solo moderatamente inibita nelle cellule  $\rho^+$  di *S. cerevisiae*.

Tuttavia vi è evidenza che l'effetto della licorina potrebbe essere dovuto ad alcuni effetti indiretti dell'alcaloide sulla replicazione e sulla trascrizione del mtDNA.

I dati sulla licorina riportati nel presente lavoro mettono in evidenza la presenza di un percorso di segnali dai mitocondri al nucleo, questo fenomeno è stato chiamato "regolazione retrograda" da Butow e collaboratori (*Chelstowska et al., 1999; Sekito et al., 2000; Epstein et al., 2001; Butow, 2002*). Un'ulteriore evidenza sulla presenza di un percorso di segnali dai mitocondri al nucleo, è data dal fatto che sono stati in precedenza isolati mutanti nucleari resistenti alla licorina (*Del Giudice et al., 1986*) indicando così che il fenotipo di resistenza deriva da uno o più geni nucleari.

La conferma che uno o più geni nucleari sono coinvolti nella replicazione di entrambi i DNA sia nucleare che mitocondriale deriva dal fatto che la crescita delle cellule  $\rho^+$  è inibita dalla presenza di licorina sia nel mezzo con glucosio che in quello con glicerolo (*Del Giudice et al., 1986*).

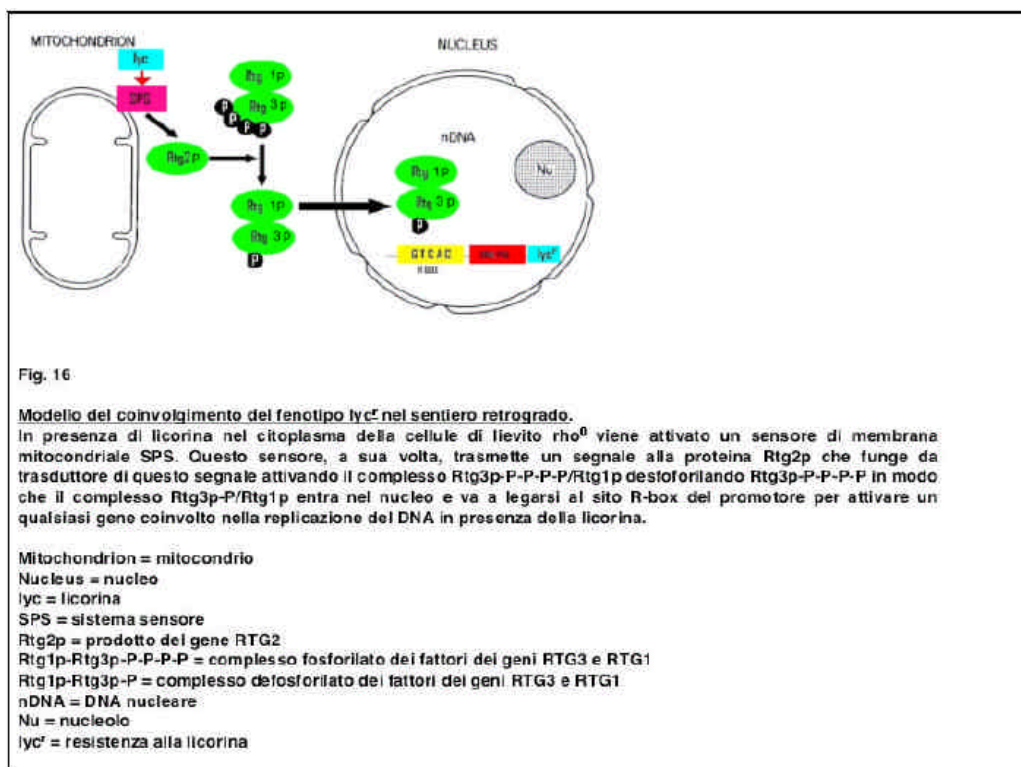
I processi di replicazione e di trascrizione del mtDNA dipendono esclusivamente dagli RNA e dalle proteine codificati da geni nucleari. Per mantenere stabile il numero di copie di mtDNA deve esistere una forma di controllo tale da stimolare la cooperazione tra il nucleo e i mitocondri. Inoltre, vi sono evidenze che le cellule di *S. cerevisiae*  $\rho^0$ , totalmente prive del mtDNA, continuano ad esprimere il gene DNA Poly che

codifica per l'mtDNA polimerasi  $\gamma$  responsabile della replicazione del mtDNA.

