UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali

Dottorato di Ricerca in Scienze Geologiche, Biologiche e Ambientali

XXX Ciclo

MARIA CARMELA DI ROSA

Caratterizzazione del ruolo della Superossido Dismutasi 1 (SOD1) in relazione al metabolismo mitocondriale

Tesi di Dottorato

Relatore: ***Prof. Vito De Pinto***

Coordinatore*: Prof.ssa Agata Di Stefano*

A.A. 2017

ABSTRACT

SOD1 (Superoxide Dismutase isoform1) is an antioxidant enzyme, conserved in any organism, and involved in oxidative stress cell defense. There are 3 different SOD isoforms in the cell, but the main isoform is Cu-Zn SOD, or SOD1, located in the cytosol. In the last years, SOD1 studies are exponentially increasing, since it was found that this protein is involved in the motor neuron neurodegenerative disease, known as amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

In the cell, SOD1 carries out other functions in addition to the antioxidant one. In yeast *S.cerevisise*, it promotes the regulation of mitochondrial metabolism, repressing the oxidative respiration, when the yeast grow on fermentable carbon source, such as glucose. Recently, it was discovered a transcriptional function for SOD1 under oxidative stress condition.

Respiratory metabolism takes place in the inner mitochondrial membrane. VDAC1 (Voltage Dependent Anion Channel) or porin, located in the outer mitochondrial membrane allows the exchange of ions and metabolites between cytosol and the inside of the organelle. *S.cerevisiae* survives the deletion of VDAC1 codifying gene (Δ*por*1), but it is unable to grow on not fermentable carbon source, such as glycerol, because it cannot perform the mitochondrial respiration. This defective growth can be restored by other eukaryotic porins, (like the human, murine and so on), since the protein is conserved in the evolution.

In this work, we focused on the SOD1 role in VDAC1-related mitochondrial metabolism, to understand the relationships between both these proteins in the cell.

The starting point of this work was serendipitous. The aim of the project was, at the beginning, to study the interaction between VDAC1 and hSOD1 wild type and hSOD1 mutant forms involved in ALS, after co-transformation of Δ*por1* strain. Surprisingly the expression of hSOD1 in Δ*por1* strain, an experimental control, showed a very interesting phenotype, with the recovery of the defective growth of mutant strain on not fermentative glycerol. Starting from this observation, we carried out the characterization of this strain. Especially, we investigated the mitochondrial functionality, and we demonstrated a recovery of mitochondrial

metabolism and the increase of the outer mitochondrial membrane proteins gene expression in the presence of hSOD1. Among them, the *por2* gene encoding the second isoform of VDAC (yVDAC2), resulted 8-times overexpressed in Δ*por1* transformed with hSOD1, compared to control Δ*por1*.

At the end, since yVDAC2 is a protein unknown until now, because it is expressed at very low level in the cell, we performed the electrophysiological characterization of yVDAC2 recombinant protein, highlighting its pore-forming activity. Moreover, the expression of hSOD1 protein in Δ*por1* strain, provokes a remodeling of cell wall composition and structure.

ABSTRACT

La superossido dismutasi (SOD) è un enzima antiossidante, presente in tutti gli eucarioti, che svolge la funzione di difendere la cellula dall'anione superossido. Nonostante siano state descritte 3 isoforme diverse, la Cu-Zn SOD, o SOD1 è l'isoforma più abbondante nel citosol. Negli ultimi anni l'interesse verso lo studio di questa proteina è cresciuto sempre di più, dal momento che diverse mutazioni della proteina sono state ritrovate in tessuti di pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA), una patologia neurodegenerativa, che colpisce i motoneuroni del sistema nervoso.

Oltre alla funzione antiossidante, sono state descritte altre funzioni per la proteina SOD1. Nel lievito *S.cerevisiae*, SOD1 è coinvolta nella regolazione della repressione del metabolismo mitocondriale, in quanto la cellula che cresce su glucosio utilizza quasi esclusivamente la fermentazione per la produzione di energia, reprimendo la respirazione ossidativa. Inoltre recentemente è stato dimostrato che SOD1 può agire da attivatore della trascrizione di geni coinvolti nella difesa allo stress ossidativo e nella riparazione del DNA.

Il metabolismo respirativo che avviene all'interno del mitocondrio, è in gran parte favorito dalla presenza della proteina VDAC1 (Voltage Dependent Anion Channel). Essa, localizzata sulla membrana mitocondriale esterna, assicura la sua permeabilità, favorendo gli scambi di metaboliti e ioni tra il mitocondrio e il citosol. In *S.cerevisiae* la delezione del gene che codifica per questa proteina (ceppo Δ*por1*) causa scompensi nella funzionalità del mitocondrio, a tal punto che la cellula non è più in grado di crescere e riprodursi utilizzando il glicerolo come fonte di carbonio, proprio perché non è in grado di effettuare la respirazione mitocondriale. Tale difetto, può essere recuperato dall'espressione eterologa di proteine omologhe appartenenti a specie diverse, tra cui quella umana, a conferma della conservazione della proteina durante il processo evolutivo.

Alla luce delle evidenze descritte, in questo lavoro è stata posta l'attenzione sulla funzione che la SOD1 svolge all'interno del metabolismo mitocondriale mediato da VDAC1 per comprendere il delicato ruolo di cooperazione svolto dalle due proteine all'interno della cellula.

È importante precisare l'origine e il modo con cui è stato ottenuto il ceppo protagonista di questa tesi di dottorato, ovvero il ceppo Δ*por1* che esprime la proteina umana SOD1. Questo ceppo, era stato generato come il controllo di un esperimento in cui Δ*por1* era stato trasformato contemporaneamente con le sequenze codificanti la proteina umana VDAC1 e la proteina SOD1 wild type o mutanti coinvolti nella SLA. Attraverso l'osservazione e lo studio del ceppo co-trasformato si voleva studiare l'effetto che le proteine SOD1 mutanti avevano sul metabolismo mitocondriale mediato da VDAC1, al fine di individuare una possibile interazione funzionale tra le due proteine. La successiva analisi fenotipica del ceppo controllo Δ*por1* trasformato con hSOD1 umana ha permesso di osservare un'inattesa e sorprendente ripresa della crescita su glicerolo, che ha subito dato avvio alla ricerca del meccanismo coinvolto. Gli studi scaturiti, dimostrano che l'espressione di hSOD1 recupera la funzionalità mitocondriale del ceppo Δ*por1*, modulando l'espressione delle proteine della membrana mitocondriale esterna e incrementando la quantità dei mitocondri e le copie di mt-DNA. Tale ceppo, inoltre, presenta un caratteristico rimodellamento della struttura della parete cellulare, che la rende più resistente all'azione di agenti chimici. Infine è stata caratterizzata l'isoforma yVDAC2, risultata la più espressa tra le proteine β-barrel della membrana mitocondriale esterna nel ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1. Questa proteina, ad oggi poco conosciuta, si è rivelata in grado di formare canali in membrane lipidiche artificiali seppur con qualche differenza rispetto all'isoforma principale yVDAC1.

INDICE

1. INTRODUZIONE 8
1.1 Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* 8
1.1.1 Caratteristiche genetiche del lievito 9
1.1.2 Le fasi di crescita e il ciclo cellulare del lievito 10
1.1.3 La riproduzione del lievito 13
1.1.4 Caratteristiche citologiche del lievito 14
1.1.5 La parete cellulare del lievito 15
1.2 Il mitocondrio e la respirazione ossidativa 21
1.2.1 Le proteine VDAC 23
1.2.2 VDAC1 negli eucarioti: dal lievito all'uomo 24
1.3 La famiglia delle Superossido Dismutasi 28
1.3.1 Evoluzione delle forme di SOD 29
1.3.2 Le proteine SOD negli eucarioti 30
1.3.2.1 Isoforme nell'uomo 30
1.3.2.2 Isoforme nel lievito 32
1.3.3 Altre funzioni delle proteine SOD 33
1.3.4 Coinvolgimento di SOD1 nel metabolismo energetico del mitocondrio 36
1.3.5 Coinvolgimento di SOD1 nella sclerosi laterale amiotrofica 36
2. SCOPO ED ORGANIZZAZIONE DELLA TESI 38
3. RISULTATI 40
3.1 Effetto dell'espressione della proteina hSOD1 nel ceppo deleto della porina mitocondriale (Δ*por1*) 40
3.1.1 hSOD1 recupera il difetto di crescita del ceppo Δpor1 su glicerolo e su altre fonti di carbonio non fermentabili 40
3.1.2 Analisi della funzionalità mitocondriale 42
3.1.3 hSOD1 induce l'espressione di geni codificanti proteine β–barrel della membrana mitocondriale esterna 45
3.1.4 Espressione del mutante hSOD1 G85R nel Δpor1 47
3.1.5 Conclusione 47
3.2 In che modo la SOD1 umana ripristina il metabolismo mitocondriale? 50
3.2.1 Differenze tra i residui cisteinici delle sequenze SOD1 di lievito e umana . 50
3.2.2 Mutagenesi delle serine di hSOD1 coinvolte nella traslocazione al nucleo. 53

3.2.3 Conclusione 54
3.3 Analisi dell'espressione genica del lievito Δ*por1* e di ceppi da esso derivati 56
3.3.1 Analisi dell'espressione genica mediante microarray 56
3.3.2 Raggruppamento funzionale dei geni variati 58
3.3.3 Analisi dell'espressione dei geni mitocondriali 61
3.3.3.1 Quantificazione del DNA mitocondriale mediante PCR Real Time 63
3.3.3.2 Quantificazione dei mitocondri mediante citofluorimetria 63
3.3.4 Conclusione 65
3.4. Studio della parete cellulare dei ceppi Δ*por1* e derivati 67
3.4.1 Test di sensibilità alla Zymolyase 68
3.4.2 Rimodellamento dello strato di chitina 69
3.4.2.1 saggi di diluizioni seriale su Calcofluor White 69
3.4.2.2 Analisi della quantità di chitina mediante microscopia e citofluorimetria 71
3.4.3 Saggi di diluizione seriale su altri composti che perturbano la stabilità della parete cellulare 74
3.4.3.1 Saggi di diluizione seriale su caffeina 74
3.4.3.2 Saggi di diluizione seriale su SDS 75
3.4.5 Conclusione 76
3.5 La seconda isoforma di VDAC nel lievito *S.cerevisiae* 78
3.5.1 Caratterizzazione elettrofisiologica della proteina ricombinante yVDAC2 78
3.5.1.1 Espressione eterologa della proteina yVDAC2 in *E.coli* 78
3.5.1.2 Analisi della conduttanza e della voltaggio dipendenza della proteina yVDAC2 ricombinante 80
3.5.1.3 Analisi della selettività ionica 83
3.5.2 Saggi di funzionalità *in vivo* 84
3.5.2.1 Espressione di yVDAC2 nel ceppo di lievito Δ*por*1 85
3.5.2.2 Quantificazione dell' espressione dei geni *por1* e *por2* nel lievito *S.cerevisiae* 86
3.5.3 Espressione di yVDAC2 nel ceppo di lievito deleto di entrambe le porine mitocondriali (Δ*por*1/ Δ*por*2) 88
3.5.3 Conclusioni 89
4. CONCLUSIONI GENERALI 91
5. MATERIALI E METODI 95
5.1 Ceppi di lievito *S.cerevisiae* utilizzati 95
5.2 Clonaggio delle sequenze SOD1 wt e mutanti 96

5.3 Clonaggio delle sequenze yVDAC 97
5.4 Saggi di diluizione scalare 98
5.5 Test di sensibilità alla Zymolyase 98
5.6 Microscopia delle colture di lievito 98
5.7 Analisi citofluorimetrica 99
5.8 Analisi dell'espressione genica mediante microarray 100
5.9 Estrazione del DNA dai ceppi di lievito 101
5.10 Quantificazione dell'espressione genica mediante Real time PCR 102
5.11 Espressione della proteina yVDAC2 in *E.coli* 105
5.12 Elettrofisiologia della proteina yVADC2 ricombinante 106
INDICE DELLE ABBREVIAZIONI USATE NEL TESTO 108
6. Bibliografia 110

1. INTRODUZIONE

1.1 Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è uno degli eucarioti unicellulari più conosciuti e più studiati per la grande varietà di applicazioni biotecnologiche in cui può essere utilizzato. È probabilmente il lievito più importante nell'ambito dell'alimentazione umana, responsabile del tipo più comune di fermentazione, quella alcolica, motivo per cui, è stato usato fin dai tempi degli antichi Egizi per la produzione di pane e birra. Oggi viene utilizzato anche nell'industria farmaceutica per la produzione di proteine ricombinanti, oltre che nella ricerca di base dove costituisce un buon organismo modello per studi di biochimica e biologia molecolare, del ciclo cellulare, del metabolismo e dell'integrità del genoma. I motivi che lo hanno reso un organismo modello così diffuso sono molteplici. Innanzitutto il fatto che pur essendo un eucariote unicellulare presenta strutture e meccanismi evolutivamente vicine a quelle degli eucarioti superiori (fig.1.1). Non meno importanti sono l'economicità e la sua sicurezza, in quanto è un organismo facilmente coltivabile e manipolabile, con una velocità di crescita abbastanza elevata rispetto ad altri sistemi modello, non richiede sistemi di coltura costosi o ingombranti, e non è patogeno. Queste caratteristiche, hanno favorito e sviluppato moltissime linee di studio al fine di comprendere fino in fondo *S.cerevisieae* e sfruttarne al meglio le

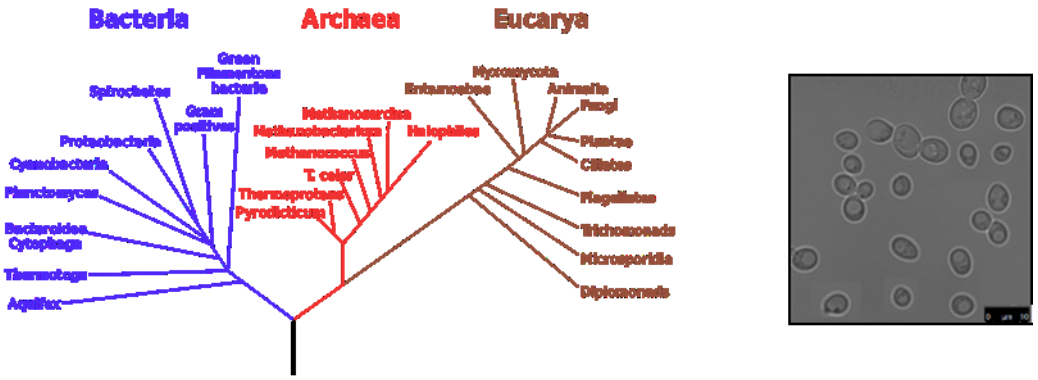


Figura 1.1. Albero filogenetico degli organismi viventi proposto da Carl Woese, elaborato analizzando lo omologie dell'RNA ribosomiale 16S (sinistra). Da notare la stretta vicinanza tra Animali e Funghi (Fonte: modificato da Woese C., 2002). **Cellule di *S.cerevisiae* viste al microscopio ottico** con ingrandimento 60x. (destra).

sue proprietà (Botstein D., 1997).

1.1.1 Caratteristiche genetiche del lievito

Il genoma del lievito *S.cerevisiae* è stato il primo, tra tutti i genomi degli eucarioti, ad essere sequenziato per intero, nel 1996. Esso è composto da 12068 Kb organizzati in un set aploide di 16 cromosomi (Sherman F., 1998), che include 6200 ORF (open reading frame): 5800 ORF sono geni codificanti proteine, 275 codificano per tRNA, 40 per snRNA, e 140 geni localizzati tutti sul cromosoma 12 codificano per rRNA. Al contrario di quello degli eucarioti superiori, il genoma del lievito è per la gran parte codificante (72%), e solo il 4% è rappresentato da introni (fig. 1.2) (Goffeau A., 1996). L'11% di tutti i geni codificanti proteine partecipa al metabolismo, il 3% è coinvolto nella produzione di energia, un'altra percentuale pari al 3% partecipa alla replicazione del DNA, il 7% alla trascrizione e il 6% alla traduzione. (Goffeau A. 1996). Va precisato però, che solo tre quarti delle proteine del lievito sono state caratterizzate funzionalmente. La restante parte invece è ancora sconosciuta.

La completa conoscenza del genoma di lievito ha permesso di effettuare con precisione la delezione di geni per approfondire lo studio della funzione di alcune proteine. Inoltre, il sequenziamento del genoma di altri organismi come nematodi , mosche, topo e uomo ha confermato un alto livello di conservazione di sequenze e funzione nel corso dell'evoluzione. In particolare, dato che il 30% dei geni di

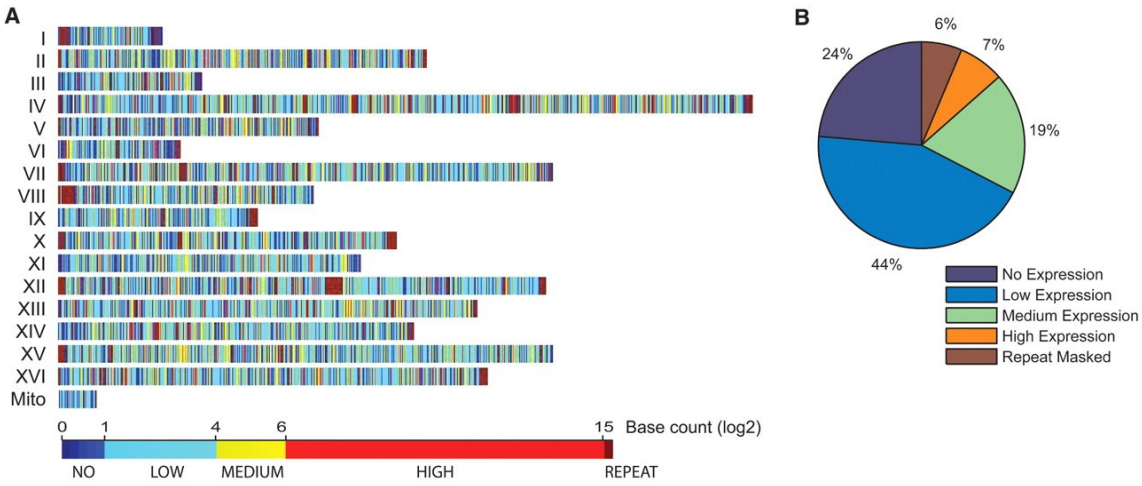


Figura 1.2. Distribuzione genomica e livello dei trascritti del genoma di *S.cerevisiae*. A: i colori rappresentano il diverso livello di espressione, i numeri romani corrispondono al numero dei cromosomi. Mito=genoma mitocondriale**. B:**livello di espressione dei trascritti (Nagalakshmi U.,2008).

S.cerevisiae sono omologhi ai geni degli eucarioti superiori, gran parte delle scoperte scientifiche fatte utilizzando il lievito come organismo modello si sono dimostrate vere anche per i mammiferi, incluso l'uomo. Numerosi sono i meccanismi molecolari conservati nei due organismi: la replicazione del DNA, la sintesi proteica e le modificazioni post-traduzionali, i pathway metabolici ed energetici, il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale ed l'apoptosi (Botstein D., 1997).

Come tutti gli organismi eucariotici il lievito possiede dei mitocondri con un proprio genoma (mtDNA), i cui geni e la loro struttura intronica a mosaico sono stati identificati per la prima volta proprio in questo organismo. Il genoma mitocondriale di *S.cerevisiae* è caratterizzato da una bassa densità genica ed è altamente eterogeneo nella composizione in basi. Il contenuto in A+T è molto alto contro la coppia G+C che rappresenta solo il 30% del totale delle basi azotate (Foury et al., 1998). mtDNA è lungo circa 85000 paia di basi e contiene 7 ORF con 10 geni che codificano per componenti del macchinario di traduzione mitocondriale e per circa il 15 % di proteine mitocondriali (Sherman F., 1998). Esistono ceppi mutanti di lievito che hanno perso il DNA mitocondriale o ne presentano un numero bassissimo di copie. Questi mutanti, conosciuti con il nome di petite o mutanti rho0, non hanno componenti della catena respiratoria codificate a partire da mtDNA, quali il citocromo b, la subunità del complesso dell'ATPase e del complesso citocromo ossidasi, caratteristica che non gli permette di effettuare la respirazione mitocondriale quando la cellula cresce su glicerolo. Essi infatti, risultano vitali esclusivamente quando crescono su fonti di carbonio fermentabili come il glucosio (Sherman F., 1998).

1.1.2 Le fasi di crescita e il ciclo cellulare del lievito

La proliferazione cellulare di *S.cerevisiae* può essere descritta dal fenomeno di crescita della popolazione e dal ciclo cellulare. Infatti il termine "crescita", nel caso del lievito, così come degli organismi unicellulari, descrive sia un aumento in massa cellulare che un aumento nel numero di individui di una popolazione.