È stato ipotizzato che la mtDNA polimerasi  $\gamma$  potrebbe avere un ruolo alternativo nella cellula oltre a quello principale di replicare il mtDNA dal momento che nelle cellule rho<sup>0</sup> essa continua a essere prodotta anche in assenza del mtDNA (*Davis et al., 1996*).

## **7.2 CONCLUSIONI**

Dai dati riportati nel presente lavoro potrebbe essere ipotizzato che nelle cellule rho<sup>0</sup> lo stato di disfunzione mitocondriale stimola l'overespressione di geni nucleari presumibilmente coinvolti in entrambe le repliche di DNA nucleare e mitocondriale. Tale ipotesi scaturisce dal fatto che la presenza o l'assenza del mtDNA influenza l'espressione di questi geni ed è mediata dalla risposta retrograda (Fig. 16). Infatti, è stato dimostrato in questo lavoro che il fenotipo di resistenza alla licorina è espresso in ceppi di *S. cerevisiae* completamente privi di mtDNA solo in presenza dei geni RTG nucleari.



Ulteriori studi genetici e molecolari sono richiesti per isolare il gene (o i geni) coinvolto(i) nell'espressione del fenotipo di resistenza alla licorina e per determinare la sua (o la loro) funzione nel metabolismo del lievito.

In ogni caso, per analogia con la risposta retrograda del gene CIT2, è plausibile che l'overespressione di geni nucleari coinvolti nella replicazione del DNA in cellule con disfunzioni mitocondriali, riflette un meccanismo di compensazione che richiede un aumento dell'attività cellulare di quel o di quei geni in presenza di licorina.

Ci sono evidenze che indicano che i mitocondri giocano un ruolo centrale nella mutagenesi, insorgenza di tumori e apoptosi

*(Cavalli and Liang, 1998; von Wangenheim and Peterson, 1998; Hofhaus and Gatterman, 1999; Wallace, 1999; Butow, 2002)*. Un modello eucariota come il lievito potrebbe essere un modello sperimentale ideale per delucidare il ruolo della licorina nei segnali cellulari.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Amuthan G., Biswas G., Anandatheerthavarada H.K., Vijayasathy C., Shephard H.M., Avadhani N.G. (2002) Mitochondrial stress-induced calcium signaling phenotypic changes, and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 21: 7839-7849
- Amuthan G., Biswas G., Zhang S.Y., Klein-Szanto A., Vijayasathy C., Avadhani N.G. (2001) Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J.* 20: 1910-1920
- Arnould T., Vankoningsloo S., Remnard P., Houbion A., Ninane N., Demazy C., Remacle J., Raes M. (2002) CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signalling pathway that impairs cell proliferation. *EMBO J.* 21: 53-63
- Arrigoni O., Arrigoni-Liso R., Calabrese G. (1977) Ascorbic acid requirement for biosynthesis of hydroxyproline containing proteins in plants. *FEBS Letters* 82: 135-138
- Arrigoni O., Arrigoni-Liso R., Calabrese G. (1976) Ascorbic acid a factor controllino the development of cyanide-insensitive respiration. *Science* 194: 332-333
- Arrigoni O., Arrigoni-Liso R., Calabrese G (1975) *Nature* 256: 513-515
- Asadov D.A., Ismalloy S.H.V. (1972) *Farmacol alkalidov Ikh provizdov* 178
- Bebenek K., Kunkel T.A. (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* 69: 137-165
- Bielas J.H., Loeb L.A. (2005) Mutator phenotype in cancer: timing and perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.* 45: 206-213
- Biswas G., Adebajo O.A., Freedman B.D., Anandatheerthavarada H.K., Vijayasathy C., Zaidi M., Kotlikoff M., Avadhani N.G. (1999) Retrograde Ca<sup>++</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J.* 18: 522-533