Durante la crescita, una coltura di lieviti attraversa quattro fasi: fase di latenza, fase logaritmica, fase di rallentamento e fase stazionaria. Quando una coltura di

lieviti è inoculata in terreno fresco, le cellule attraversano una fase di latenza in cui sono metabolicamente attive ma non si dividono (Held P., 2010). La durata e l'estensione di questa fase dipende dalla misura iniziale della popolazione e dalle condizioni ambientali (temperatura, pH, concentrazione di alcol, ossigeno, sali e nutrienti vari). Non appena le cellula si è adattata a queste nuove condizioni, inizia la replicazione del DNA che culmina con la divisione cellulare. Così la coltura entra in fase esponenziale o logaritmica, durante la quale le cellule seguono un metabolismo per lo più glicolitico o fermentativo (Tissenaum H.A. e GuarenteL., 2002). In questa fase il fattore limitante è il glucosio, infatti non appena il numero di cellule raggiunge un certo livello e il glucosio inizia a scarseggiare, la popolazione inizia a rallentare il ritmo di crescita, innescando lo shift diauxico, ovvero il passaggio da un metabolismo di tipo fermentativo a uno di tipo respirativo in cui consumano i substrati prodotti nella fase precedente (etanolo e acetato). Così pian piano, la coltura raggiunge la fase stazionaria nella quale le cellule smettono di riprodursi e diventano resistenti a qualunque tipo di stress sia nutritivo che ambientale. In questa condizione i lieviti sono capaci di sopravvivere per alcuni mesi (fig. 1.3A).

La crescita dunque è una conseguenza della sintesi proteica che avviene in modo continuo durante il ciclo cellulare del singolo individuo. All'interno del ciclo cellulare ci sono invece eventi discontinui che si verificano una volta soltanto ad ogni ciclo, come la replicazione del genoma, la mitosi e la divisione cellulare

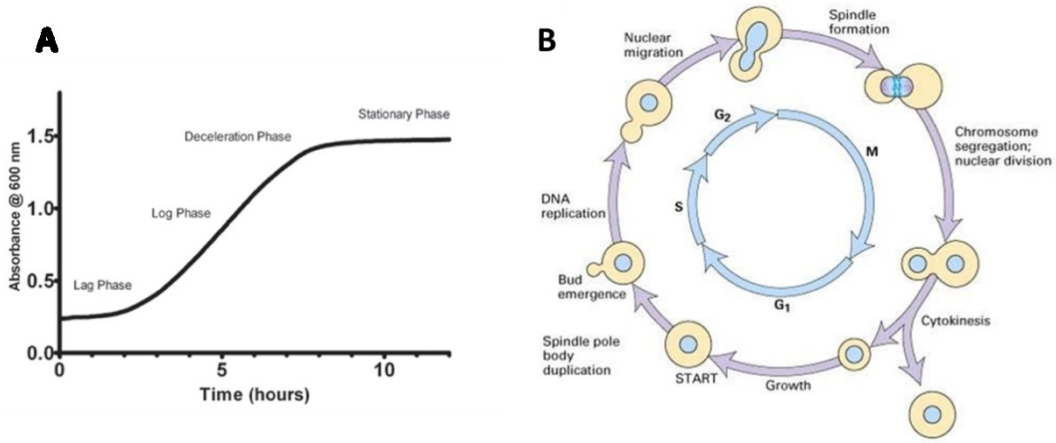


Figura 1.3. Fasi di crescita e ciclo cellulare di *S.cerevisiae*. A: Curva di crescita di una popolazione di lieviti in funzione del tempo. Nella curva sigmoidea si possono distinguere le tipiche 4 fasi. **B:** Fasi del ciclo cellulare (Fonte: Held P., 2010).

(Alberghina L., 2012). Il ciclo cellulare degli eucarioti è diviso in 4 fasi: G1 (gap 1), S (sintesi di DNA), G2 (gap 2) ed M (mitosi). Durante la fase S avviene la replicazione del DNA mentre le fasi G1 e G2 sono rispettivamente di preparazione alla fase S e di controllo della fase M che rappresenta il momento di divisione cellulare vero e proprio (fig. 1.3B). Nel lievito la fase G1 è uguale a quella degli eucarioti superiori, tranne per la formazione del fuso mitotico che inizia ad avvenire già durante la fase S; nel lievito infatti, non esiste una vera e propria fase G2. Inoltre la membrana nucleare non si disgrega ma rimane intatta durante tutte le fasi (Gershon H. e Gershon D., 2000). In fase G1 la cellula inizia la replicazione di tutti gli organelli e apparati necessari a ripetere il processo, per poi dividerli più o meno equamente e donarli così alla cellula figlia. Oltre a queste fasi nel lievito viene individuata un'ulteriore fase aggiuntiva che precede la fase G1 conosciuta con il nome di Start. Durante la fase Start vengono integrati tutti i segnali provenienti dall'ambiente esterno con quelli interni, (disponibilità di nutrienti, temperatura, presenza di fattori di mating, stato dei macchinari di sintesi proteica e metabolici) ed è proprio in questo momento che la cellula decide se entrare in un nuovo ciclo cellulare, proseguire per vie alternative come sporulazione, coniugazione o entrare in fase stazionaria (Alberghina L., 2012). La futura cellula figlia appare durante la fase G1 come un rigonfiamento sulla superfice della cellula madre detto gemma o bud. La crescita della gemma fornisce un indicatore morfologico della progressione del ciclo cellulare (Hartwell L.H., 1974). Una peculiarità del lievito *S.cerevisiae* è la divisione di tipo asimmetrico (Chen K.C., 2000), infatti la citodieresi dà luogo a una cellula figlia più piccola della cellula madre. Così mentre la cellula madre dopo la divisione va incontro nuovamente a gemmazione, la cellula figlia entra in una fase G1 più estesa, perché deve crescere e raggiungere una adeguata dimensione prima di formare la sua prima gemma. È stato visto che questo processo non è sempre uguale ma cambia in relazione alla fase di crescita in cui si trova l'intera popolazione. In fase logaritmica le divisioni sono più simmetriche e la fase G1 della cellula figlia si accorcia (Chen K.C., 2000). Anche i nutrienti influenzano la simmetria delle divisioni: in terreni poveri di nutrienti la cellula figlia ha dimensioni molto più ridotte rispetto alla cellula madre,

per cui la fase G1 si allunga eccessivamente, mentre in terreni ricchi di nutrienti l'asimmetria si riduce (fig. 1.3B)(Alberghina L., 2012).

1.1.3 La riproduzione del lievito

S. cerevisiae può avere sia un corredo cromosomico aploide che diploide. La grandezza della cellula varia dalla forma diploide a quella aploide e in base alla fase di crescita. Le cellule aploidi sono sferoidi e più piccole e presentano un diametro di circa 4 µm contro i 5x6 µm di una cellula diploide, la quale ha una forma più o meno ellissoidale (Sherman F., 2002). Le cellule possono intraprendere modalità di crescita alternative tutte regolate dalle condizioni nutritive in cui si trovano, eccetto il mating. Se hanno adeguate condizioni nutritive sia le cellule aploidi che le diploidi vanno incontro a crescita vegetativa, quindi a mitosi (Dickinson J.R. e Schweizer M., 2004). La crescita vegetativa (fig. 1.4) avviene per gemmazione: la cellula figlia prende origine da un rigonfiamento (*bud*) della cellula madre, seguita da divisione nucleare, formazione della parete cellulare infine separazione. Ogni cellula madre può formare circa 20-30 *buds,* i quali dopo il distacco della cellula figlia lasciano una cicatrice (*bud-scar*) ben visibile al microscopio confocale. Per cui l'età di una cellula può essere determinata contando il numero di *bud-scar.* (Sherman F., 2002). Anche la riproduzione sessuale è importante nei lieviti; infatti le cellule aploidi possono appartenere a uno delle due tipologie di mating, a or α. Le cellule appartenenti ai due tipi di mating producono ferormoni diversi denominati fattori a e fattore α e presentano sulla superfice cellulare dei recettori per i ferormoni del tipo di mating opposto. Quando i fattori si legano ai recettori presenti sulle cellule di mating opposto, avviene l'arresto in fase G1 del ciclo cellulare e la formazione di

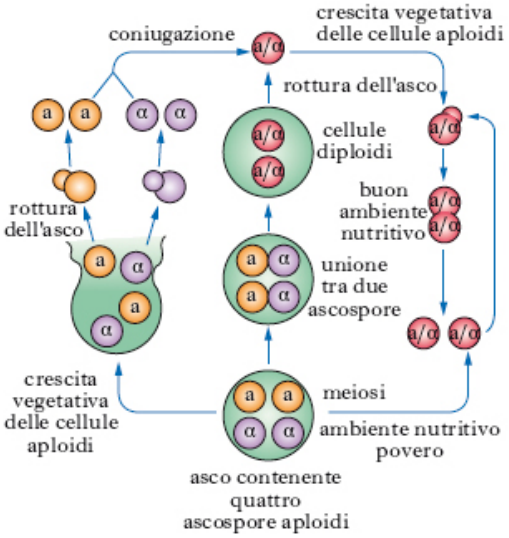


Figura 1.4 Rappresentazione schematica dei due tipi di riproduzione di *S.cerevisiae,* in relazione alle condizioni nutritive in cui si trovano le cellule.

protuberanze che portano alla fusione delle cellule e alla formazione di una cellula diploide. In carenza di nutrienti azotati e di carbonio, le cellule diploidi vanno incontro a meiosi e sporulazione producendo 4 spore (*ascus*). Le spore hanno una grandissima resistenza alle carenze nutritive e a condizioni ambientali avverse, e nel momento in cui si ha un miglioramento ambientale sono capaci di germinare e riprendere il ciclo vitale da aploidi (Dickinson J.R. e Schweizer M., 2004).

1.1.4 Caratteristiche citologiche del lievito

Nonostante il lievito *S.cerevisiae* sia un eucariote unicellulare, esso possiede le stesse strutture cellulari degli eucarioti pluricellulari, ovvero presenta organelli circondati da membrana. La membrana plasmatica protegge la cellula dall'ambiente esterno, mentre la membrana nucleare racchiude il materiale genetico. La membrana interna dei mitocondri è coinvolta nella generazione di energia chimica, mentre quelle dell'apparato di Golgi e del reticolo endoplasmatico presiedono alla sintesi e alle modificazioni post-traduzionali delle proteine. Le membrane dei perossisomi e quelle dei vacuoli svolgono funzioni digestive e di riserva di metaboliti (Van der Rest M.E., 1995). Un'altra caratteristica della cellula del lievito, in comune con gli eucarioti superiori è la presenza del citoscheletro, formato da un network intracellulare di filamenti di actina i quali supportano la cellula dal punto di vista meccanico. Esso inoltre svolge una funzione rilevante nella divisione cellulare in quanto il suo orientamento polare permette la divisione asimmetrica durante la gemmazione (Alberts B., 2008).

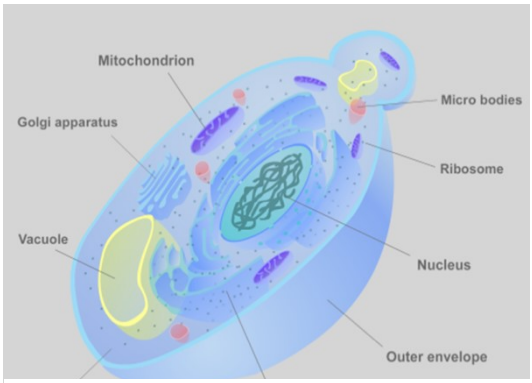


Figura 1.5: Struttura schematica di una cellula di lievito (Biocourseware team TouchApp Ltd 2012).

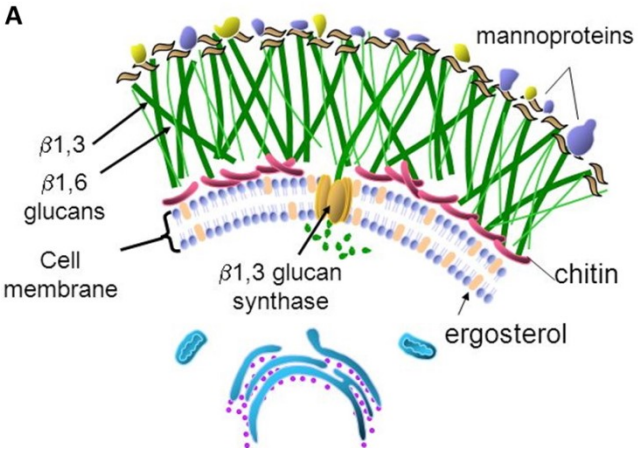
Nonostante la presenza di queste strutture tipiche degli eucarioti, una caratteristica rende le cellule di lievito molto simili ai batteri: si tratta della parete cellulare, che avvolge tutta la cellula aldilà della membrana plasmatica. Essa è composta principalmente da

mannoproteine e glucani e svolge funzione di mantenimento della forma cellulare, di protezione dagli stress termico, meccanico e osmotico che possono derivare dall'ambiente esterno (Cid, V. J., 1995). La parete cellulare è connessa alla membrana plasmatica da catene di glucani e chitina che attraversano lo spazio periplasmatico. La chitina che compone la parete cellulare è una caratteristica del regno dei funghi a differenza del peptidoglicano presente nei batteri.

La membrana plasmatica racchiude tutto l'ambiente cellulare e costituisce una barriera impermeabile per le molecole idrofiliche (aminoacidi, zuccheri, o ioni), il cui ingresso o espulsione è mediato da proteine specializzate che intervengono a secondo delle necessità metaboliche della cellula. Essa è composta da lipidi polari e proteine intrinseche, le quali attraversano completamente il doppio strato fosfolipidico, e proteine estrinseche, le quali sporgono da un solo lato della membrana. Queste proteine sono per lo più trasportatori di zuccheri, aminoacidi e ATPase di membrana (Van der Rest M.E., 1995). Mentre negli eucarioti superiori la fluidità della membrana è assicurata dal colesterolo, nel lievito questa molecola è sostituita dall'ergosterolo (Van der Rest M.E., 1995). Numerose evidenze dimostrano che anche nel lievito la membrana plasmatica varia la sua composizione a seconda delle condizioni ambientali aerobiche o anaerobiche. Quando le cellule si trovano in ambiente anaerobico, essa contiene molti più acidi grassi saturi, meno ergosterolo e squalene. Questa composizione può essere spiegata con l'incapacità della cellula di sintetizzare questi composti senza ossigeno (Ishtar Snoek and Steensma, 2007). Come le piante, le cellule di lievito hanno uno o più vacuoli con funzione di deposito di vari enzimi e aminoacidi utili alla sintesi proteica. Anche i prodotti di scarto derivanti dalla degradazione di metaboliti vengono riversati all'interno del vacuolo.

1.1.5 La parete cellulare del lievito

La parete cellulare del lievito è stata definita da Okada H. (2016) un complesso organello extracellulare, essenziale nella vita della cellula: senza parete il lievito sarebbe incapace di proliferare. È una struttura rigida e molto resistente la cui architettura è stata sin da sempre studiata, poiché capire la sua vera natura e



B

Componente della parete	Percentuale
1,3 β-glucani	50
1,6 β-glucani	10
Mannoproteine	40
Chitina	1-3

Figura 1.6. Struttura schematica della parete cellulare. A: In evidenziala stratificazione delle diverse componenti e l'enzima β glucano-sintase localizzato sulla membrana plasmatica con il compito di assemblare le molecole di glucani (Atlas of fungal infections. Richard Diamonds ED.1999). **B:** Percentuale delle singole componenti della parete calcolate sul peso totale a secco delle cellule.

composizione può essere d'aiuto nel trovare metodologie in grado di distruggerla. Inoltre la parete cellulare costituisce il bersaglio di tante terapie antifungine altamente specifiche in quanto la parete è una struttura assente nelle cellule degli altri eucarioti. Partendo dunque dallo studio della parete di *S. cerevisiae*, è stato possibile comprendere molti aspetti che riguardano la biosintesi e la composizione di essa in altre specie fungine patogene. Tali studi hanno condotto allo sviluppo di antibiotici antimicotici specifici e con vari meccanismi d'azione.

La rigidità della parete cellulare costituisce una barriera resistente all'ambiente extracellulare. Essa assicura il mantenimento del giusto turgore cellulare impedendo lo stress di tipo osmotico, definisce la forma cellulare e costituisce la sede di glicoproteine recettoriali che mediano l'adesione e il riconoscimento con altre cellule e con i ferormoni secreti dalle cellule stesse. (Klis F.M., 2006; Cid, V. J., 1995). La parete cellulare è composta da quattro componenti principali, polisaccaridi β1,3-glucani, β1,6-glucani, chitina e varie mannoproteine (Orlean P., 2012). Esistono di due tipi di mannoproteine: le GPI-CPW (glycosylphosphatidylinositol cell wall proteins) legate covalentemente ai glucani e le Pir-CWP le quali presentano ripetizioni di piccole sequenze aminoacidiche interne. La composizione della parete cellulare dipende molto dalle condizioni ambientali, dai fattori di stress quali temperatura, agenti tossici e dalla presenza di ferormoni (KlisF.M., 1994; Cid V.J., 1995).

In *S.cerevisiae* la parete cellulare costituisce circa il 30% del peso asciutto della cellula e il tra il 20 e il 50% del volume, come indicano calcoli effettuati grazie alla microscopia elettronica. (Orlean, P., 1997). Essa si presenta stratificata (fig. 1.6), con uno strato più interno trasparente di circa 70-100 nm il cui spessore varia in base a condizioni di crescita o genetiche e uno strato esterno più denso agli elettroni di circa 60-100 nm (Cappellaro C., 1994; Osumi M., 1998).

La resistenza della parete cellulare è dovuta principalmente allo strato interno formato da β1,3-glucani e chitina, che rappresentano circa il 50-60%. Lo strato più esterno è composto da mannoproteine altamente glicosilate che sporgono sulla superfice cellulare coinvolte nel meccanismo di riconoscimento cellula-cellula e nella difesa da eventuali enzimi estranei che potrebbero degradare lo strato più interno, come ad esempio, alcuni enzimi dei tessuti delle piante. L'estremità delle proteine legate alle catene di carboidrati hanno molti ponti fosfodiesterici che conferiscono carica negativa alla superfice cellulare a pH fisiologici (Jigami Y., 1999). Tali cariche sono responsabili dell'idrofilicità della parete cellulare e potrebbero essere coinvolte nell'accumulo di acqua per contrastare i periodi di siccità.

La parete cellulare è altamente elastica, in quanto le cellule, immerse in una soluzione ipertonica si raggrinziscono e possono perdere fino al 60% del volume iniziale. Questo processo è reversibile, infatti quando le cellule si riportano nel terreno di partenza esse riassumono il volume iniziale. L'elasticità è dovuta principalmente alle proprietà dei β1,3-glucani.

I glucani costituiscono il 30-60% del peso secco della parete cellulare e possono essere classificati in base al legame β1,3 e β1,6 che ne conferisce la solubilità in solventi diversi. La frazione presente con una percentuale maggiore (35%), insolubile in acidi o solventi alcalini è costituita da polimeri di circa 1500 unità di glucosio legati da legame β1,3. Questi polimeri presentano qualche ramificazione costituita da catene laterali di β1,3-glucani connesse al glucosio del polimero principale da legame β1,6. L'estremità non riducente di questi polimeri è connessa alla chitina che le rende insolubili. Una seconda frazione (20%) è composta da polimeri con la stessa struttura descritta ma risulta solubile in solventi alcalini in quanto non contiene molecole di chitina. Una terza frazione (5%) può essere

estratta dalla frazione alcalino-insolubile mediante acidi, o mediante la digestione con endo- β1,6-glucanase. Questa frazione è costituita da polimeri di circa 140 residui di glucosio legati tra di loro da legami glicosidici β1,6. Sono polimeri altamente ramificati e hanno in ruolo di connettere le proteine della parete cellulare ai β1,3-glucani.

La chitina rappresenta solo l'1-3% del peso secco della parete cellulare del lievito wild type in condizioni fisiologiche, ed è costituita dall'insieme di polimeri di circa 110 residui di β1,4-N-acetilglucosammina (Kang M.S., 1984). Normalmente la maggior parte di chitina è depositata nel setto di divisione primario, cioè nella strozzatura che si trova tra la cellula madre e la gemma nascente, mentre un sottile strato si ritrova nella parete laterale. Questo polimero si può trovare in tre forme: chitina libera, chitina legata ai β1,3-glucani nel setto di divisione o legata ai β1,6-glucani a loro volta legati ai mannani e ai β1,3-glucani (Cabib E. e Duran A., 2005; Cabib E., 2009). La quantità di chitina aumenta in risposta al legame dei ferormoni o in seguito a stress. In quest'ultimo caso si localizza lungo le pareti laterali e può raggiungere il 20% in peso di tutta la parete cellulare (Kapteyn J.C., 1999; Popolo L., 1997).

Le mannoproteine che formano lo strato esterno della parete sono altamente glicosilate con una percentuale di carboidrati che supera il 90%. Si distinguono in proteine proprie della parete e proteine legate temporaneamente (Mrsa V., 1997).

Lo strato di proteine esterno è meno permeabile alle macromolecole dello strato fibrillare costituito da glucani, effetto dovuto alla presenza di catene laterali lunghe e altamemente carbonilate, legate ai residui di asparagina e alla presenza di ponti disolfuro. Ci sono due classi di proteine legate covalentemente alla parete cellulare: GPI-CWP e Pir-CWP.