- Bork P., Sander C., Valencia A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7290-7294
- Brookes P.S., Kraus, D.W., Shiva S., Doeller J.E., Barone, M.C., Patel R.P., Lancaster J.R. Jr, Darley-Usmar V. (2003) Control of mitochondrial respiration by NO, effects of low oxygen and respiratory state. *J. Biol. Chem.* 278: 31603-31609
- Brookes P.S., Levonen A.L., Shiva S., Sarti P., Darley-Usmar V.M. (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 755-764
- Butow R.A., Avadhani N.G. (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell.* 14: 1-15
- Butow R.A. (2002) Cellular responses to mitochondrial dysfunction: it's not always downhill. *Cell Death Differ.* 9: 1043-1045
- Cavalli L.R., Liang L.R. (1998) Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mutat. Res.* 26: 19-26
- Chelstowska A., Liu Z.C., Jia Y.K., Amberg D., Butow R.A. (1999) Signaling between mitochondria and the nucleus regulates expression of a new D-lactate dehydrogenase. *Yeast* 15: 1377-1391
- Clark-Walker G.D., Linnane A. W. (1966) In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25: 8-13
- Cleeter M.W., Cooper J.M., Darley-Usmar V.M., Moncada S., Schapira A.H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345: 50-54
- Collins K. (1996) Structure and function of telomerase. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 374-380

- Costanzo M.C., Fox T.D. (1988) Specific Translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2677-2681
- Costanzo M.C., Fox T.D. (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 24: 91-113
- Dai L., Brookes P.S., Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. (2001) Bioenergetics in cardiac hypertrophy: mitochondrial respiration as a pathological target of NO\*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 281: H2261–H2269
- Davey M.W., Persian G., De Bruyn A., Van Damme J., Van Montagu M. (1998) Purification of the alkaloid lycorine and simultaneous analysis of ascorbic acid and lycorine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Biochem.* 257: 80-88
- Davis A.F., Ropp P.A., Clayton D.A., Copeland W.C. (1996) Mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  is expressed and translated in the absence of mitochondrial DNA maintenance and replication. *Nucleic. Acids Res.* 24: 2753-2759
- De Leo P., D'Alessandro G., De Santis A., Arrigoni O. (1973) Inhibitory effect of lycorine on cell division and cell elongation. *Plant and Cell Physiol.* 14: 481-486
- Del Giudice L., Massardo D.R. Pontieri P., Wolf K. (2005) Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: Null alleles of *RTG* genes affect resistance to the alkaloid lycorine in  $\rho^0$  petites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 354: 9-14
- Del Giudice A., Massardo D.R., Manna F., Koltovaya N., Hartings H., Del Giudice L., Wolf K. (1997) Correlation of resistance to the alkaloid lycorine with the degree of suppressiveness in petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* 34: 382–384
- Del Giudice L., Wolf K. (1983) Genetica, biogenesi ed evoluzione dei mitocondri. *Quaderni di biologia* n°35, Ed. Piccin



- Del Giudice L., Massardo D.R., Manna F., Wolf K. (1986) Isolation and genetical and biochemical characterization of mutants resistant to the alkaloid lycorine, *Curr. Genet.* 11: 247–249
- Del Giudice L., Massardo D.R., Manna F., Evidente A., Randazzo G. and Wolf K. (1984) Differential effect of the alkaloid lycorine on rho<sup>+</sup>, mit<sup>-</sup>, rho<sup>-</sup>, and rho<sup>0</sup> strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 8: 493–497
- de Zamaroczy M., Bernardi G. (1986) The primary structure of the mitochondrial genome of *S. cerevisiae*-a review. *Gene* 47: 155-177
- Dillin A., Hsu A.L., Arantes-Oliveira N., Lehrer-Graiwer J., Hsin H., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J. Kenyon C. (2002) Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* 298: 2398–2401
- Dilova I., Chen C.-Y., Powers T. (2002) Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12: 389–395
- Dujon B. (1981) Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance. Eds. Strathern J.N. and Broach J., CSH Monographs
- Ephrussi B., Slonimski P.P. (1955) Subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Nature* 176: 1207-1208
- Epstein C.B., Waddle J.A., Hale W. 4th, Dave V., Thornton J., Macatee T.L., Garner H.R., Butow R.A. (2001) Genome-wide responses to mitochondrial dysfunctions. *Mol. Biol. Cell* 12: 297–308
- Evidente A., Iasiello I., Randazzo G., (1984) *Chemistry and Industry*
- Evidente A., Randazzo G., Surico G., Lavermicola P. (1985) *J. Nat. Prod.* 48: 564
- Felkai S., Ewbank J.J., Lemieux J., Labbe J.C., Brown G.G., Hekimi S. (1999) CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 18: 1783–1792

- Gampel A., Tzagoloff A. (1987) In vitro splicing of the terminal intervening sequence of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2545-2551
- Garg P., Burgers P.M. (2005) DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 115-128
- Graziewicz M.A., Longley M.J., Copeland W.C. (2006) DNA polymerase  $\gamma$  in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem. Rev.* 106: 383-405
- Grivell L.A. (1987) Helping RNA catalysis along. *Nature* 330: 313
- Grossman L.I., Goldring E.S., Marmur J. (1969) Preferential synthesis of yeast mitochondrial DNA in the absence of protein synthesis. *J. Mol. Biol.* 46: 367-376
- Guarente L., Kenyon C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408: 255-262
- Hallstrom T.C., Moye-Rowley W.S. (2000) Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 37347-37356
- Hideo (1975) "Meiji Dorigoku Kagoku Gijutsu Ken Ken Rysho Kijo" 14: (I)
- Hofhaus G., Gattermann N. (1999) Mitochondria harbouring mutant mtDNA—a cuckoo in the nest? *Biol. Chem.* 380: 871-877
- Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., Guarente L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403: 795-800
- Jazwinski S.M. (1999) The RAS genes: a homeostatic device in *Saccharomyces cerevisiae* longevity. *Neurobiol. Aging* 20: 471-478
- Jazwinski S.M. (2002) Growing old: metabolic control and yeast aging. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 769-792
- Jia Y., Rothermel B., Thornton J., Butow R.A. (1997) A basic helix-loop-helix zipper transcription complex functions in a signaling

- pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1110–1117
- Jiang J.C., Jaruga E., Repnevskaya M.V., Jazwinski S.M. (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J.* 14: 2135–2137
- Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vasquez D. (1976) Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some amaryllidaceae alkaloids. *Biochim. Biophys. Acta* 425: 342-348
- Johnson A., O'Donnell M. (2005) Cellular DNA replicase: Components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 283-315
- Jones B.A., Fangman W.L. (1992) Mitochondrial maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6: 380-389
- Kaguni L.S. (2004) DNA polymerase  $\gamma$ , the mitochondrial replicase. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 293-320
- Kirchman P.A., Kim S., Lai C.Y., Jazwinski S.M. (1999) Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152: 179–190
- Koonin E.V. (1994) Yeast protein controlling inter-organelle communication is related to bacterial phosphatases containing the Hsp70-type ATP-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* 19: 156–157
- Kornberg A., Baker T. (1991) “DNA Replication”. W.H. Freeman and Co., New York
- Lecrenier N., Foury F. (2000) New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 246: 37-48
- Lee S.S., Lee R.Y., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., Ruvkun G. (2003) A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.* 33: 40–48
- Lehninger A.L. (1973) Bioenergetics. The Molecular Basis of Biological Energy Transformations. Second Edition. W.A. Benjamin, Inc. Menlo Park, California. Figure 5-9 pag. 93

- Liao X., Butow R.A. (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72: 61–71
- Liao X.S., Small W.C., Srere P.A., Butow R.A. (1991) Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 38–46.
- Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126–2128
- Linn S.J., Kaeberlein M., Andalis A.A., Sturtz L.A., Defossez P.A., Culotta V.C., Fink G.R., Guarente L. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418: 344–348
- Liu Z., Butow R.A. (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6720–6728
- Liu Z., Sekito T., Epstein C.B., Butow R.A. (2001) RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO J.* 20: 7209–7219
- Liu Z., Sekito T., Spirek M., Thornton J., Butow R.A. (2003) Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol. Cell* 12: 401–411
- Luo Y., Bond J.D., Ingram V.M. (1997) Compromised mitochondrial function leads to increased cytosolic calcium and to activation of MAP kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9705–9710
- Manske R.H.F. (1968) “The Alkaloids” vol. 2 ed Accademic Press 307.
- Martinus R.D., Garth G.P., Webster T.L., Cartwright P., Naylor D.J., Hoj P.B., Hoogenraad N.J. (1996) Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur. J. Biochem.* 240: 98–103