Le GPI-CWP sono legate indirettamente ai β1,3-glucani mediante il legame con un β1,6-glucano, il quale poi si aggancia al network dei β1,3-glucani. In *S.cerevisiae* sono presenti circa 70 proteine GPI, di cui 40 si legano alla membrana plasmatica e le rimanenti si legano alla parete cellulare. Esse presentano ripetizioni di regioni ricche in serine e treonine che sono aminoacidi disponibili per la O ed N glicosilazione (Caro L.H., 1997).

Le Pir-CWP sono legate direttamente ai β1,3 glucani. In *S.cerevisiae* sono state individuate quattro famiglie di tali proteine organizzate in modo simile. Esse presentano una sequenza costituita da un peptide segnale all'N-terminale, da un sito per Kex2 (serina-proteasi responsabile dell'attivazione del pathway di secrezione), e da una sequenza ripetuta fino a 11 volte con 4 residui di cisteine in posizione conservata.

Le proteine della parete svolgono diverse funzioni, alcune delle quali ancora oggi non sono state chiarite. Alcune proteine sono coinvolte nell'adesione cellula-cellula durante l'agglutinazione sessuale o durante la flocculazione. Altre invece presentano funzione enzimatica.

La parete cellulare non è un entità statica ma va incontro a rimodellamento nel corso del ciclo cellulare. Quando una cellula madre inizia a gemmare, vengono innescate una serie di reazioni che portano alla degradazione della parete nel punto in cui deve formarsi il setto di divisione. La crescita della massa cellulare invece richiede un insieme di enzimi che hanno il compito di assemblare le varie componenti. Mentre la sintesi di chitina e di β1,3-glucani avviene sulla membrana plasmatica grazie alle chitin-sintase attive nelle vicinanze del setto di divisione, il legame dei β1,6-glucani con le proteine GPI avviene al di fuori di essa ad opera di enzimi chiamati transglicosilasi (Orlean P., 2012).

La sintesi dei β1,3-glucani, invece, avviene ad opera dell'enzima multimerico 1,3-β-glucano-sintase, localizzato nel sito di crescita polarizzata sulla membrana plasmatica delle cellule madri (Utsugi T., 2002).

Le mannoproteine sono sintetizzate nel lume del reticolo endoplasmatico e modificate con i glucani attraverso legame N-glicosidico. Questi glucani vengono poi allungati nell'apparato di Golgi per formare il core di 10-14 mannani o le catene laterali che possono avere fino a 200 residui (Jigami Y., 2008). Alcune mannoproteine vanno incontro a O-glicosilazione nel ER, processo con cui vengono aggiunti allo scaffold proteico fino a 5 oligosaccaridi lineari di mannosio sui residui di serina o treonina. I geni che codificano per tutte le proteine coinvolte in questi processi sono circa 180.

Diversi esperimenti di sopravvivenza di mutanti ottenuti per delezione hanno rivelato che quasi un quarto dei geni di *S.cerevisiae* causa anomalie alla parete

cellulare (de Groot P.W., 2001). Tali anomalie sono state analizzate mediante l'osservazione della resistenza o sensibilità a diversi composti che ne alterano la composizione come caffeina, Zymolyase, SDS, calcofluoro e Congo red. In questo modo sono state individuate le vie di trasduzione del segnale che assicurano l'integrità della parete cellulare (*cell wall integrity signal transduction*) e che portano alla modificazione della parete in seguito a stress di tipo ambientale come elevate temperature, legame di ferormoni, shock osmotico, agenti chimici pressione di turgore o stress provenienti dal reticolo endoplasmatico (fig.1.7). Le vie coinvolte, vengono innescate da segnali provenienti dalla parete cellulare, con conseguente attivazione della cascata delle MAP kinasi (Slt2) che regolano il rimodellamento della parete cellulare (Levin D.E., 2011).

Un'altra via di trasduzione del segnale è quella che si innesca in risposta all'alta osmolarità da glicerolo (HOG pathway), la quale è coinvolta pure nella risposta al danno della parete causato dalla digestione dei β1,3-glucani ad opera dell'enzima Zymolyase. (Bermejo C., 2008).

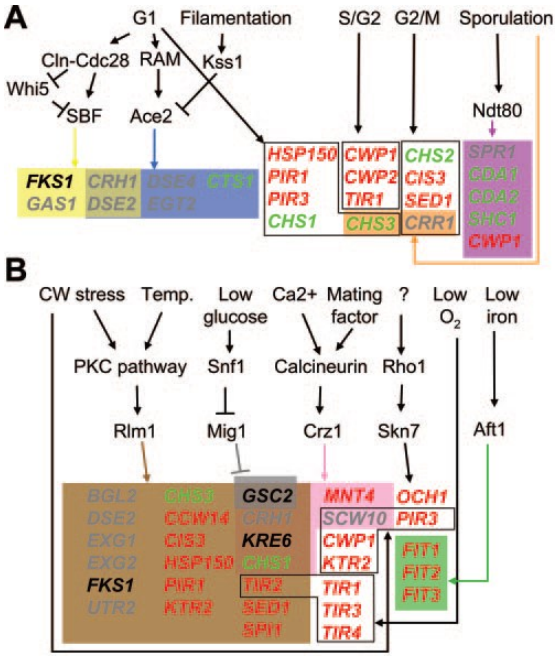


Figura 1.7: Regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi della parete cellulare durante il ciclo cellulare (A) in seguito a stimoli esterni (B). i riquadri contengono i geni che sono controllati dallo stesso fattore di trascrizione o dalla stessa via metabolica. In nero i geni coinvolti nella sintesi di glucani, in verde quelli coinvolti nella sintesi di chitina, in rosso i geni per la sintesi si mannoproteine e in grigio i geni che mediano il rimodellamento (Fonte: Lesage G. e Bussey H., 2006)

1.2 Il mitocondrio e la respirazione ossidativa

Il mitocondrio è l'organello che più di tutti ha permesso l'evoluzione di forme di vita complesse sulla Terra, in quanto essendo presente in tutti gli eucarioti, provvede a rifornire di energia chimica la cellula. I mitocondri sono formati da un sistema complesso di doppie membrane la cui origine si fa risalire a qualche proteobatterio inglobato in una cellula più grande, circa 1.5 miliardi di anni fa. Questa ipotesi, conosciuta con il nome di Teoria Endosimbiontica (Dyall S.D., 2004; Lynn M., 2004) è confermata dalla presenza del genoma mitocondriale (mtDNA) il quale presenta alcune caratteristiche strutturali e funzionali analoghe a quelle dei batteri. Sebbene il mtDNA codifichi solo per alcune subunità dei complessi della

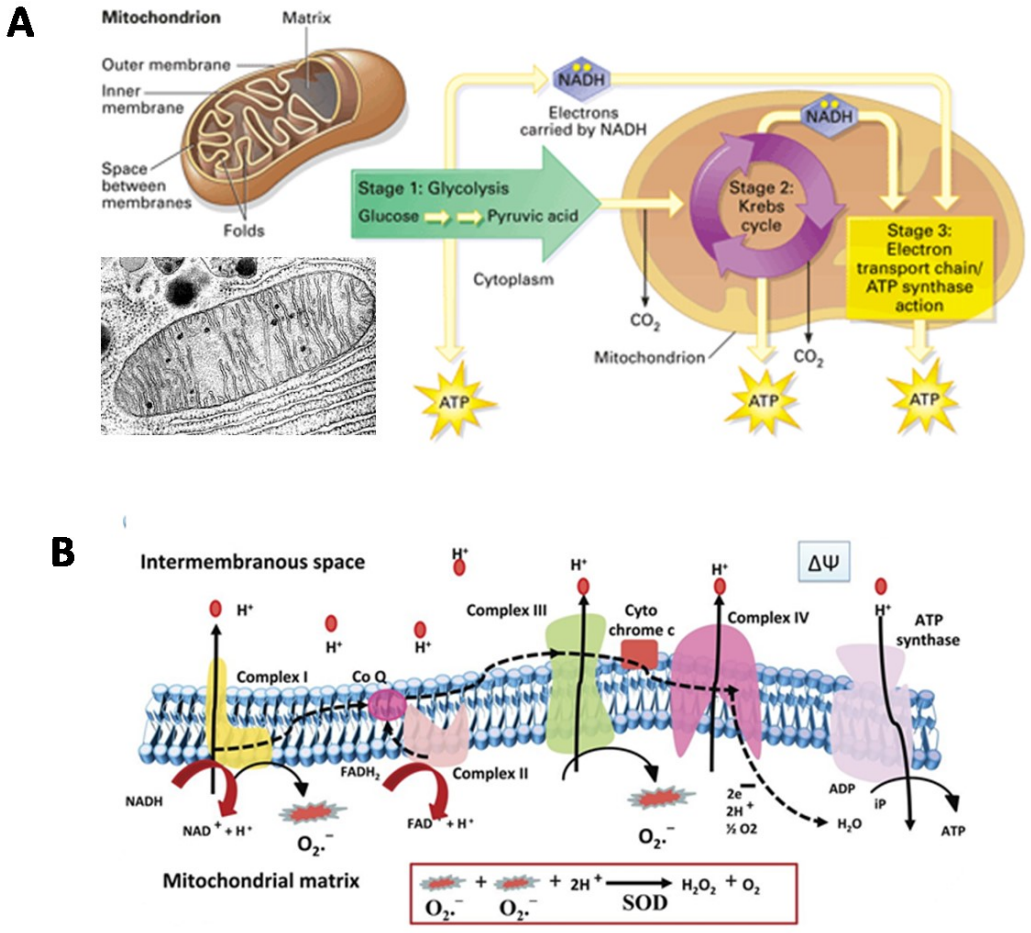


Figura 1.8. Rappresentazione della struttura dei mitocondri e delle reazioni che avvengono al suo interno. A: il mitocondrio, delimitato da due sistemi di membrana, è sede del ciclo di Krebs che avviene nella matrice e della fosforilazione ossidativa sulla membrana interna. Fotografia di un mitocondrio al microscospio elettronico (in alto a sinistra). **B:** Enzimi della catena di respirazione sulla membrana interna. In evidenza i passaggi di protoni da un lato all'altro della membrana e l'attività della proteina SOD2, che dismuta l'eventuale anione superossido prodotto e riversato nella matrice mitocondriale.

catena respiratoria (ancora non è noto il meccanismo di trasferimento degli altri geni al nucleo) gli eucarioti hanno sviluppato una seria di canali e trasportatori utili per importare le proteine trascritte nel citosol all'interno dei mitocondri. Alcuni di essi sono i complessi TIM (trasportatore della membrana interna), TOM (trasportatore della membrana esterna) e vari chaperon mitocondriali (HSP60 e MTHSP70) (Mokranjac D. e Neupert W., 2005). Il mitocondrio è caratterizzato da membrane che delimitano due compartimenti diversi: la matrice, racchiusa dalla membrana interna (IMM), altamente selettiva e invaginata a formare creste, e lo spazio intermembrana (IMS), che si estende oltre la IMM, è delimitato dalla membrana esterna (OMM) la quale è permeabile a molecole fino a 5 KDa.

Come già detto il mitocondrio è la sede della produzione della maggior parte di ATP. Quando una molecola di glucosio viene convertita in piruvato mediante la glicolisi, si ottiene una piccola quantità di molecole di ATP. Il mitocondrio invece è in grado di rilasciare tutta l'energia contenuta nel piruvato mediante il ciclo di Krebs o degli acidi tricarbossilici e la fosforilazione ossidativa. Oltre al piruvato, anche gli acidi grassi vengono trasformati in acetil CoA all'interno del mitocondrio (attraverso la β-ossidazione) per poi entrare nel ciclo di Krebs ed essere degradati completamente a CO_2. Durante questa degradazione vengono prodotti NADH e $FADH_2$ che forniscono equivalenti riducenti alla catena di trasporto degli elettroni. Essa è formata da 5 complessi:

- complesso I: NADH deidrogenasi
- complesso II: succinato deidrogenasi
- complesso III: citocromo c reduttasi
- complesso IV: citocromo c ossidase
- complesso V: AYP sintetase.

Man mano che gli elettroni si spostano da un complesso all'altro, l'energia viene immagazzinata sottoforma di gradiente elettrochimico di ioni H+ attraverso la membrana interna dando luogo a un potenziale di membrana negativo (intorno a 180 mV). Questi ioni H+ vengono forzati a rientrare nella matrice passando dal complesso V, che accoppia la forza proton motrice alla fosforilazione di ADP ad ATP. L'ATP viene rilasciato nello IMS attraverso il traslocatore dei nucleotidi adeninici (ANT) il quale scambia molecole di ATP con ADP da far rientrare nella

matrice per rifornire nuovamente l'ATP sintetasi. Dallo spazio intermembrana, poi, l'ATP esce dal mitocondrio attraverso il VDAC1 ed è così disponibile nel citosol per essere utilizzato in altre reazioni che richiedono energia chimica.

1.2.1 Le proteine VDAC

La famiglia VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) conosciuta anche con il nome di porine mitocondriali rappresentano le proteine più abbondanti della membrana mitocondriale esterna, dove svolgono un ruolo rilevante in vari processi cellulari, nella regolazione del metabolismo e nella morte cellulare. Esse mediano lo scambio di ioni e metaboliti tra citosol e mitocondrio assicurando una buona funzionalità dei complessi mitocondriali e la produzione di energia. Scoperte nel 1974 in *Paramecium tetraurelia* (Schein S.J., 1976) si pensa che si siano evolute direttamente dalle porine OmpF della membrana dei batteri Gram–Negativi. Nonostante le sequenze geniche delle porine batteriche e di quelle eucariotiche condividano una similarità di circa il 13 %, esse hanno una struttura

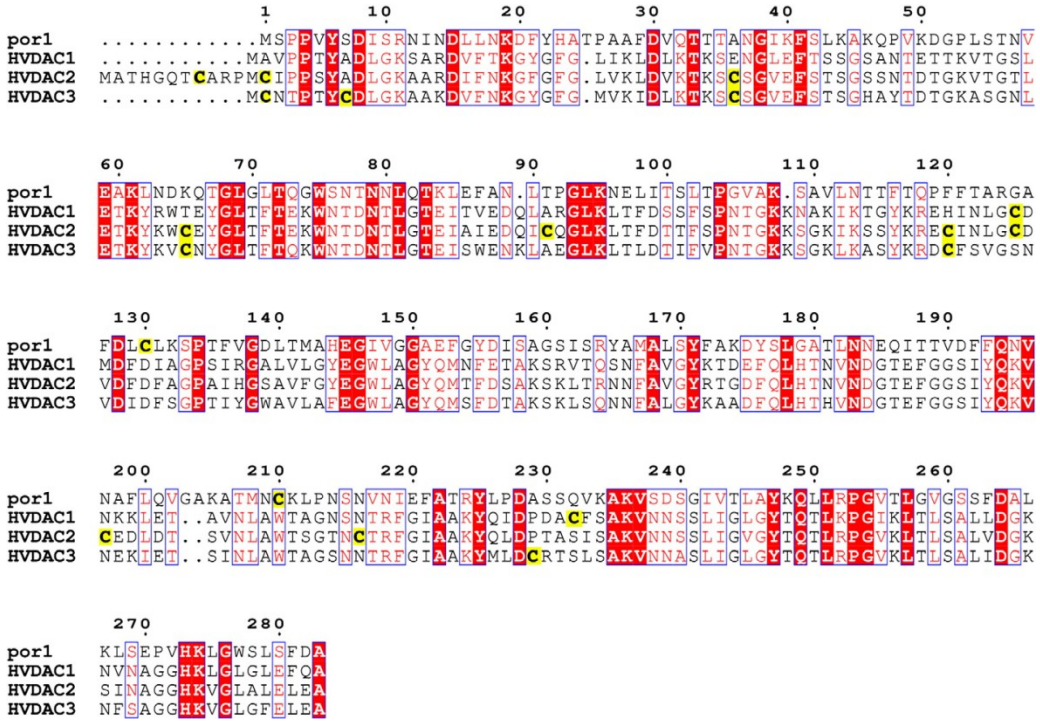


Figura 1.9. Multiallineamento delle sequenze amminoacidiche di VDAC1 di lievito (por1) e le tre isoforme umane. In giallo sono evidenziati i residui di cisteina, in rosso gli amminoacidi identici (Fonte: Messina A., 2012).

secondaria ben conservata. Le subunità di OmpF (che si assemblano a formare un trimero) hanno una struttura β-barrel di16 β-strands con aminoacidi idrofobici a contatto con la membrana e aminoacidi idrofilici che sporgono verso il poro acquoso. Le similarità vanno oltre la struttura in quanto caratterizzazioni elettrofisiologiche su membrane artificiali di tali porine, hanno dimostrato che sono in grado di modulare la loro apertura e chiusura, mostrando una voltaggio dipendenza simile a quella delle porine degli eucarioti (Delcour A.H., 1989). Nei mammiferi le proteine VDAC presentano struttura β-barrel di 19 β-strands composta da 280 aminoacidi con un peso molecolare di 28–32 kDa circa. Esse sono caratterizzate da una leggera selettività per gli anioni e presentano una conduttanza ionica di circa 4nS. I mammiferi hanno tre geni codificanti altrettante isoforme diverse chiamate VDAC1, VDAC2 and VDAC3, le quali vengono espresse in modo tessuto-specifico: VDAC3 è espresso maggiormente nella corteccia celebrale, fegato, cuore, testicoli e spermatozoi (Messina A., 2012). L'espressione di tali isoforme è stata quantificata nelle cellule Hela mediante PCR-Real Time e dai risultati è emerso che VDAC1 è la più abbondante essendo 10 volte più espressa di VDAC2 e 100 volte più espressa di VDAC3 (De Pinto V., 2010). Le tre isoforme, bensì abbiano una struttura conservata in cui solo VDAC2 si differenzia per un allungamento di 11 aminoacidi all'estremità N-terminale (fig. 1.9), hanno caratteristiche elettrofisiologiche diverse. Studi di ricostituzione su membrane artificiali effettuati su proteine ricombinanti hanno dimostrato che mentre VDAC1 e VDAC2 sono in grado di formare canali, VDAC3 presenta una conduttanza ridotta (Checchetto V., 2014).

1.2.2 VDAC1 negli eucarioti: dal lievito all'uomo

L'isoforma 1 umana è la più abbondante e di conseguenza la più studiata tra le tre isoforme. I motivi d'interesse per tale proteina sono molteplici essendo essa coinvolta in una serie di processi vitali per la cellula come il metabolismo energetico, signaling del calcio, e apoptosi.

La struttura tridimensionale della proteina VDAC1 è stata determinata tramite cristallografia da tre gruppi indipententi: essa è costituita da un β-barrel di 19 β-foglietti antiparalleli con un α-elica all'estremità N-terminale che si posiziona

all'interno del poro e ne regola il gating (fig. 1.10) (Bayrhuber M., 2008; Hiller S., 2008; Ujwal R., 2008).

Studi di elettrofisiologia hanno dimostrato che VDAC1 può variare la sua conduttanza a seconda del voltaggio applicato. A bassi valori di voltaggio, compreso tra +10 e -10 mV, la proteina mostra un'elevata conduttanza agli anioni, e si trova in uno stato aperto; quando il voltaggio raggiunge valori più elevati, superiori a ±30 mV, la proteina assume una conformazione chiusa a conduttanza più bassa e si presenta leggermente catione selettiva (De Pinto V., 1987; Benz R., 1994).