- Marusich M.F., Robinson B.H., Taanman J.W., Kim S.J., Schillace R., Smith J.L., Capaldi R.A. (1997) Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho<sup>0</sup> human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1362:145–159
- Massardo D.R., Zweifel S.G., Gunge N., Miyakawa I., Sando N., Del Giudice A., Wolf K., Del Giudice L. (2000) Use of lycorine and DAPI staining in *Saccharomyces cerevisiae* to differentiate between rho<sup>0</sup> and rho<sup>-</sup> cells in a *cce1*<sup>+/?</sup> *cce1* nuclear background *Can. J. Microbiol.* 46: 1058–1065
- Massardo D.R., Manna F., Schaefer B., Wolf K., Del Giudice L. (1994) Complete absence of mitochondrial DNA in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* leads to resistance towards. *Curr. Genet.* 25: 80-83
- Mayo V.S., Andrian B.A.G., De Kloet S.R. (1968) Effects of cycloheximide and 5-fluorouracil on the synthesis of ribonucleic acid in yeast, *Biochim. Biophys. Acta* 169: 297–305
- Miyadera H., Kano K., Miyoshi H., Ishii N., Hekimi S., Kita K., (2002) Quinones in long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 512: 33–37
- Miyakado M., Kato T., Ohno N., Koshimizu K. (1975) Alkaloids of *Urginea altissima* and their antimicrobial activity against *Phytophthora capsici*. *Phytochemistry* 14: 2717
- Miyakawa I., Higo K., Osaki F., Sando N. (1994) Double staining of mitochondria and mitochondrial nucleoids in the living yeast during life cycle. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 1-14
- Mori K., Ma, W., Gething M.J., Sambrook J. (1993) A transmembrane protein with a *cdc2*<sup>+</sup>/*CDC28*-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74: 743–756
- Mortimer R.K., Johnston J.R. (1959) Life span of individual yeast cells. *Nature* 183: 1751–1752

- Mounolou JC, Jakob H, Slonimski PP. (1966) Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants: specific changes in buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. *Biochem Biophys Res. Commun.* 24: 218-224
- Nagley P., Sriprakash K.S., Rytka J., Choo K.B., Trembath M.K., Lukins H.B., Ninnane A.W. (1976) In the genetic Function of mitochondrial DNA Eds. Saccone C. and Kroon A.M. p.231-234
- Parikh V.S., Conrad-Webb H., Docherty R., Butow R.A. (1989) Interaction between the yeast mitochondrial and nuclear genomes influences the abundance of novel transcripts derived from the spacer region of the nuclear ribosomal DNA repeat. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1897-1907
- Parikh V.S., Morgan M.M., Scott R., Clements L.S., Butow R.A. (1987). The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* 235: 576–580
- Pavlov Y.I., Shcherbakova P.V., Rogozin I.B. (2006) Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *International Review of Cytology* 255: 41-132
- Poutre C., Fox T.D. (1987) PET 111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for the translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome C oxidase subunit II. *Genetics* 115: 637-647
- Pray-Grant M.G., Schieltz D., McMahon S.J., Wood J.M., Kennedy E.L., Cook R.G., Workman J.L., Yates III J.R., Grant P.A. (2002) The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22: 8774–8786
- Rendi R. (1959) The effect of chloramphenicol on the incorporation of labelled amino acids into proteins by isolated subcellular fractions from rat liver. *Exp. Cell Res.* 18: 187-189
- Rosenkrantz M., Kell C.S., Pennel E.A., Devenish L.J. (1994) The HAP 2,3,4 transcriptional activator is required for derepression of the yeast citrate synthase gene, CIT1. *Mol. Microbiol.* 13: 119-131
- Schatz G., Mason T.L. (1974) The biogenesis of mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 51-87