Oltre a mediare il traffico di metaboliti tra citosol e mitocondrio, VDAC1 è coinvolto nell'apoptosi e la sua funzione pro-apoptotica è stata ampiamente provata (Colombini M., 1996; Mannella C., 1997). Inoltre, molte proteine, come l'esochinasi, la glicerolo chinasi o la creatina chinasi legano il VDAC1, sfruttando

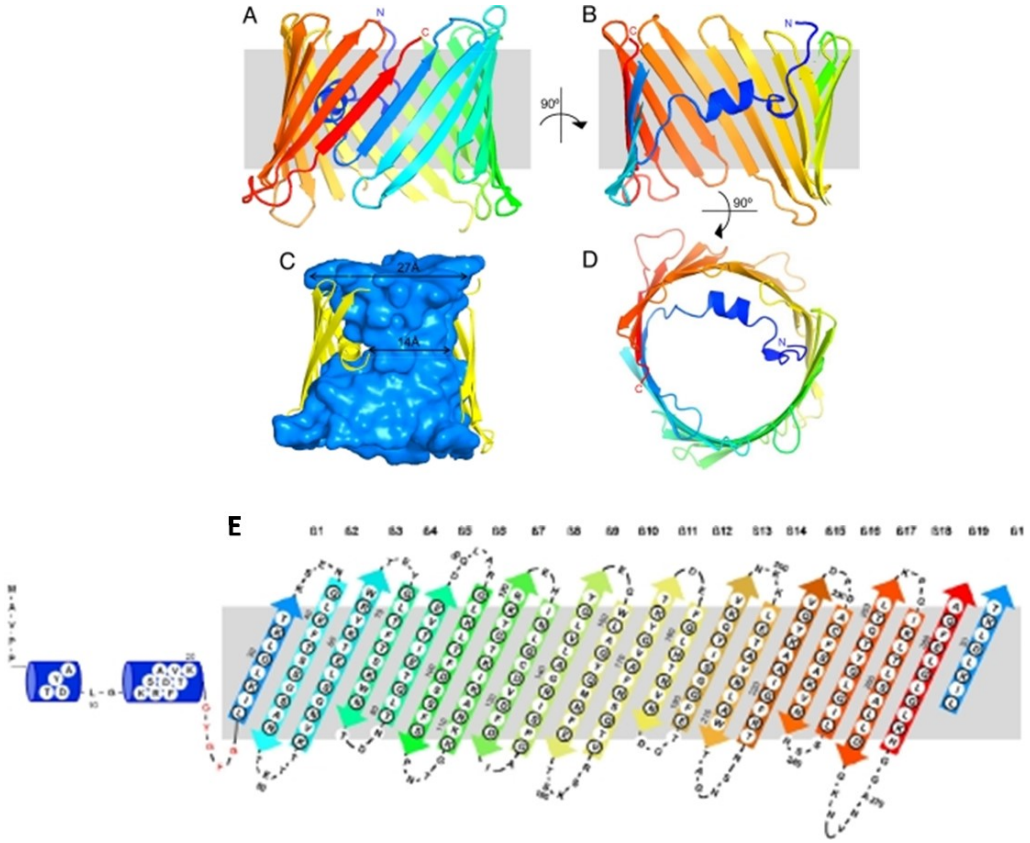


Figura 1.10. Struttura di VDAC1 murino. La struttura tridimensionale (in alto) e quella secondaria (in basso) sono colorate dall'N-terminale in blu, al C-terminale in rosso. **A** e **B:** Vista parallela alla membrana mitocondriale esterna. **C**: Ricostruzione della parete interna del canale. **D**: vista perpendicolare alla membrana. **E**: Struttura secondaria in cui le frecce rappresentano i β-barrel, i cilindri rappresentano le α-eliche.(Fonte: Ujwal R., 2008).

l'istantanea disponibilità di ATP che passa attraverso il VDAC (Abu-Hamad S., 2008).

Gli studi filogenetici hanno dimostrato un alto grado di conservazione delle porine mitocondriali nel corso dell'evoluzione (fig. 1.9). *S.cerevisiae* possiede due geni *por1* e *por2* codificanti due isoforme di VDAC. Come nei mammiferi, yVDAC1 rappresenta la forma più abbondante. È stato visto che tra le due proteine vi è un grado di omologia di sequenza di circa il 70% ed inoltre yVDAC1 è in grado di formare canali in vitro, proprio come l'omologo canale umano. La seconda isoforma codificata dal gene *por2* è la meno conosciuta. La sua scarsa presenza sulla OMM rende difficile l'estrazione e l'isolamento a partire dai mitocondri di lievito. Per cui non è mai stata dimostrata la sua attività come canale o la sua funzione all'interno della cellula. La funzione della proteina VDAC1 è da sempre stata studiata nel lievito mediante la delezione del gene codificante la prima

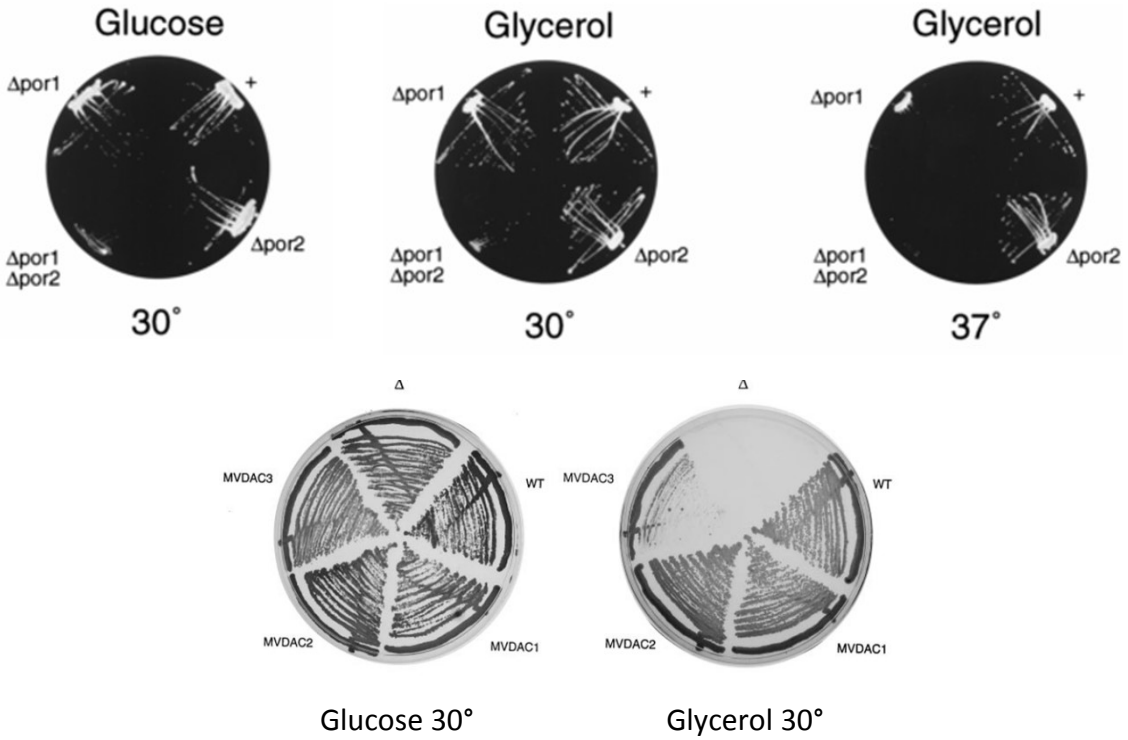


Figura 1.11: Saggi di complementazione su glucosio e glicerolo dei ceppi di *S.cerevisiae* mutanti deleti delle porine mitocondriali. Sopra: La delezioe del gene *por1* (Δ*por1*) dà luogo a un ceppo che riesce a crescere su glucosio, ma non su glicerolo. La sola presenza di *por2* non complementa il difetto di crescita. L'assenza del gene *por2* (Δ*por2*), non causa nessun problema di crescita, al contrario del ceppo deleto di entrambe le porine (Δ*por1/*Δ*por2*), il quale presenta un fenotipo con maggiori difficoltà di crescita (Fonte: Blachly-Dyson E., 1997). Sotto: Saggi di complementazione del ceppo Δpor1 trasformato con VDAC1 murino. (MVDAC1). La proteina del topo complementa il difetto di Δ*por1* al pari del ceppo wild type (Michejda J., 1990)

isoforma (ceppo Δ*por*1). Questo ceppo rappresenta un ottimo modello anche per lo studio di proteine di altri organismi in quanto è caratterizzato da un particolare fenotipo di crescita (fig. 1.11): su fonti di carbonio non fermentabili, mostra enormi difficoltà di crescita, dovute probabilmente a un mitocondrio non perfettamente funzionante perché privo della sua permeabilità ai substrati necessari per un corretto metabolismo respirativo.

La stessa difficoltà di crescita, si riscontra nel ceppo deleto di entrambe le isoforme (ceppo Δ*por1*/Δ*por2*), ma non in quello deleto esclusivamente del gene *por2* (ceppo Δ*por2*). Ciò suggerisce chiaramente che yVDAC2, non ha la capacità di sostituire yVDAC1 (Blachly-Dyson E., 1997). Al contrario del glicerolo, il glucosio è una fonte di carbonio fermentabile, che per essere degradata necessita di glicolisi o fermentazione, motivo per cui la mancanza di VDAC1 non causa difetti della crescita su tale fonte.

Questi ceppi sono stati ampiamente utilizzati per lo studio della funzionalità delle proteine VDAC appartenenti a diversi organismi. In fig. 1.11, è possibile notare il primo saggio di complementazione di Δ*por1* trasformato con la porina mitocondriale del topo (Michejda J., 1990,) in cui è evidente che la proteina esogena è in grado di sostituire il VDAC1 del lievito facendo crescere le cellule su glicerolo.

1.3 La famiglia delle Superossido Dismutasi

Le Superossido dismutasi appartengono ad una famiglia di proteine enzimatiche antiossidanti, coinvolte nella detossificazione della cellula dall'anione superossido, uno dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Sono proteine altamente conservate nel corso dell'evoluzione, le si ritrovano sia nei procarioti che negli eucarioti. Il motivo di tale conservazione è da attribuire alla funzione che la stessa SOD svolge, ovvero quella di dismutazione dell'anione superossido. Tale anione viene prodotto fisiologicamente a livello della catena di trasporto degli elettroni dei mitocondri a partire dall'ossigeno molecolare che anziché essere ridotto con 2 elettroni ad acqua, viene ridotto con un solo elettrone. Non a caso la comparsa di questa famiglia di proteine si fa risalire a circa 2 miliardi di anni fa con la proliferazione di organismi fotosintetici produttori di ossigeno, i quali ebbero la necessità di sviluppare sistemi che difendessero la cellula dai ROS. In questi procarioti si svilupparono 2 differenti forme di SOD che si distinguono per il metallo presente nel loro sito catalitico: SOD rame-zinco e SOD ferro-manganese.

Le proteine SOD furono isolate per la prima volta da Mann e Keilin nel 1938 dagli eritrociti bovini e per il colore blu della massa proteica dovuto alla presenza di rame gli fu dato il nome di emocupreina. La proteina umana fu isolata nel 1950, ma solo nel 1969, McCord e Fridovich scoprirono la sua attività di dismutazione dell'anione superossido (McCord J.M. e Fridovich I., 1969).

Successivamente, grazie a studi di cristallografia condotti a partire dagli anni '80 sono state definite le strutture della SOD1 di diversi organismi, le quali hanno evidenziato l'alto tasso di conservazione dell'enzima nel corso dell'evoluzione degli eucarioti. Tale conservazione dunque si riscontra sia a livello funzionale che a livello strutturale dalla struttura primaria a quella quaternaria.

La reazione catalizzata dalla Cu,Zn SOD è una dismutazione che segue una cinetica di secondo ordine (Brunori M. e Rotilio G., 1984).

$$\text{Enzima ox} + \bullet O_2^- \rightarrow \text{Enzima red} + O_2$$

$$\text{Enzima red} + \bullet O_2^- + 2H^+ \rightarrow \text{Enzima ox} + H_2O_2$$

Durante la reazione catalitica della Cu,Zn SOD lo ione Cu2+ è ciclicamente ridotto ed ossidato mediante successive interazioni con il substrato superossido nel sito attivo. In una prima fase, un elettrone dello ione superossido radicalico viene donato al centro catalitico con formazione di ossigeno molecolare e Cu+ che, a sua volta, dona un elettrone ad un secondo anione superossido; quest'ultimo unendosi a due protoni, genera perossido di idrogeno. Apparentemente l'enzima reagisce con l'anione superossido con un meccanismo che prevede l'utilizzo solo di metà sito catalitico, nel quale l'attività di dismutazione è svolta principalmente dall'atomo di Cu2+; la rimozione dell'atomo di Zn2+ però diminuisce il potenziale redox del Cu2+ riducendo le capacità catalitiche dell'enzima.

1.3.1 Evoluzione delle forme di SOD

Si ritiene che la comparsa della SOD sia stata contemporanea alla proliferazione degli organismi fotosintetici, i quali cominciarono a produrre ossigeno circa due miliardi di anni fa. Contemporaneamente allo sviluppo di un metabolismo di tipo aerobio le cellule evolsero un meccanismo per neutralizzare gli effetti tossici dei sottoprodotti derivanti dal suo utilizzo.

Lo studio delle omologie strutturali e delle sequenze amminoacidiche ha permesso di determinare l'esistenza di due principali famiglie di superossido dismutasi apparse nei procarioti nel medesimo periodo: le proteine SOD contenenti Cu,Zn e quelle contenenti Fe, Mn o Ni. Nonostante entrambe le classi svolgano la stessa funzione, le grandi differenze tra le strutture cristalline, la presenza di diversi

Table 1. Characteristics of four distinct superoxide dismutases

Isoform	Metal cofactor	Protein structure	Cellular localization
FeSOD	Fe^{2+}	Homodimer	Prokaryotes, chloroplast in plants, some parasitic protists
NiSOD	Ni^{2+}	Homohexamer	Actinomycetes, cyanobacteria
Cu/ZnSOD	Cu^{2+} for catalytic activity, Zn^{2+} for enzymatic stability	Monomer/Dimer	Periplasm in Gram-negative bacteria
		Homodimer	Cytoplasm, nucleus, mitochondrial intermembrane space in eukaryotes, chloroplast, peroxisome in plants
		Homotetrameric glycoprotein	Extracellular fluids of higher eukaryotes
MnSOD	Mn^{2+}	Homotetramer	Mitochondrial matrix in eukaryotes
		Homodimer	Aerobic bacteria, cytoplasm of some fungi

Figura 1.12. Forme esistenti di Superossido Dismutasi. La tabella descrive le diverse forme di SOD negli organismi viventi evidenziando il cofattore metallico, la struttura e la localizzazione cellulare (Fonte: Woo-Hyun Chung 2017).

cofattori metallici e i diversi meccanismi catalitici rendono difficile ipotizzare un antenato comune. La ricostruzione della storia evolutiva della Cu,Zn SOD, ricavata da allineamenti multipli di sequenze, mostra come la SOD extracellulare si sia diversificata da quella citoplasmatica nei primi stadi dell'evoluzione, prima della differenziazione di funghi, piante e metazoi.

Si pensa che le forme di vita più primitive avessero l'enzima FeSOD, in accordo con la presenza di un'atmosfera altamente riducente. Questa forma si ritrova ancora in alcuni batteri patogeni come *Helicobacter pylori*, nei protisti come i tripanosomi, e nei cloroplasti delle piante (Miller A.F., 2012). MnSOD è la forma più moderna che ha soppiantato FeSOD in alcuni batteri dato che il Fe è tossico e molto meno disponibile negli ambienti più ossidati. Anche se i cloroplasti contengono FeSOD, le piante nei loro mitocondri hanno MnSOD come gli animali, per proteggere le cellule dai prodotti tossici della catena respiratoria, principale sorgente di ROS intracellulari. La NiSOD è una forma meno comune che si ritrova nei cianobatteri e negli actinomiceti e presenta una struttura esamerica (Schmidt A., 2009).

La forma Cu/ZnSOD è la più abbondante nel citoplasma degli eucarioti superiori con struttura omodimerica, e con localizzazione extracellulare in forma tetramerica. Anche se FeSOD e MnSOD sembrano avere struttura e funzione simile, sembra che nel corso dell'evoluzione ci sia stato un passaggio dall'utilizzazione del ferro a quello del manganese nel sito attivo man mano che ci si avvicina agli eucarioti. Nonostante ciò rimane ancora da chiarire per quale motivo si sia affermata la forma Cu-Zn.

1.3.2 Le proteine SOD negli eucarioti

1.3.2.1 Isoforme nell'uomo

Nell'uomo, così come nella grandissima parte degli eucarioti superiori, sono presenti tre isoforme che si distinguono per localizzazione cellulare e per i cofattori metallici legati al sito attivo della proteina. La prima isoforma SOD1 (CuZn-SOD) ha struttura omodimerica con rame e zinco nel sito attivo ed è stata ritrovata nel citosol, nel nucleo, nei lisosomi e nello spazio intermembrana dei

mitocondri. SOD3 (EC-SOD) è l'isoforma meno conosciuta a localizzazione extracellulare; utilizza come la prima isoforma rame e zinco come cofattori ma possiede una struttura tetramerica di 135 KDa e un'alta affinità per l'eparina. La sua espressione è limitata a determinati tipi cellulari; è stata infatti isolata dal plasma, dalla linfa e dal liquido cerebrospinale (Marklund S.L., 1982). SOD2 (Mn-SOD) è l'isoforma esclusivamente mitocondriale e a differenza delle prime due possiede un atomo di manganese nel sito attivo e una struttura tetramerica. Essa svolge un ruolo fondamentale nel differenziamento cellulare e nella tumoregenesi (St. Clair D.K., 1994).

L'isoforma più abbondante è la Cu,ZnSOD o SOD1, localizzata principalmente nel citosol, ma ritrovata anche nei perossisomi, nei lisosomi, nel nucleo e nello spazio intermembrana del mitocondrio. È un enzima di 153 aminoacidi con struttura omodimerica di circa 32 KDa contenente in ogni subunità uno ione Cu^{2+} e uno ione Zn^{2+}. Ogni subunità è organizzata in una struttura a barile appiattito formato da 8 β-foglietti antiparalleli uniti da 7 loop, con topologia a chiave greca. Il dominio più importante per la catalisi è rappresentato da due loops esterni: il loop IV comprende la regione di coordinazione con lo ione Zn^{2+}; il loop VII forma un tunnel elettrostatico attraverso cui l'anione superossido viene guidato verso il sito attivo (fig.1.13). Ciò è possibile grazie alla presenza del residuo Arg143 che è direttamente coinvolto in questo meccanismo e che assicura la specificità per l'anione superossido. Gli ioni Cu e Zn sono legati attraverso interazioni non covalenti. È stato dimostrato che lo zinco svolge funzione strutturale in quanto stabilizza il sito attivo della molecola, mentre lo ione Cu^{2+} ha funzione catalitica. Lo ione Zn^{2+} è legato alla struttura a barile grazie a tre istidine (His 61, His 69, His 79) ed ad un residuo di acido aspartico (Asp 81). Lo ione Cu^{2+} è coordinato alla superficie del barile attraverso gli anelli imidazolici di quattro istidine (His 44, His 46, His 61, His 118) (Tainer J.A., 1982). Per il corretto posizionamento dei cofattori metallici nel sito attivo e per il corretto refolding sono necessarie modificazioni post-traduzionali che richiedono l'intervento di specifici chaperones chiamati CCS (Copper Chaperone of SOD1) (Furukawa Y., 2004).

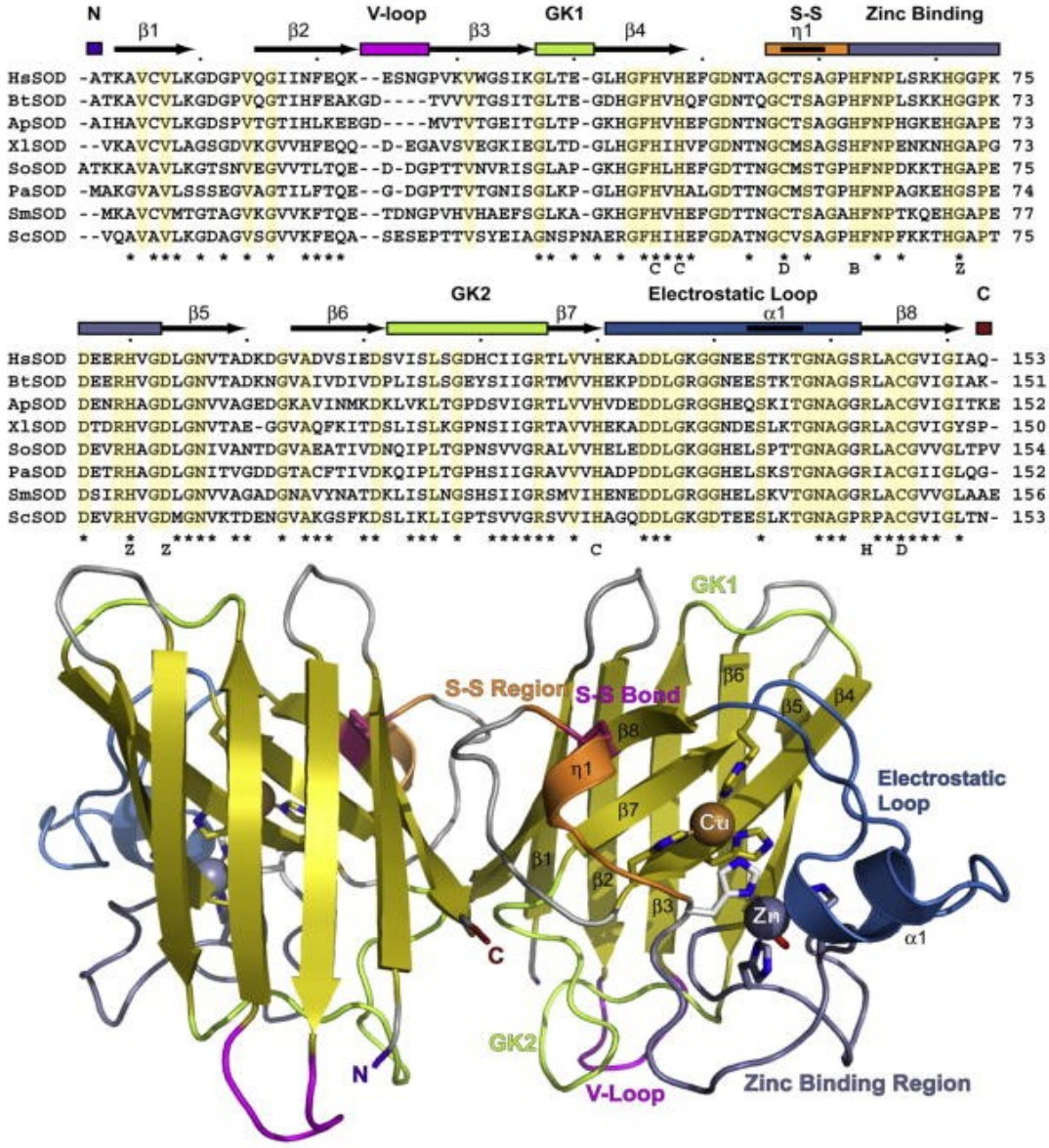


Figura 1.13: Conservazione, struttura e ripiegamento della proteina SOD1.In alto:allineamento delle sequenze aminoacidiche di HsSOD, H. sapiens; BtSOD, B. taurus; ApSOD, A. pompejana; XlSOD, X. laevis; SoSOD, S. oleracea; PaSOD, P. atrosanguina; SmSOD, S. mansoni; Sc, S. cerevisiae. Sopra l'allineamento è mostrata la struttura secondaria in cui le frecce rappresentano i foglietti β, e i cilindri le α-eliche. **In basso:** struttura tridimensionale di SOD1 umana (Fonte: Perry J.J.P.,2010).

1.3.2.2 Isoforme nel lievito

S.cerevisiae possiede due soli geni codificanti due isoforme di SOD. La prima isoforma (Cu-Zn SOD) ha struttura omodimerica ed è localizzata nel citosol. La seconda (MnSOD) possiede struttura omotetramerica ed è localizzata nella matrice mitocondriale (Moradas Ferreira P., 1996). I motivi caratteristici dei differenti tipi

di SOD del lievito e gli aminoacidi coinvolti nel sito attivo e nella coordinazione dei metalli sono conservati (Raimondi S., 2008). Le due isoforme hanno la medesima organizzazione strutturale di quella umana infatti l'allineamento delle sequenze mostra una similarità molto elevata a conferma della loro conservazione nel corso dell'evoluzione. SOD1 umana e quella di lievito condividono il 70% di identità dell'intera sequenza e il 90% di identità di sequenza del sito catalitico. Come per il VDAC, anche per la SOD sono stati effettuati esperimenti di delezione nel lievito *S.cerevisiae* (ceppo Δ*sod1*) ed è stato visto che la SOD1 umana e di altri organismi è in grado di complementare l'assenza della SOD1 endogena.

1.3.3 Altre funzioni delle proteine SOD

La funzione di difesa dai ROS svolta dalla superossido dismutasi, probabilmente è il motivo dell'elevato grado di conservazione nel corso dell'evoluzione degli organismi. Nonostante ciò, numerosi dati di letteratura descrivono funzioni secondarie svolte dalle proteine SOD che esulano dall'azione antiossidante di dismutazione. Queste funzioni aggiuntive riguardano lo sviluppo, il differenziamento cellulare, il metabolismo e la patogenesi, e sono state in gran parte individuate grazie ad esperimenti di delezione e knockout genico. Topi knockout per SOD1 non sono letali, ma presentano una durata della vita ridotta, elevata mutagenesi, alta incidenza di cancro. In questi organismi transgenici è stato descritto un accumulo di mutazioni nel fegato, ma non nel cervello o nella milza (Elchuri S., 2005). Topi knockout per SOD2 non sopravvivono a 1.5 settimane di vita a causa dello sviluppo di cardiomiopatie, e nel caso in cui superano tale periodo, essi presentano danni a livello mitocondriale nei neuroni del sistema nervoso centrale e nei miociti. Questo effetto ha fatto ipotizzare che SOD2 svolge un ruolo essenziale durante lo sviluppo (Lebovitz, R.M., 1996). A dimostrare che le isoforme più abbondanti non sono interscambiabili, vi sono degli esperimenti di overespressione di SOD1 in topi o astrociti il cui genoma è stato deleto dei locus codificanti SOD2. In tali esperimenti è stato visto che l'overespressione di SOD1 non complementa la mancanza di SOD2, indicando l'importanza della presenza dell'enzima specifico nei diversi compartimenti. Ciò perché SOD1 non è in grado di rimuovere l'anione superossido della matrice mitocondriale anche se è stato

ritrovato all'interno dello spazio intermembrana. Oltre che nello sviluppo, le proteine SOD svolgono un ruolo fondamentale nella progressione del cancro. In cellule cancerose l'overespressione di SOD1 sopprime l'attività metastatica (Zhang Y., 2002). Inoltre sono state osservate variazioni nell'espressione genica delle SOD in cellule tumorali e in particolare SOD1 e SOD2 sono risultate essere upregolate nello stadio tardivo di alcuni tumori (Papa L., 2004).

Le cellule di lievito *S.cerevisiae*, sono state utilizzate per lo studio dei meccanismi in cui sono coinvolte le proteine SOD1, perché presentano un metabolismo molto versatile e dei metodi di coltura abbastanza semplici e veloci. Una serie di alterazioni metaboliche non irrilevanti sono state osservate nel ceppo privo della di SOD1 endogena (Δ*sod*1). Il lievito normalmente, avendo glucosio a disposizione utilizza la via fermentativa per la produzione di energia reprimendo la respirazione mitocondriale secondo un meccanismo ben descritto chiamato repressione da catabolita. È stato osservato che il lievito Δ*sod*1 non è in grado di reprimere completamente la respirazione mitocondriale quando cresce su glucosio (Sehati S., 2011). In questo meccanismo la SOD1 svolge un ruolo centrale, in quando è stato dimostrato che interagisce con il C-terminale di due casein kinasi 1-gamma (CK1γ) omologhe, Yck1p and Yck2p, indispensabili per la repressione della respirazione, stabilizzandole e impedendone la degradazione grazie ad un legame alle lisine di questa regione. A questa stabilizzazione contribuisce pure il perossido di idrogeno prodotto dalla stessa SOD1 a partire dall'anione superossido sintetizzato a livello della catena di respirazione. Dunque in assenza di SOD1, le casein-chinasi YCK1 e YCK2 non sono in grado di esplicare fino in fondo la loro funzione, motivo per cui le cellule di lievito crescendo su glucosio, non possono effettuare la repressione della respirazione mitocondriale. Inoltre questa funzione per la SOD1 si estende pure alle casein-chinasi-1-gamma umane, ribadendo la conservazione in struttura e funzione dell'enzima attraverso l'evoluzione (Reddi A.R., 2013). Un altro meccanismo in cui sembra essere coinvolta la SOD1 è l'invecchiamento cellulare. Il ceppo Δ*sod1* presenta una sopravvivenza in fase stazionaria ridotta e un aumento nel consumo di ossigeno (Longo V.D., 1996). Questi difetti di crescita in un primo momento furono attribuiti ad un aumento dei ROS, in particolare di superossido, la cui produzione avviene soprattutto nella

catena di respirazione del mitocondrio come conseguenza della riduzione parziale dell'ossigeno, a livello del complesso I (NADH deidrogenasi). In mancanza di SOD, un'esposizione continua a superossido potrebbe causare l'ossidazione e il conseguente danno delle proteine, dei lipidi e del DNA. La presenza della SOD2 mitocondriale, e della SOD1 nello spazio intermembrana hanno fatto supporre che il mitocondrio necessiti di un elevato livello di protezione dai danni del superossido. Ad esempio, l'impatto dei ROS sul genoma mitocondriale potrebbero essere alla base della teoria mitocondriale dell'invecchiamento, secondo la quale l'invecchiamento è dovuto principalmente ad un incremento dei danni ossidativi sul mtDNA, causato dall'accumulo di ROS, che aumenta con l'avanzare dell'età (Wallace D.C., 2005). In ceppi di lievito Δ*sod*1, ad esempio, la vitalità del ceppo può essere migliorata dalla repressione della respirazione mitocondriale: infatti, l'inattivazione della catena di trasporto degli elettroni che opera la fosforilazione ossidativa, porta a minore produzione di ROS. Ciò evidenzia come l'attività della SOD sia importante nel difendere la cellula dalle specie radicaliche prodotte dal mitocondrio durante la respirazione (Guidot D.M., 1993). Inoltre, la presenza di SOD1 anche nello spazio intermembrana suggerisce che essa potrebbe prevenire la fuoriuscita dell'anione superossido dal mitocondrio, il principale produttore di questa specie radicalica.

In un recente lavoro (Tsang C.K., 2014), è stato dimostrato che l'aumento dello stress ossidativo indotto da perossido di idrogeno o menadione, promuove la traslocazione della proteina SOD1 umana nel nucleo, dove protegge il DNA dallo stress ossidativo. La migrazione di SOD1 è innescata dall'attivazione della chinasi ATM/Mec1, sensori dei ROS. L'attivazione di questa via, promuove la fosforilazione delle serine in posizione 60 e 99 di SOD1 ad opera di DUN1, responsabili della traslocazione dell'enzima nel nucleo. In questo compartimento, la SOD1 lega i promotori e regola l'espressione dei geni coinvolti nella resistenza ai ROS e alla riparazione del danno al DNA (100 e 101). Questo meccanismo è stato descritto sia nel lievito che nelle cellule umane, confermando che il ruolo di SOD1 si è mantenuto durante l'evoluzione. L'attivazione della SOD anche in presenza di perossido di idrogeno, che non costituisce il suo substrato dimostra che questa proteina agisce indipendentemente dalla sua attività dismutasica.

1.3.4 Coinvolgimento di SOD1 nel metabolismo energetico del mitocondrio

Sebbene SOD1 svolga un ruolo primario nella difesa dai ROS, numerosi studi hanno evidenziato che essa interviene attivamente nella trasduzione del segnale e in vie metaboliche legate soprattutto al mitocondrio.

Alcune evidenze indicano che SOD1 è coinvolta nel metabolismo mitocondriale. Ad esempio, è noto che una delle tante proteine che risultano essere protette dalla SOD1, dall'eventuale danno prodotto dai ROS è VDAC1, canale della membrana mitocondriale esterna fondamentale per gli scambi metabolici e molto sensibile allo stress ossidativo: in ceppi Δ*sod*1, VDAC1 risulta una delle proteine maggiormente carbonilate di tutta la OMM (O'Brien K.M., 2004). La mancanza della SOD1 endogena in *S.cerevisiae*, inoltre, provoca una modificazione anche alla conduttanza di VDAC1: studi elettrofisiologici sulla porina estratta da ceppi Δ*sod*1 hanno dimostrato che la conduttanza di VDAC1 risulta diminuita, così come la voltaggio-dipendenza, che risulta significativamente meno pronunciata, rispetto al controllo. Inoltre è stato dimostrato un decremento nell' espressione genica di VDAC1, TOM40 e di altre proteine della OMM nel ceppo Δ*sod*1 (Karachitos A., 2009).

1.3.5 Coinvolgimento di SOD1 nella sclerosi laterale amiotrofica

Negli ultimi anni gli studi sulla SOD1 sono aumentati in maniera esponenziale a causa del suo coinvolgimento in stati patologici che riguardano principalmente le malattie neurodegenerative. Sono state riscontrate numerose mutazioni a carico della SOD1 (circa 160) in vari tipi di SLA (sclerosi laterale amiotrofica) che causano nella proteina varie modificazioni, le quali si riflettono sulla sua funzione e struttura. Numerose mutazioni non permettono il corretto ripiegamento (*folding*) della proteina provocando la perdita della funzione dismutasica; altre sono responsabili dell'aggregazione e precipitazione all'interno del citosol o sugli organelli, risultando tossici alla cellula stessa. È stato visto inoltre che la SOD1 mutante G93A interagisce anche con l'isoforma 1 del VDAC (Israelson A., 2010).

VDAC1 coprecipita con i mutanti sia attivi che inattivi della SOD1 e ciò non accade con la SOD wild type, dimostrando che tra le due proteine vi è uno stretto legame. Recentemente è stato inoltre dimostrato che il legame della SOD1 mutante SLA G93A a VDAC1 impedisce il legame naturale dell'esochinase1 al VDAC1. Tale competizione può essere annullata trattando le cellule con il peptide N-terminale dell'esochinasi, il quale ristabilizza la vitalità cellulare di cellule ricavate da motoneuroni affetti da SLA. (Magrì A., 2016). Questi e altri dati dimostrano che lo studio dei processi cellulari in cui sono coinvolte entrambe le proteine possono essere d'aiuto nella comprensione e nel trattamento delle malattie neurodegenarative.

2. SCOPO ED ORGANIZZAZIONE DELLA TESI

VDAC1 è la proteina più abbondante della membrana esterna del mitocondrio e media gli scambi di metaboliti e ioni tra citosol e matrice mitocondriale. Essa gioca un ruolo fondamentale nel corretto funzionamento dell'organello e specialmente nella respirazione mitocondriale. La respirazione mitocondriale è un meccanismo che rifornisce di energia l'intera cellula, ma che talvolta dà luogo alla produzione di specie reattive dell'ossigeno che, quando presenti in grandi quantità all'interno della cellula, mettono in serio pericolo la stabilità e la funzionalità di altre strutture cellulari mediante l'ossidazione di DNA, lipidi di membrane e proteine. Nonostante l'ossidazione provocata dai ROS sia la principale causa dell'invecchiamento cellulare, è stato visto che alcuni di essi sono importanti nella trasduzione di segnali, indispensabili per la vita della cellula. La cellula, per difendersi dall'eccesso di specie reattive dell'ossigeno ha sviluppato sistemi che hanno funzione detossificante, trasformando le molecole dannose in composti più o meno degradabili. Uno di questi enzimi antiossidanti è la superossido dismutasi, o SOD1 che ha il compito di degradare l'anione superossido in una molecola di ossigeno molecolare e una di acqua ossigenata mediante la reazione di dismutazione. L'anione superossido viene prodotto a livello della catena di respirazione dei mitocondri, durante il processo di fosforilazione ossidativa. Oltre a questa funzione, negli ultimi anni sono state individuate altre funzioni svolte dalla SOD1, con le quali interviene nel metabolismo mitocondriale. Lo studio dell'attività della SOD, ha subito un enorme aumento nel corso degli anni, essendo essa coinvolta nell'invecchiamento cellulare e nelle malattie neurodegenerative che ne derivano, e specialmente nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Lo studio descritto in questa tesi deriva da un progetto iniziale che aveva lo scopo di indagare sulla funzione svolta da SOD1 all'interno del metabolismo mitocondriale, e in modo particolare sulla sua interazione con la proteina VDAC1. Come organismo modello per questo studio, fu scelto proprio il lievito *S.cerevisiae,* per la sua semplicità e per la possibilità di testare in modo immediato la funzionalità mitocondriale mediante

osservazione del fenotipo di crescita su glicerolo. Partendo da questo obiettivo si è giunti all'elaborazione di gruppi di argomenti che sono stati approfonditi in questa tesi al fine di studiare l'effetto che ha l'attività di SOD1 sul metabolismo mitocondriale mediato da VDAC1.

La tesi è stata strutturata in 5 capitoli, che racchiudono gli argomenti trattati:

1. Effetto dell'espressione della proteina hSOD1 nel ceppo deleto della porina mitocondriale (Δpor1);
2. In che modo hSOD1 ripristina il metabolismo mitocondriale?
3. Analisi dell'espressione genica;
4. Studio della parete cellulare;
5. Studio della seconda isoforma di VDAC di *S.cerevisiae*.

3. RISULTATI

3.1 Effetto dell'espressione della proteina hSOD1 nel ceppo deleto della porina mitocondriale (Δ*por1*)

Nonostante la proteina superossido dismutasi (SOD1) svolga la funzione di enzima antiossidante, come descritto in modo più approfondito nel capitolo Introduzione, essa è coinvolta anche nel metabolismo fermentativo e nella respirazione mitocondriale. Numerosi dati in letteratura dimostrano che è indispensabile nella repressione da glucosio del metabolismo mitocondriale, mediante la stabilizzazione delle casein-chinasi-gamma, e nella difesa dallo stress ossidativo di numerose proteine del mitocondrio e del VDAC1 stesso. Questo lavoro di tesi, prende avvio dall'osservazione degli effetti provocati dall'overespressione di hSOD1 nel ceppo di lievito deleto della porina mitocondriale.

3.1.1 hSOD1 recupera il difetto di crescita del ceppo Δpor1 su glicerolo e su altre fonti di carbonio non fermentabili

L'assenza di VDAC1 nel lievito *S.cerevisiae* non permette la crescita su glicerolo e su altre fonti di carbonio non fermentabili, indicando che la proteina VDAC1 è

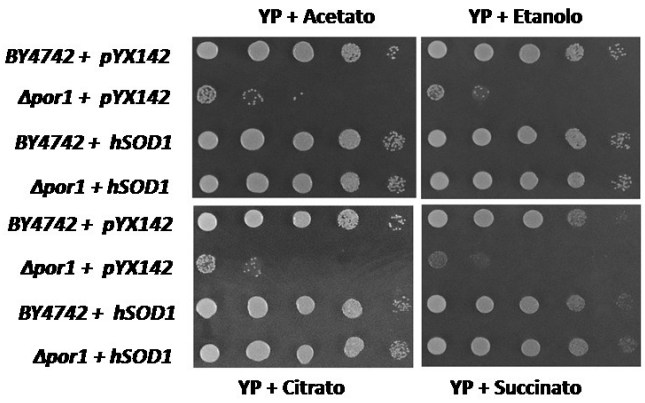


Figura 3.1 Saggi di diluizione seriale dei ceppi BY4742 e *Δpor1* trasformati con hSOD1. Tutti i ceppi crescono senza difficoltà su glucosio (YPD). Su glicerolo, il ceppo *Δpor1* mostra problemi di crescita ad entrambe le temperature testate, al contrario del ceppo controllo BY4742. Inaspettatamente l'overespressione di hSOD1 nel *Δpor1*, recupera il difetto di crescita del *Δpor1* su glicerolo.

importante per il corretto svolgimento della respirazione mitocondriale. Per indagare sul ruolo svolto da SOD1 nel metabolismo mitocondriale mediato da VDAC1, le sequenze di SOD1 umana (hSOD1) e di lievito *S.cerevisiae* (ySOD1) sono state trasformate nel ceppo di lievito deleto del gene *por1* codificante la porina mitocondriale yVDAC1 (ceppo Δ*por1*) e nel ceppo parentale wild type BY4742. Per l'espressione è stato utilizzato il vettore d'espressione pYX142. Come controllo dell'esperimento sia il ceppo Δ*por1* che il ceppo wild-type sono stati trasformati con il vettore vuoto. Le colture dei diversi ceppi ottenuti sono state diluite in modo seriale e piastrate su terreno completo contenete glucosio (YPD) o glicerolo (YPY) come fonte di carbonio. Le piastre sono state poi incubate per 3-4 giorni a 28°C e 37°C che rappresentano rispettivamente la temperatura di crescita ideale per i lieviti del genere *Saccharomyces* e la temperatura più restrittiva a cui il ceppo Δ*por1* è più sensibile. I risultati del saggio sono visibili nella fig. 3.1. Il ceppo wild type BY4742 non presenta alcuna difficoltà di crescita sulle due fonti di carbonio e a entrambe le temperature testate. Δ*por1*, invece come già anticipato precedentemente, presenta difficoltà di crescita su glicerolo sia a 28°C che a 37°C; questo fenotipo è dovuto al meccanismo con cui vengono metabolizzate le due fonti di carbonio: il glucosio richiede la fermentazione o la glicolisi, il glicerolo invece necessita della respirazione, e quindi richiede mitocondri perfettamente attivi e funzionali. La difficoltà di crescita su glicerolo del ceppo Δ*por1* è dovuta proprio alla mancanza della proteina VDAC1 sulla membrana esterna dei mitocondri, la quale ne compromette la funzionalità. L'espressione di hSOD1 risulta nel recupero della capacità di crescita su glicerolo del Δ*por1*. Tale proprietà inaspettata e sorprendente inoltre sembra essere tipica della proteina umana, dato che la trasformazione con la proteina omologa di lievito non conferisce la ripresa della capacità di crescita su glicerolo.

Oltre al glicerolo, sono state testate altre fonti di carbonio non fermentabili, che richiedono la presenza di mitocondri per essere metabolizzate, come citrato e succinato, intermedi del ciclo di Krebs, che avviene interamente nella matrice mitocondriale, etanolo, prodotto finale della fermentazione, e acetato i quali vengono convertiti ad acetil CoA, per essere immessi nel ciclo di Krebs. Questi substrati sono stati aggiunti al terreno YP con una concentrazione finale del 2%, e

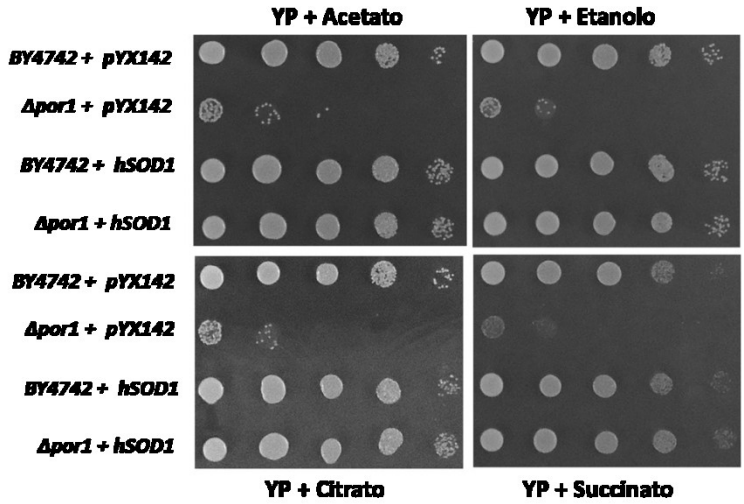


Figura 2.2 Saggi di diluizione seriale su altre fonti di carbonio non fermentabili diverse dal glicerolo. L'espressione di hSOD1 recupera il difetto di crescita del ceppo Δpor1 su tutte le fonti di carbonio non fermentabili testate a 28°C, in modo simile a quanto avviene su glicerolo.

su tale terreno solidificato sono state piastrate le colture diluite in modo seriale. Il saggio è stato condotto seguendo i tempi e le temperature descritte precedentemente. Il risultato può essere osservato nella figura 3.2. Come atteso, Δ*por1* non riesce a crescere su nessuna di queste quattro fonti di carbonio non fermentabili, a causa del metabolismo mitocondriale danneggiato dall'assenza di VDAC1. In modo analogo a ciò che avviene in glicerolo invece, l'espressione di hSOD1 permette la crescita su tutte le fonti di carbonio non fermentabili testate suggerendo una ripresa del metabolismo mitocondriale, carente nel Δ*por*1 a causa della mancanza di VDAC1.