- Schatz G., Haslbrunner E., Tuppy H. (1964) Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15: 127
- Schofield M.J., Lilley D.M.J., White M.F. (1998) Dissection of the sequence specificity of the Holliday junction endonuclease CCE1. *Biochemistry* 37: 7733-7740
- Sekito T., Thornton J., Butow R.A. (2000) Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol. Biol. Cell* 11: 2103–2115
- Sekito T., Liu Z., Thornton J., Butow R.A. (2002) RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to the formation of the yeast prion. *Mol. Biol. Cell* 13: 795–804
- Sherman F. (1963) Respiration-deficient mutants of yeast. I. *Genetics*. *Genetics* 48: 375-385
- Siegel M.R., Sisler H.D. (1965) Site of action of cycloeximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. 3. Further on the mechanism of action and the mechanism of resistance in saccharomyces species. *Biochem. Biophys. Acta* 103: 558-567
- Sinclair D.A., Guarente L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles-a cause of aging in yeast. *Cell* 91: 1033–1042
- Slonimski P.P., Ephrussi B. (1949) *Ann. Inst. Pasteur* 77:47
- Slonimski P.P. (1968) In 'Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria'. Ed. Slater E.C. e coll p.475. Adriatica Bari.
- Stepien P., Margossian S.P., Landsman D., Butow R.A. (1992) The yeast nuclear gene *svu3* affecting mitochondrial post-transcriptional processes encodes a putative ATP-dependent RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6813-6817
- Stewart L.C., Yaffe M.P. (1991) A role for unsaturated fatty acids in mitochondrial movement and inheritance. *J. Cell Biol* 115: 1249-1257
- Tate J.J., Cox K.H., Rai R., Cooper T.G. (2002) Mks1p is required for negative regulation of retrograde gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* but does not affect nitrogen catabolite

- repression-sensitive gene expression. *J. Biol. Chem.* 277: 20477–20482
- Traven A., Wong J.M., Xu D., Sopta M., Ingles C.J. (2000) Inter-organellar communication: altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial DNA mutant. *J. Biol. Chem.* 27: 27
- Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S., Walter P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249–258
- Tzagoloff A., Akai A., Needleman R.B., Zulch G. (1975) Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *S. cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* 250: 8236-8242
- Udem S.A., Warner J.R. (1972) Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 65: 227–242
- Vazquez D. (1974) Inhibitors of protein synthesis. *FEBS Lett.* 40: S63-S84
- von Wangenheim K.H., Peterson H.P. (1998) Control of cell proliferation by progress in differentiation: clues to mechanisms of aging, cancer causation and therapy. *J. Theor. Biol.* 21: 663–678
- Wallace D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488
- Wang H., Morais R. (1997) Up-regulation of nuclear genes in response to inhibition of mitochondrial DNA expression in chicken cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1352: 325–334
- Williamson D.H., Fennell D.J. (1979) Visualizzazione of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain “DAPI”. *Methods Enzimol.* 56: 728-733
- Wolf K., Del Giudice L. (1988) The variable mitochondrial genome of ascomycetes: organization, mutational alterations, and expression. *Adv. Genet.* 25: 185-308



Zhao Q., Wang J., Levichki I.V., Stasinopoulos S., Ryan M.T.,  
Hoogenraad N.J. (2002) A mitochondrial specific stress  
response in mammalian cells. EMBO J. 21: 4411–4419

## Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Maurilio De Felice per avere coordinato in maniera eccellente e fruttifera il mio percorso di Dottorato nell'ambito della ricerca in Biologia Applicata.

Ringrazio il Prof. Luigi Del Giudice per avermi dato la possibilità di svolgere la mia Tesi di Dottorato presso il suo gruppo di ricerca al CNR, e per avermi seguita nello svolgimento del lavoro sperimentale e nella discussione dei risultati.

Ringrazio l'Istituto Banco di Napoli - Fondazione per aver finanziato con una borsa di studio il mio triennio di Dottorato.