3.1.2 Analisi della funzionalità mitocondriale

Lo stato di salute mitocondriale viene definito da alcuni parametri, la maggior parte dei quali descrivono il corretto funzionamento della respirazione. Tra questi, il potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$), risulta strettamente correlato con la produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa (Perry S.W., 2011; Ramadass R., 2008). In questo lavoro il potenziale di membrana è stato quantificato mediante l'uso di una sonda fluorescente, DASPMI, che lega i mitocondri in modo dipendente dal potenziale: quanto più il potenziale è alto, più la sonda si lega all'organello

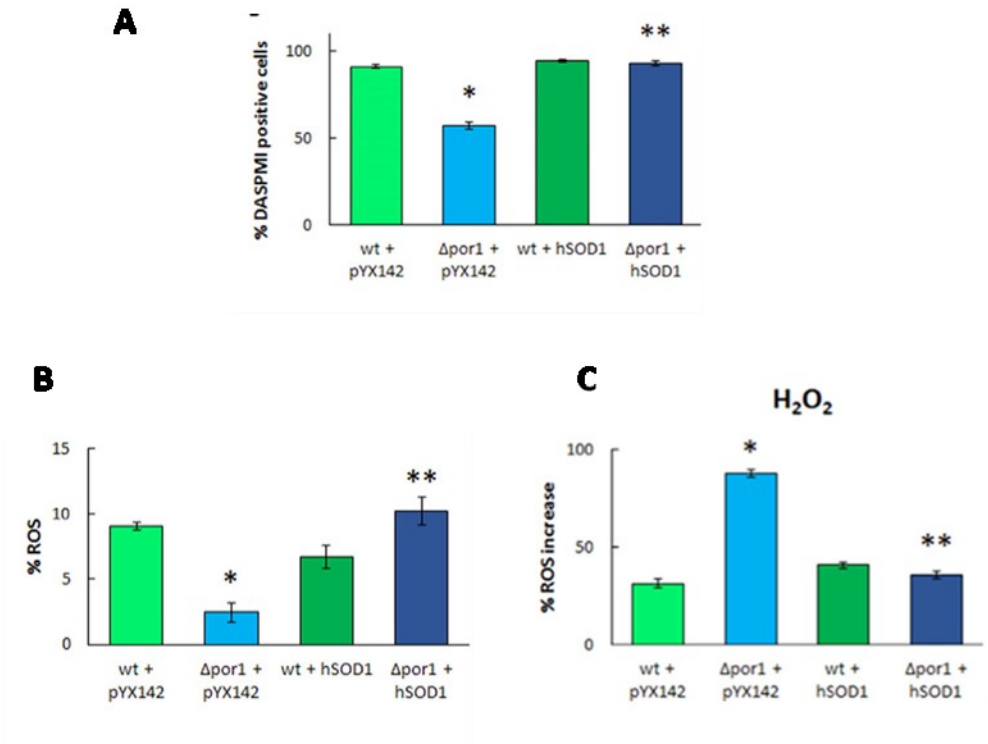


Figura 3.3. Analisi della funzionalità mitocondriale. A: il potenziale di membrana (ΔΨm) è stato rivelato utilizzando il DASPMI. L'espressione di hSOD1 causa un aumento della percentuale di cellule positive al DASPMI rispetto al Δpor1, in quantità paragonabile alle cellule wild type. **B:** quantificazione del contenuto di ROS intracellulare mediante l'uso di DHR123. Δpor1, incapace di effettuare la respirazione mitocondriale, possiede un livello di ROS molto basso in confronto al ceppo wild type. L'espressione di hSOD1 incrementa i livelli di ROS. **C:** quantificazione dei ROS dopo trattamento con perossido di idrogeno. La presenza di hSOD1 riesce ad abbassare la quantità di ROS del ceppo Δpor1 in seguito al trattamento. (*) P<0,001 rispetto al ceppo wt + pYX142; (**) P< 0,001 rispetto al ceppo Δpor1+ pYX142

emettendo la sua fluorescenza se eccitata con una luce laser. Le colture in fase esponenziale di crescita sono state trattate con DASPMI come descritto nel capitolo Materiali e Metodi e successivamente sono state sottoposte all'analisi citofluorimetrica. Il grafico A della figura 3.3 mostra la quantità di cellule risultate positive al trattamento relativamente al ceppo controllo wild type BY4742. Le cellule del ceppo di lievito *Δpor1* si colorano per circa il 35% in meno rispetto al ceppo wild type ($p<0.001$). Dato che l'entrata della sonda è dipendente dal potenziale di membrana, questo risultato suggerisce che la mancanza di VDAC1 causa scompensi nell'energizzazione della membrana mitocondriale. L'espressione della hSOD1 nelle cellule Δ*por1* causa un aumento sostanziale dell'ingresso delle molecole di DASPMI all'interno delle cellule, raggiungendo livelli simili a quelli del ceppo wild type. Questo risultato suggerisce chiaramente che la presenza di hSOD1

causa un ripristino del potenziale della membrana del ceppo Δ*por1*, e di conseguenza una ripresa del metabolismo mitocondriale.

Un altro parametro frequentemente analizzato per verificare lo stato di attività dei mitocondri è la quantità di ROS all'interno delle cellule. I ROS e in particolare l'anione superossido, sono considerati tossici per le cellule. Anche se la loro presenza in piccole quantità assicura un corretto funzionamento del redox signaling. Tuttavia, essendo prodotti in gran parte a livello della catena di respirazione dei mitocondri, la loro presenza può essere considerata un indice di corretto funzionamento di questi organelli. La quantità di ROS nelle cellule di lievito è stata stimata misurando l'emissione di fluorescenza della rodamina, un prodotto di ossidazione del DHR123. Nel grafico B della figura 3.3 è mostrata la percentuale di cellule positive al trattamento con DHR123. La quantità di ROS nelle cellule Δ*por*1 è significativamente più bassa rispetto a quella del ceppo wild type (controllo) in quanto in assenza di VDAC1 il ceppo non svolge la respirazione metabolica. In seguito all'overespressione di hSOD1, invece, si assiste ad un aumento del contenuto totale di ROS all'interno della cellula. Ciò fa presupporre una riattivazione della respirazione mitocondriale in presenza di hSOD1. Al contrario, l'espressione di hSOD1 nel ceppo wild type, causa un abbassamento dei ROS, come già dimostrato in letteratura (Yoo H.Y., 1999). Nella fig. 3.3C è mostrato il risultato della quantificazione dei ROS totali dopo trattamento con perossido d'idrogeno. Il perossido d'idrogeno, oltre a costituire esso stesso un ROS, induce la produzione di ulteriori ROS all'interno della cellula. Il ceppo Δ*por1* risulta il meno reattivo a questo trattamento, in quanto possiede la quantità più alta di ROS. La presenza di hSOD1 difende la cellula dallo stress ossidativo, anche se il perossido di idrogeno non è un suo substrato specifico. Dall'analisi del potenziale di membrana e del livello di ROS intracellulare è emerso che la mancanza di VDAC1 (ceppo Δ*por1*) comporta un difetto nel metabolismo mitocondriale, il quale viene recuperato e riportato a livelli fisiologici in seguito all'espressione della hSOD1.

3.1.3 hSOD1 induce l'espressione di geni codificanti proteine β–barrel della membrana mitocondriale esterna

Per capire quale meccanismo, innescato dall'espressione di hSOD1, provoca il ripristino del metabolismo mitocondriale, è stata ipotizzata una ripresa degli scambi di metaboliti tra citosol e mitocondrio. Per questo motivo è stato disegnato un esperimento di PCR-Real Time al fine di quantificare l'espressione di geni codificanti per proteine della membrana mitocondriale esterna che possiedono la stessa struttura di VDAC1 e che quindi potrebbero sostituire il VDAC1 mancante negli scambi di molecole. In particolare sono stati scelti il gene p*or2* che codifica per la seconda isoforma di VDAC, il gene codificante TOM40, una subunità del complesso TOM coinvolto nell'importazione delle proteine al mitocondrio, e il gene codificante SAM50, una subunità appartenente al complesso SAM che media il ripiegamento delle proteine β-barrel all'interno della membrana. Come controllo è stato scelto *cit1*, un gene codificante l'enzima citrato sintasi, che catalizza la reazione di condensazione dell'ossalacetato con acetil-CoA in citrato nella matrice mitocondriale. Essendo l'espressione di *cit1* mantenuta stabile all'interno dei ceppi analizzati, tale gene è stato utilizzato come calibratore per l'analisi dei dati. Il risultato della PCR-Real Time è visibile nel grafico in figura 3.4A. Dall'analisi dei dati è emerso che tutti e tre i geni sono sovraespressi, in particolar modo il gene *por2,* espresso circa 8 volte di più nel Δ*por1*+hSOD1 rispetto al controllo Δpor1+pYX142 ($p<0,001$).

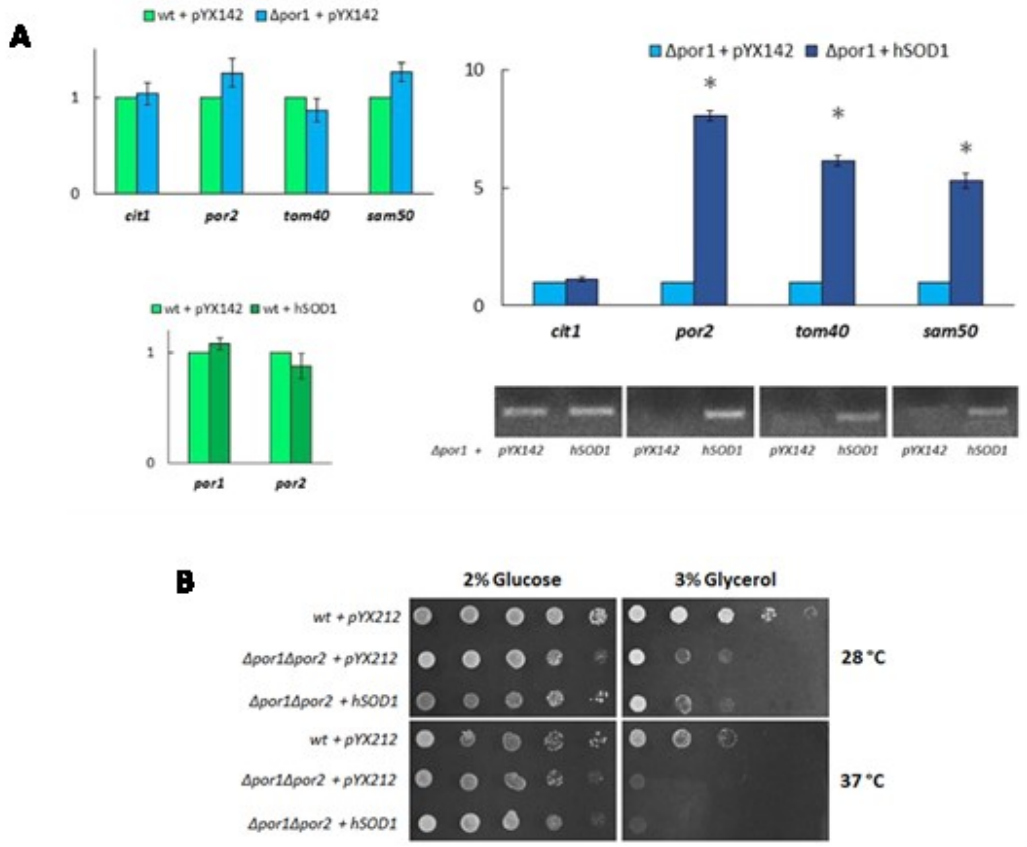


Figura 3.4. hSOD1 induce l'espressione dei geni codificanti per le proteine β-barrel della membrana mitocondriale esterna. A:Quantificazione dell'espressione di *por2, tom40 e sam50* relativa al gene *cit1* in Δ*por1* trasformato con vettore vuoto e in Δ*por1* trasformato con hSOD1. Tutti i geni risultano sovraespressi nel ceppo trasformato con hSOD1, in particolare *por2*. (*) P < 0,001 rispetto a Δ*por1* + pYX142.**B**: Saggio di diluizione seriale del ceppo Δ*por1*/Δ*por2*. In assenza del gene por2, hSOD1 non è in grado di recuperare il difetto di crescita su glicerolo.

Per confermare l'importanza del gene *por2* è stato necessario, ripetere gli esperimenti di diluizione seriale su glicerolo utilizzando come ospite per l'espressione di hSOD1 il ceppo deleto di entrambi i geni codificanti le porine mitocondriali (ceppo Δ*por1*/Δ*por2*). Dalle diluizioni seriali, mostrate in fig1.4B risulta che il ceppo Δ*por1*/Δ*por2* presenta una notevole difficoltà di crescita su glicerolo ad entrambe le temperature testate. L'espressione di hSOD1, invece, non recupera il difetto di crescita, a differenza di quando osservato nel singolo mutante Δ*por1*. Ciò conferma che la presenza del gene *por2* è indispensabile nella riattivazione della respirazione mitocondriale, e che in assenza di esso la cellula non risponde allo stimolo fornito dalla hSOD1.

3.1.4 Espressione del mutante hSOD1 G85R nel Δpor1

Per verificare se la riattivazione del metabolismo mitocondriale è direttamente collegata all'attività enzimatica svolta da hSOD1, è stato effettuato il saggio di diluizione seriale del ceppo Δ*por1* trasformato con il mutante hSOD1 G85R. In particolare la mutazione G85R, rinvenuta nella sclerosi laterale amiotrofica, rende la proteina incapace di effettuare l'attività dismutasica tipica della forma wild type in quanto la proteina non assume forma dimerica, non lega il rame e i ponti disolfuro si trovano in forma ridotta. (Borchelt D.R., 1994; Zetterström P., 2007; Cao X., 2008).

In figura 3.5 è mostrato il risultato del saggio di diluizione seriale. L'espressione della forma mutata di hSOD1 G85R continua a recuperare il difetto di crescita del Δpor1 al pari della forma wild type, suggerendo che il recupero del metabolismo mitocondriale è un effetto indipendente dall'attività di dismutazione dell'anione superossido tipico della hSOD1.

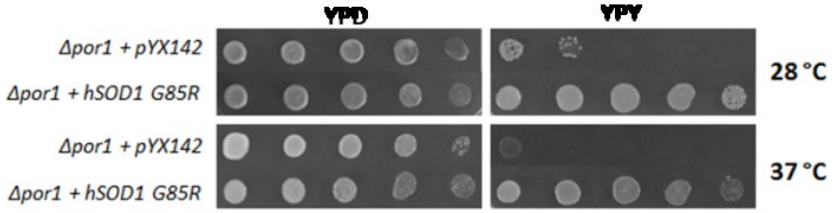


Figura 3.5 Diluizione seriale del ceppo Δ*por1* trasformato con il mutante hSOD1 G85R .Nonostante il mutante G85R sia una forma priva dell'attività dismutasica, in quanto misfoldato, la sua espressione ripristina il difetto di crescita del ceppo Δpor1, al pari della proteina hSOD1 wt.

3.1.5 Conclusione

La mancanza della proteina VDAC1 nel lievito *S.cerevisiae* (Δ*por1*), dà luogo a scompensi a livello del metabolismo cellulare che non permettono il corretto svolgimento della respirazione mitocondriale. Questo difetto è osservabile quando il ceppo cresce in presenza di glicerolo o di altre fonti di carbonio non fermentabili, le quali richiedono mitocondri pienamente funzionali per essere utilizzate.

Il fatto che hSOD1 regoli il metabolismo mitocondriale è evidenziato dal recupero della funzionalità mitocondriale nel ceppo deleto della porina mitocondriale. È

stato infatti osservato che hSOD1 ripristina il difetto di crescita di Δ*por1* su tutte le fonti di carbonio non fermentabili. Inoltre si assiste ad un recupero del potenziale di membrana mitocondriale, della produzione dei ROS e all'induzione dell'espressione delle proteine β-barrel della membrana mitocondriale esterna. Quest'effetto è indipendente dall'attività dismutasica di SOD1, in quanto l'espressione del mutante G85R provoca il medesimo effetto. Numerosi dati in letteratura dimostrano che SOD1 regola il metabolismo energetico, reprimendo la respirazione mitocondriale quando il lievito cresce su glucosio. Dal momento che VDAC1 rappresenta una delle proteine chiave coinvolte nel corretto funzionamento dell'attività mitocondriale, è chiaro che l'osservazione descritta in questo capitolo costituisce un interessante punto di partenza per capire in che modo la proteina hSOD1 interviene nel metabolismo respirativo mediato da VDAC1. Per spiegare l'aumento di espressione dei geni che codificano per le proteine della membrana esterna è stato preso come modello il meccanismo descritto da Tsang C.K. e collaboratori (2014), in cui è stata descritta la capacità di SOD1 di migrare al nucleo in seguito a fosforilazione delle serine 60 e 99, dove agisce come fattore di trascrizione per i geni coinvolti nella difesa allo stress ossidativo e nella riparazione del DNA.

In particolare, è stato ipotizzato un modello la cui rappresentazione grafica può essere osservata nella figura 3.6. Il ceppo Δpor1, presenta un contenuto basso di ROS dal momento che non effettua la respirazione mitocondriale. Fisiologicamente yVDAC2 è presente a così bassi livelli che non permette di recuperare il difetto di crescita su glicerolo per sopperire alla mancanza della prima isoforma. Inoltre in questo ceppo la proteina ySOD1 è distribuita nel citosol e nello spazio intermembrana dove effettua la sua normale attività enzimatica antiossidante. In seguito all'overespressione di hSOD1, si hanno più molecole libere nel citoplasma: probabilmente queste molecole prodotte dal messaggio del plasmide, non possiedono sufficienti informazioni per essere trasportate nello spazio intermembrana, causando un accumulo (stress) nel citoplasma. Queste molecole sarebbero quindi più disponibili per la fosforilazione e la conseguente migrazione al nucleo. Nel nucleo hSOD1 si comporterebbe da attivatore trascrizionale, aumentando l'espressione dei geni che codificano per le proteine della membrana

mitocondriale esterna, e in particolare per yVDAC2. In questo modo in seguito all'aumento di yVDAC2 sulla membrana mitocondriale esterna, si avrebbe un recupero della funzionalità mitocondriale.

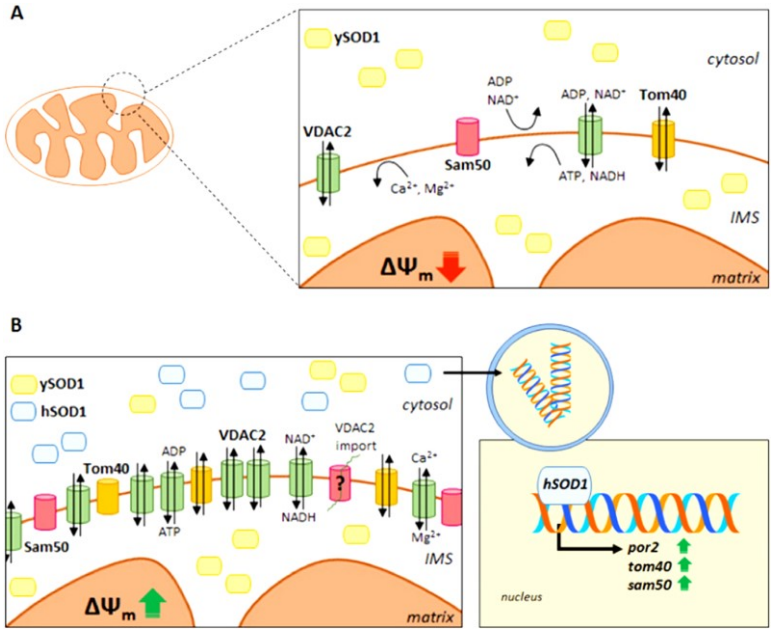


Figura 3.6. Modello proposto per spiegare la riattivazione mitocondriale sotto stimolo di hSOD1. A: nel ceppo Δ*por1* vi è una piccola quantità di yVDAC2, la quale non sostituisce yVDAC1 per lo scambio di metaboliti tra citosol e mitocondrio. ySOD1 è distribuita nel citosol e non è disponibile per la traslocazione nel nucleo. **B**: in seguito all'espressione di hSOD1, vi è un aumento della quantità di molecole di SOD, le quali, essendo più disponibili per entrare nel nucleo, attivano la trascrizione di geni che codificano per le proteine della membrana mitocondriale esterna.

3.2 In che modo la SOD1 umana ripristina il metabolismo mitocondriale?

3.2.1 Differenze tra i residui cisteinici delle sequenze SOD1 di lievito e umana

La riattivazione della funzionalità mitocondriale del ceppo Δpor1 sotto stimolo della SOD1 umana ma non della SOD1 di lievito, suggerisce che le due proteine pur essendo omologhe hanno qualche differenza che compromette la loro funzione all'interno della cellula. Per individuare le differenze che potrebbero avere un ruolo chiave in questo meccanismo sono state comparate le sequenze amminoacidiche delle due proteine. L'allineamento bioinformatico su Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) delle due sequenze ha evidenziato che esse presentano il 70% di similarità. Inoltre H.Y. Yoo (1999) già negli anni passati aveva dimostrato che la SOD1 umana è pienamente attiva nel lievito privato della SOD1 endogena mediante delezione, dimostrando che le due proteine sono intercambiabili. Osservando, nell'allineamento, gli aminoacidi che

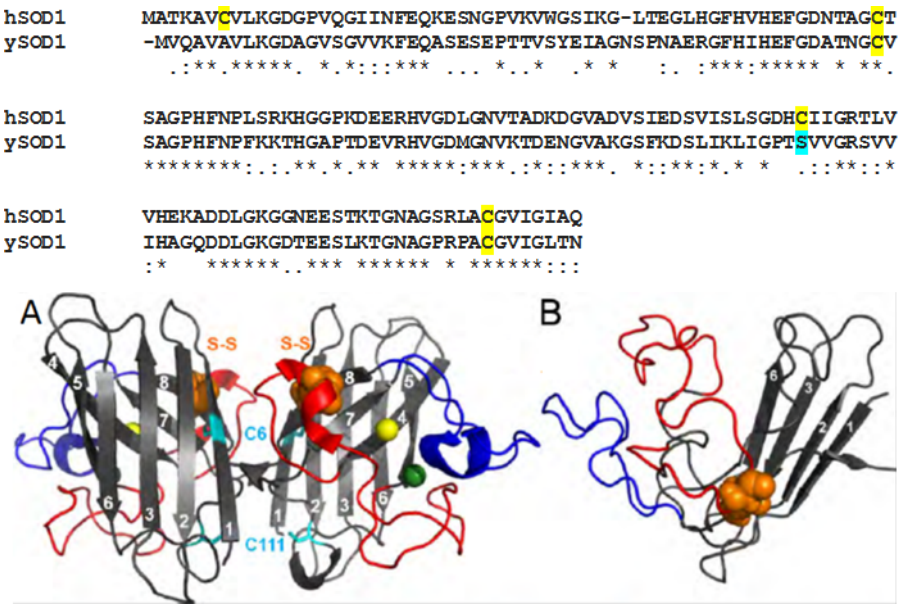


Figura 3.7 Allineamento bioinformatico delle sequenze amminoacidiche di SOD1 umana (hSOD1) e di lievito (ySOD1), ottenute mediante Clustal Omega. In alto: Le sequenze mostrano una percentuale di identità uguale al 70%. In giallo sono state evidenziate le cisteine di entrambe le sequenze, in verde Ser-111 della sequenza del lievito che nell'uomo è una cisteina. In basso posizione delle cisteine in hSOD1 nel dimero (A) e nel monomero in arancione (B).

hanno rilievo dal punto di vista strutturale (fig. 3.7), si può notare che nella SOD1 umana vi sono 4 cisteine contro le 2 presenti nella SOD1 di lievito. Cys-57 e Cys-146 sono i residui conservati sia nell'uomo che nel lievito, e sono coinvolte nella formazione di un legame disolfuro intramolecolare essenziale per il corretto ripiegamento dell'enzima (fig. 3.7B). I due residui aggiuntivi che si ritrovano nella SOD1 umana sono Cys-6, impacchettata all'interno del β-barrel, e Cys-111, esposta sulla superfice della proteina, vicino l'interfaccia tra le subunità (fig. 3.7A).

È stato dimostrato che l'ossidazione delle cisteine è responsabile della localizzazione subcellulare della proteina. Nonostante il meccanismo di targeting sia ancora sconosciuto, è stato visto che solo l'apoenzima, ovvero la proteina non ripiegata e priva del cofattore metallico, è in grado di attraversare la membrana mitocondriale esterna attraverso il complesso TOM ed entrare così nello spazio intermembrana dove subisce l'attività degli chaperon addetti al suo ripiegamento, all'inserzione dei metalli e alla formazione dei ponti disolfuro (CCS) (Culotta V.C., 1997). Al contrario la formazione dei ponti disolfuro nel cytosol previene l'ingresso della SOD1 negli organelli. Inoltre è stato visto che questo residuo potrebbe legare metalli o altri ligandi come glutatione e tioredoxina, i quali potrebbero impedire la sua riduzione con conseguente blocco dell'import all'interno di altri organelli (Ogawa Y., 1997). Delle due cisteine aggiuntive che si ritrovano nella SOD1 umana, Cys111 nella sequenza di lievito è sostituita da una serina.

In questo lavoro è stata posta l'attenzione proprio su questo residuo. Per indagare sulla sua possibile funzione, sono state effettuate delle mutagenesi puntiformi per sostituire da una parte, la serina 111 del lievito con un residuo di cisteina (ySOD1 S111C), e dall'altra la cisteina della sequenza umana con una serina (hSOD1 C111S). Le sequenze mutanti ottenute e clonate nel vettore d'espressione in lievito pYX142, sono state trasformate nel ceppo mutante Δ*por1* per effettuare i saggi di diluizione seriale e verificare se il cambiamento di questo aminoacido nella sequenza della SOD1 di lievito causa lo stesso effetto della sequenza SOD1 umana, ovvero il recupero del difetto di crescita di Δpor1. I risultati dei saggi di diluizione sono riportati nella figura 3.8.

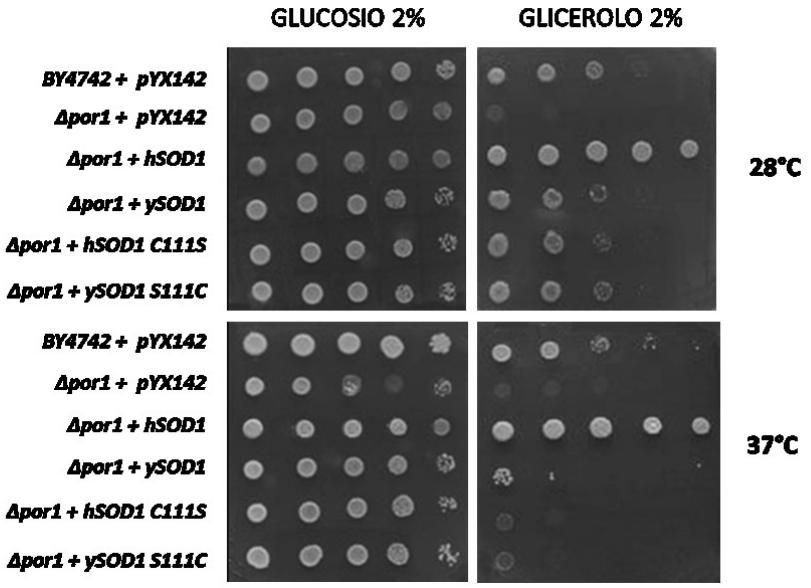


Figura 3.8: Saggi di diluizioni seriali su glucosio e glicerolo, del ceppo di lievito Δ*por1* trasformato con le proteine mutanti hSOD1 C111S e ySOD1 S111C. I ceppi Δ*por1* trasformati con i rispettivi costrutti, sono stati piastrati su glucosio e glicerolo e le piastre sono state incubate a 28°C o 30°C per 3-4 giorni. L'espressione di ySOD1 S111C non provoca recupero del difetto di crescita su glicerolo tipico del ceppo Δ*por1*, in modo analogo a ySOD1 wt. Il mutante hSOD1 C111S, diversamente dalla hSOD1 wt non permette al Δ*por1* di crescere su glicerolo, suggerendo una possibile implicazione di questo residuo nel recupero del metabolismo mitocondriale.

Mentre la presenza della SOD1 umana ripristina il difetto di crescita del Δ*por1* su glicerolo, la SOD1 di lievito mutante S111C non riesce a farlo mostrando un fenotipo di crescita molto simile a quello del controllo Δ*por*1 trasformato con il vettore vuoto o con il vettore recante la sequenza ySOD1 wild type. L'espressione di hSOD1mutante C111S non recupera il difetto di crescita del ceppo Δ*por1* su glicerolo a differenza della proteina hSOD1 wild type. Questi risultati suggeriscono che il residuo di cisteina in posizione 111 nella sequenza SOD1 dell'uomo, potrebbe avere un ruolo rilevante nella riattivazione del metabolismo mitocondriale, in quanto la sua sostituzione con un altro aminoacido, non permette tale recupero. Al contrario, la sostituzione della serina in posizione 111 nella SOD1 di lievito con la cisteina, non portando al recupero del difetto di crescita di Δ*por1*, potrebbe indicare che, probabilmente, ad essere coinvolto non è solo l'aminoacido che si trova in posizione 111 ma tutto il motivo che si trova nel suo intorno.

3.2.2 Mutagenesi delle serine di hSOD1 coinvolte nella traslocazione al nucleo

Le sequenze SOD1 umana e di lievito contengono residui di serina in posizione 60 e 99, i quali in seguito a fosforilazione permettono la traslocazione della proteina al nucleo, dove essa induce l'espressione dei geni coinvolti nella difesa allo stress ossidativo (Tsang C.K., 2014). Nel capitolo precedente è stato visto che hSOD1 attiva l'espressione dei geni della membrana mitocondriale esterna nel ceppo Δ*por*1, e sulla base del modello di Tsang C.K. è stato elaborato un ipotesi per spiegare la riattivazione della funzionalità mitocondriale. Per verificare dunque se l'induzione dell'espressione delle proteine della OMM avviene secondo il meccanismo che prevede l'ingresso di SOD1 nel nucleo, la sequenza di hSOD1 è stata mutagenizzata per sostituire le serine 60 e 99 con residui di alanine, al fine di impedire la loro fosforilazione e la successiva traslocazione nel nucleo. Dopo aver ottenuto la sequenza mutata, questa è stata clonata nel vettore pYX142 e successivamente trasformata nel ceppo Δ*por1.* Il ceppo ottenuto è stato utilizzato per effettuare i saggi di diluizione seriale su glucosio e glicerolo. Il risultato è mostrato in fig.3.9.

Dopo 3-4 giorni di crescita a 30°C e 37°C, si può notare che, su glucosio, non vi sono particolari difetti di crescita in quanto tutti i ceppi riescono ad effettuare

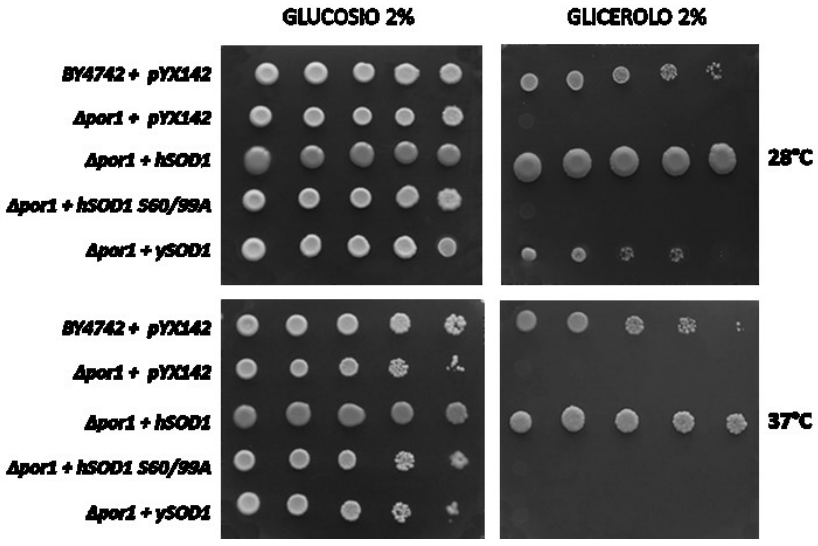


Figura 3.9: Saggi di diluizione seriale su glucosio e glicerolo del ceppo Δ*por1* trasformato con il mutante hSOD1 S60/99A . L'espressione della SOD1 priva delle serine la cui fosforilazione è necessaria per la sua traslocazione al nucleo , non recupera il difetto di crescita del ceppo Δ*por1*.

normalmente la glicolisi. Su glicerolo, è possibile osservare ancora una volta la crescita difettiva del ceppo Δ*por*1, che viene recuperata dall'espressione della proteina hSOD1wt. L'espressione del mutante hSOD1 S60/99A invece non riesce a recuperare il difetto di crescita del ceppo deleto della porina endogena, infatti il ceppo risultante mostra un livello di crescita simile al ceppo controllo Δ*por*1 trasformato con il vettore vuoto. Ciò suggerisce che la fosforilazione delle serine è indispensabile per permettere alla SOD1 di innescare meccanismi che portano alla riattivazione del metabolismo mitocondriale e che, in assenza di esse, non essendo più possibile la traslocazione della SOD1 al nucleo, non si ha il recupero della funzionalità mitocondriale.

3.2.3 Conclusione

In questo capitolo, effettuando mutazioni sulle sequenze hSOD1 e ySOD1 sono stati analizzati alcuni residui amminoacidici che sembrano importanti dal punto di vista funzionale o strutturale. Nella sequenza hSOD1 in posizione 111, vi è una cisteina che risulta essenziale per permettere il recupero della funzionalità mitocondriale del ceppo Δ*por1* in quanto la sua mutazione in serina non permette al ceppo di crescere su glicerolo. Il residuo 111 nella sequenza di lievito è una serina che, però, se mutata in cisteina non conferisce lo stesso effetto della hSOD1. Questo risultato suggerisce che nella sequenza della proteina umana, la cisteina in posizione 111, conservata solo in alcuni mammiferi, potrebbe essere implicata nella riattivazione del metabolismo mitocondriale, ma con il contributo di altri residui.

Nell'induzione dell'espressione genica in seguito a stress ossidativo, risulta essenziale la fosforilazione delle serine 60 e 99, le quali mediano la traslocazione della SOD1 nel nucleo (Tsang C.K.,2014). Inattivando tale fosforilazione mediante la mutazione delle serine in alanine, non si ha più la ripresa del metabolismo mitocondriale del ceppo Δ*por1* su glicerolo suggerendo che probabilmente la proteina SOD1, per effettuare il ripristino delle attività mitocondriali mediante l'induzione dell'espressione delle proteine di membrana, ha necessità di traslocare al nucleo. Questo dato risulta interessante nella comprensione del meccanismo che instaura hSOD1 all'interno della cellula priva della porina mitocondriale e fa

supporre la loro interazione funzionale, rilevante nella patogenesi di alcune malattie neurodegenerative. Inoltre la futura verifica della presenza della proteina hSOD1 nel nucleo, potrebbe essere un'ulteriore conferma alla proposta di Tsang C.K., secondo cui la SOD1 avrebbe un'azione aggiuntiva come attivatore trascrizionale, funzione non meno importante di quella antiossidante.

3.3 Analisi dell'espressione genica del lievito Δ*por1* e di ceppi da esso derivati

I risultati descritti nei capitoli precedenti dimostrano che l'overespressione della SOD1 umana nel lievito deleto della porina mitocondriale (Δ*por1*) provoca il recupero del difetto di crescita su glicerolo, dovuto a una ripresa del metabolismo mitocondriale. Nonostante in letteratura sia stato dimostrato ampiamente che la SOD1 è coinvolta nel metabolismo del glucosio e nella repressione della respirazione mitocondriale, è ancora da capire quale sia il meccanismo che avviene a livello molecolare e che porta al miglioramento della funzionalità mitocondriale. Per comprendere e tentare di spiegare questo effetto è stato sfruttato l'approccio "genome wide" ormai ben consolidato, mediante l'ausilio della tecnologia microarray. In questo modo è stato possibile osservare contemporaneamente le variazioni quantitative e qualitative di tutto il trascrittoma dei ceppi presi in esame.

3.3.1 Analisi dell'espressione genica mediante microarray

L'analisi dell'espressione genica in questo lavoro è stata effettuata utilizzando microarray a RNA (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Agilent). Gli RNA estratti dai ceppi sono stati coniugati con una molecola fluorescente (cy3) e ibridati su vetrini contenenti sonde oligonucleotidiche di RNA. La scansione dei vetrini di ibridazione ha dato come risultato una serie di valori indicanti l'intensità di fluorescenza di ogni singolo probe genico legato dalla molecola target del campione. Questi dati, normalizzati con il controllo interno dell'esperimento, costituito da una serie di determinati RNA target in dotazione con il kit (spike-in RNA), sono stati analizzati statisticamente mediante un test One way ANOVA post-hoc Tukey HSD. L'esperimento è stato condotto in quadruplicato.
I risultati ottenuti sono stati raggruppati in cluster gerarchici per la costruzione delle heat maps, grazie alle quali è possibile visualizzare il grado di espressione di un determinato gene in base al colore (il rosso indica sottoespressione, mentre il verde sovraespressione). Nella heat map realizzata (fig.3.10) i geni indicati nelle

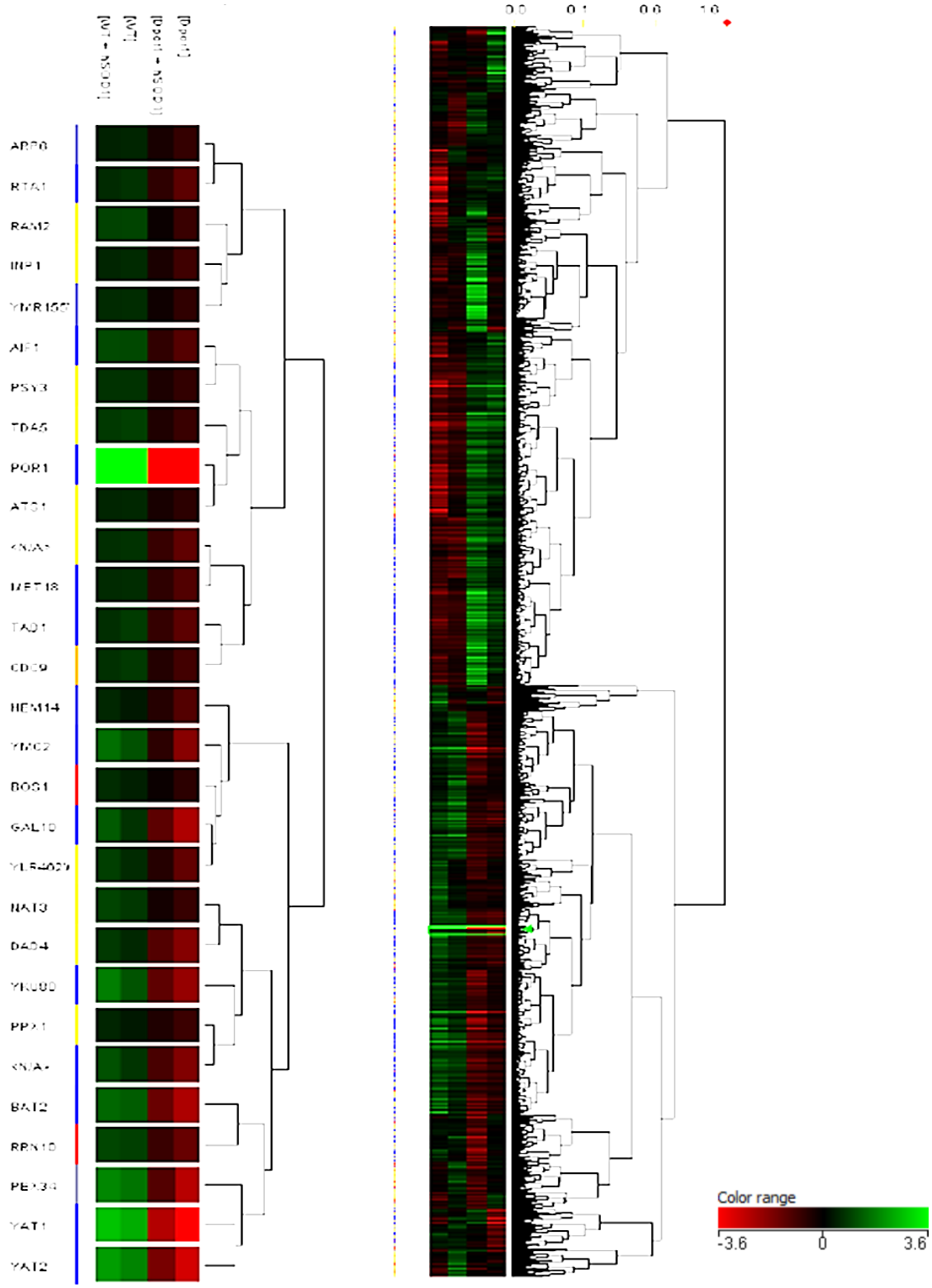


Figura 3.10 Heat maps dell'analisi dell'espressione genica dei ceppi BY4742, BY4742 +hSOD1, Δpor1, Δpor1 + hSOD1. I geni sono stati raggruppati in base al loro livello di espressione e la lunghezza del ramo è inversamente proporzionale alla loro similarità. A sinistra è mostrato un ingrandimento della regione in cui è posizionato il gene *por1;* nei ceppi di tale gene è possibile vedere una barretta rosso intenso che indica l'assenza del gene. Nei ceppi wt invece la barretta appare di colore verde, ad indicare l'espressione del gene.

righe sono stati raggruppati in base al loro livello di espressione nei 4 campioni

(colonne). La lunghezza dei rami che raggruppano i singoli geni, è inversamente proporzionale al loro livello di similarità. Le heat maps, pur fornendo una visuale ampia dell'intero risultato dell'esperimento, non danno informazioni di tipo quantitativo. Infatti grazie ad esse è possibile solo individuare quei gruppi genici che presentano grandi differenze nell'espressione tra i diversi ceppi.

3.3.2 Raggruppamento funzionale dei geni variati

L'analisi trascrittomica effettuata utilizzando un solo tipo di molecola fluorescente (approccio One Color) richiede il confronto diretto tra due campioni, dei quali uno costituisce il campione di riferimento o controllo. Dunque i livelli di espressione dei singoli ceppi sono definiti da un valore di fold-change relativo alla condizione scelta come controllo. In particolare in questo caso, come riferimento è stato scelto Δ*por1*, e in questo modo è stato possibile confrontare tutte le altre condizioni tra di loro. I confronti effettuati sono indicati di seguito:

BY4742 + pYX142	vs	Δ*por1*
Δ*por1*+ pYX142	vs	Δ*por1*
Δ*por1*+ hSOD1 wt	vs	Δ*por1*
BY4742 +hSOD1 wt	vs	Δ*por1*

In questo lavoro di tesi sono state analizzate solo le prime tre condizioni escludendo dall'analisi dei dati il ceppo BY4742 + hSOD1 wt, che sarà preso in considerazione in futuro.

Il valore di fold-change così ottenuto ci indica quanto varia l'espressione di un gene in un campione rispetto al controllo. Questo valore può essere positivo o negativo a secondo che il gene sia rispettivamente sovraespresso o sottoespresso.

Nell'interpretazione dei risultati di microarray risultano utili svariati tools bioinformatici che raggruppano i geni in famiglie funzionali. Il database più conosciuto ed utilizzato è Gene Ontology che raccoglie tutte le informazioni disponibili sui geni noti e li suddivide in famiglie funzionali (Blake J.A. & Harris M., 2003). Gene Ontology raggruppa i geni in famiglie funzionali, rappresentate dai processi biologici, dalle funzioni molecolari, e dalle componenti cellulari. Un

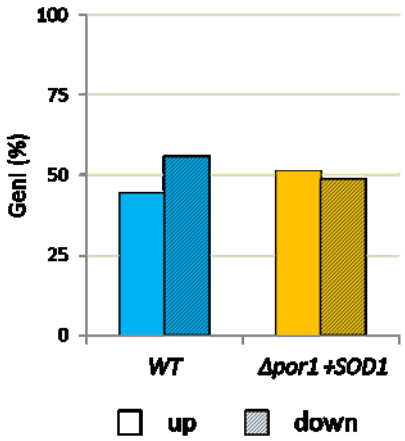


Figura 3.11 Livelli di geni risultati sovraespressi o sottoespressi nei ceppi wt e Δ*por1*+hSOD1 relativamente al ceppo di controllo. Δpor1.

prodotto genico ha una o più funzioni cellulari, può essere coinvolto in diversi processi biologici e infine può essere associato a diversi compartimenti cellulari. Dato che la funzione molecolare è singola, mentre la stessa funzione molecolare può essere associata a più processi biologici, uno stesso gene è presente in più famiglie funzionali.

I geni che risultano variati in questo esperimento, sono stati suddivisi in due gruppi diversi (fig.3.11), geni sovraespressi e sottoespressi. Successivamente le liste di questi geni sono stati sottomessi al tool bioinformatico Gene Ontology (http://geneontology.org/) per la ricerca delle famiglie funzionali a cui i geni appartengono. Le tabelle seguenti mostrano i processi biologici e le funzioni molecolari che risultano variate.

FUNZIONE MOLECOLARE					
Wt BY4742					
UP			DOWN		
GO Term	N	%	GO Term	N	%
catalytic activity (GO:0003824)	215	54,6	catalytic activity (GO:0003824)	295	47
binding (GO:0005488)	107	27,2	binding (GO:0005488)	153	24,4
transporter activity (GO:0005215)	49	12,4	structural molecule activity (GO:0005198)	100	15,9
structural molecule activity (GO:0005198)	13	3,2	transporter activity (GO:0005215)	53	8,4
receptor activity (GO:0004872)	5	1,3	translation regulator activity (GO:0045182)	18	2,9
signal transducer activity (GO:0004871)	3	0,8	receptor activity (GO:0004872)	6	1
antioxidant activity (GO:0016209)	2	0,5	antioxidant activity (GO:0016209)	3	0,4
total	394	100	total	628	100

Tabella 3.1. Funzioni molecolari dei geni sovraespressi (sinistra) e sottospressi (destra) del ceppo wt BY4742. N=numero totale dei geni. %=percentuale dei geni appartenenti alla famiglia funzionale calcolata sul totale dei geni sovraespressi (total N sinistra) o sottoespressi (total N destra).

FUNZIONE MOLECOLARE					
Δpor1 + hSOD1					
UP			**DOWN**		
GO Term	**N**	**%**	**GO Term**	**N**	**%**
catalytic activity (GO:0003824)	274	47	catalytic activity (GO:0003824)	234	53,5
binding (GO:0005488)	137	23,5	binding (GO:0005488)	122	27,9
structural molecule activity (GO:0005198)	101	17,3	transporter activity (GO:0005215)	55	12,6
transporter activity (GO:0005215)	47	8,1	structural molecule activity (GO:0005198)	12	2,7
translation regulator activity (GO:0045182)	15	2,6	antioxidant activity (GO:0016209)	5	1,2
receptor activity (GO:0004872)	7	1,2	receptor activity (GO:0004872)	4	0,9
signal transducer activity (GO:0004871)	2	0,3	translation regulator activity (GO:0045182)	3	0,7
			signal transducer activity (GO:0004871)	2	0,5
Total	583	100	Total	437	100

Tabella 3.2. Funzioni molecolari dei geni sovraespressi (sinistra) e sottospressi (destra) del ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1. N=numero totale dei geni. %=percentuale dei geni appartenenti alla famiglia funzionale calcolata sul totale dei geni sovraespressi (total N sinistra) o sottoespressi (total N destra).

PROCESSI BIOLOGICI					
Wt BY4742					
UP			**DOWN**		
GO Term	**N**	**%**	**GO Term**	**N**	**%**
metabolic process (GO:0008152)	254	33,9	metabolic process (GO:0008152)	411	39,9
cellular process (GO:0009987)	236	31,5	cellular process (GO:0009987)	372	36,2
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	74	9,9	cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	117	11,4
localization (GO:0051179)	71	9,5	localization (GO:0051179)	71	6,9
biological regulation (GO:0065007)	53	7,1	biological regulation (GO:0065007)	31	3
response to stimulus (GO:0050896)	51	6,8	response to stimulus (GO:0050896)	23	2,2
reproduction (GO:0000003)	5	0,7	developmental process (GO:0032502)	3	0,3
developmental process (GO:0032502)	3	0,4	reproduction (GO:0000003)	1	0,1
multicellular organismal process (GO:0032501)	1	0,1			
growth (GO:0040007)	1	0,1			
total	749	100	total	1029	100

Tabella 3.3. Processi biologici in cui sono coinvolti i geni sovraespressi (sinistra) e sottospressi (destra) del ceppo wt BY4742. N=numero totale dei geni. %=percentuale dei geni appartenenti alla famiglia funzionale calcolata sul totale dei geni sovraespressi (total N sinistra) o sottoespressi (total N destra).

PROCESSI BIOLOGICI					
Δpor1 + hSOD1					
UP			DOWN		
GO Term	**N**	**%**	**GO Term**	**N**	**%**
metabolic process (GO:0008152)	392	39,7	metabolic process (GO:0008152)	271	34,2
cellular process (GO:0009987)	360	36,5	cellular process (GO:0009987)	249	31,4
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	119	12,1	localization (GO:0051179)	77	9,7
localization (GO:0051179)	65	6,6	cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	72	9,1
biological regulation (GO:0065007)	26	2,6	biological regulation (GO:0065007)	59	7,4
response to stimulus (GO:0050896)	22	2,2	response to stimulus (GO:0050896)	52	6,6
developmental process (GO:0032502)	2	0,2	reproduction (GO:0000003)	6	0,8
multicellular organismal process (GO:0032501)	1	0,1	developmental process (GO:0032502)	5	0,6
			multicellular organismal process (GO:0032501)	1	0,1
			growth (GO:0040007)	1	0,1
total	987	100	total	793	100

Tabella 3.4. Processi biologici in cui sono coinvolti i geni sovraespressi (sinistra) e sottospressi (destra) del ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1. N=numero totale dei geni. %=percentuale dei geni appartenenti alla famiglia funzionale calcolata sul totale dei geni sovraespressi (total N sinistra) o sottoespressi (total N destra).

3.3.3 Analisi dell'espressione dei geni mitocondriali

L'analisi dell'espressione genica mediante microarray, non solo fornisce informazioni sulla variazione dell'espressione genica nucleare, ma anche su quella relativa al genoma mitocondriale. Come già descritto nell'introduzione il lievito, possiede un genoma mitocondriale codificante per alcune proteine coinvolte nell'espressione degli stessi geni mitocondriali e di alcune subunità della catena di trasporto degli elettroni. Grazie agli esperimenti effettuati mediante microarray è stato possibile controllare l'espressione genica mitocondriale dei ceppi presi in esame. I risultati mostrati in fig.3.12 mostrano già una notevole differenza tra il lievito wild type e il controllo Δ*por*1. La mancanza di VDAC1 nel lievito causa un abbassamento radicale dell'espressione dei geni codificati dal DNA mitocondriale. Infatti rispetto al Δ*por*1 (controllo), il ceppo BY4742 mostra una sovraespressione

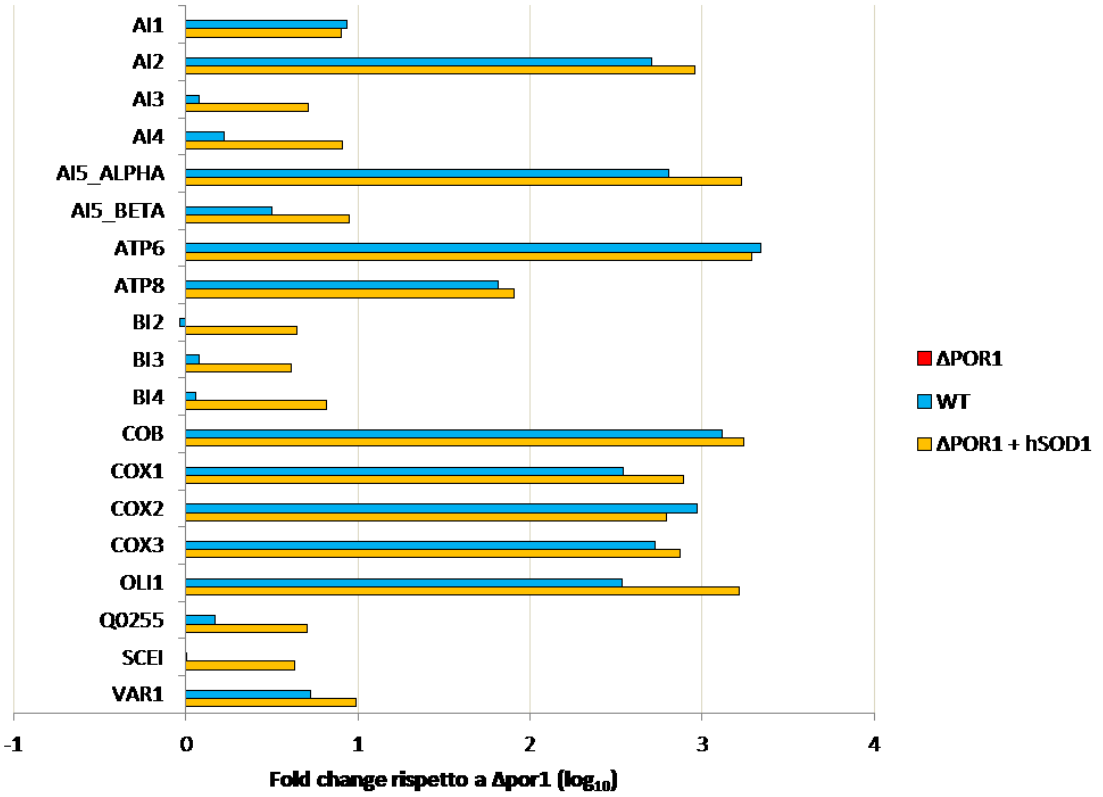


Figura 3.12. Livelli di espressione dei geni codificati dal DNA mitocondriale. È evidente che l'assenza del VDAC1 nel ceppo Δ*por*1 causa uno spegnimento dei geni mitocondriali. La presenza di hSOD1 riaccende l'espressione del DNA mitocondriale di Δ*por1*.

dei geni del DNA mitocondriale. Ciò suggerisce un'implicazione della funzione del VDAC1 nell'espressione del genoma dell'organello, l'assenza del quale impedisce lo scambio di metaboliti attraverso la membrana mitocondriale esterna. Infatti è stato visto che la regolazione del genoma mitocondriale dipende dalla concentrazione di ATP nella matrice mitocondriale dato che l'adenina è il primo nucleotide di tutti i trascritti (Amiott E.A. e Jaehning J.A., 2006). I motivi di tali variazioni potrebbero dipendere direttamente dalla regolazione dell'espressione dei geni mitocondriali, dalle copie di DNA mitocondriale (mtDNA), o dal numero di mitocondri presenti all'interno della cellula. Per risolvere questi dubbi sono stati condotti alcuni esperimenti, volti a capire se la variazione dell'espressione dei geni mitocondriali è correlata a una di queste cause.

3.3.3.1 Quantificazione del DNA mitocondriale mediante PCR Real Time

La quantità di mtDNA è stata verificata mediante PCR Real Time, misurando l'amplificazione di una regione del gene *cox3,* localizzato nel mtDNA. L'amplificazione è stata effettuata a partire da un estratto totale di DNA dai vari ceppi ottenuto come descritto in Looke M. (2011). I primer per i geni *cox3* e *act1,* sono stati disegnati come in Osman C. (2015). Il gene *act1* è stato usato per la normalizzazione dei risultati, mentre il fold-change è stato calcolato rispetto al ceppo wild type. I risultati sono mostrati nella figura 3.13. Nel ceppo Δpor1, i livelli di amplificato del gene *cox3* sono estremamente diminuiti in confronto a quella del ceppo wild type ($p<0.05$). L'espressione di hSOD1 provoca un leggero aumento dei livelli di mtDNA, in particolare di 1/10 rispetto alla quantità presente nel lievito wild type ($p<0.001$). Ciò suggerisce che la mancanza di VDAC1 nella cellula di lievito provochi un riassetto della biogenesi mitocondriale che comporta una riduzione drastica del mtDNA rispetto al wild type. Questo risultato inoltre conferma che, nel ceppo Δ*por*1, il netto calo dell'espressione genica delle proteine mitocondriali è affiancato a una mancanza quasi totale del DNA mitocondriale. Tuttavia la presenza della hSOD1, se da un lato recupera i livelli di espressione genica del DNA mitocondriale, dall'altro non riporta al livello del ceppo wild type la quantità di DNA mitocondriale.

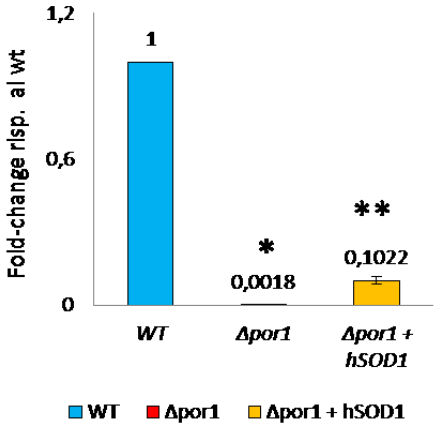


Figura 3.13 Quantificazione relativa del gene *cox3* mediante PCR Real Time. Il gene cox3 codificante una subunità della citocromo ossidasi risulta fortemente ridotto nel ceppo Δpor1 ($p<0.001$ rispetto al wt). L'espressione di hSOD1 provoca un incremento del mtDNA di circa il 10% ($p<0.001$ rispetto al wt).

3.3.3.2 Quantificazione dei mitocondri mediante citofluorimetria

Non sempre la quantità di mtDNA è correlata direttamente alla quantità di mitocondri. Infatti si può avere una variazione nel numero di copie di mtDNA all'interno dei mitocondri in seguito a diversi stimoli, fino alla sua completa perdita come avviene nel caso del fenotipo di lievito chiamato *petite* o *rho 0*. Questo

fenotipo, pur avendo i mitocondri, non presenta mtDNA (Ephrussi B., 1949; Dunn C., 2006), ed è quindi privo dei complessi della catena di trasporto degli elettroni. Esso pur non effettuando la respirazione mitocondriale, riesce a crescere su glucosio, sfruttando interamente il metabolismo fermentativo.

In questo lavoro, per quantificare il numero di mitocondri della cellula, è stata misurata, la fluorescenza del Mitotracker Green mediante citofluorimetria. Il Mitotracker Green è una sonda fluorescente che lega i mitocondri in modo indipendente dal potenziale di membrana. In particolare esso diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica e si accumula nei mitocondri attivi, legando il gruppo tiolico libero delle cisteine delle proteine mitocondriali. È stato visto che la concentrazione di questa sonda è circa 300 volte più alta nella

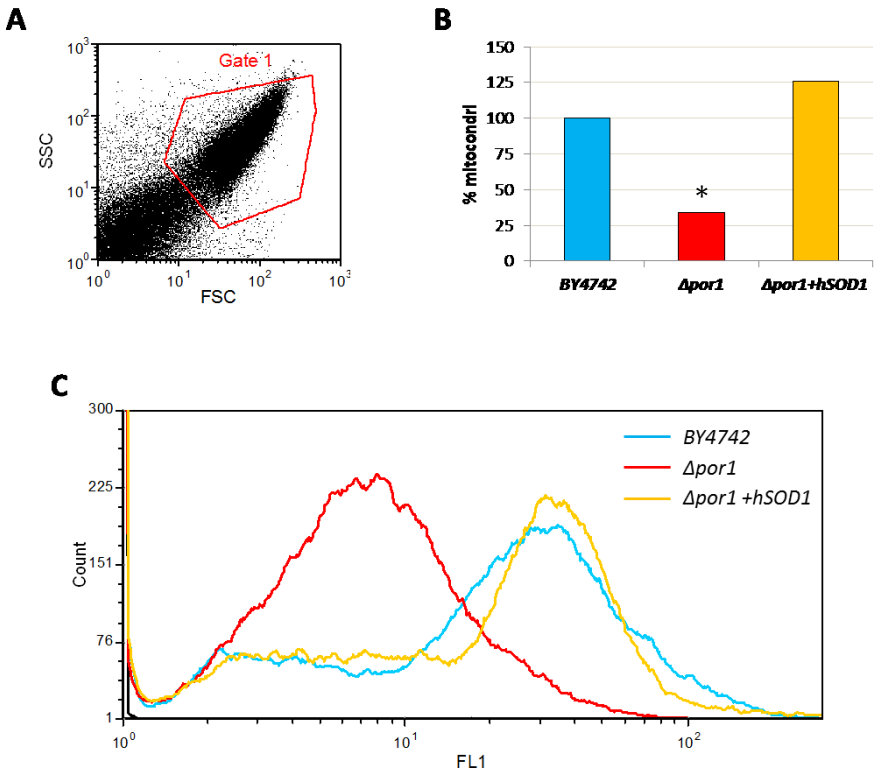


Figura 3.14. Quantificazione della massa mitocondriale mediante citofluorimetria. Il Mitotracker Green legando le proteine mitocondriali indipendentemente dal potenziale della membrana, rivela la massa dei mitocondri della cellule. **A** e **C**: distribuzione della popolazione cellulare. In A, il riquadro rosso indica la popolazione di circa 50000 cellule che è stata scelta per l'analisi. In C è mostrato il grafico FL1 in cui l'intensità di fluorescenza è correlata al numero di cellule. I picchi corrispondenti a BY4742 e Δpor1 + hSOD1 sono sovrapposti indicando che la quantità di mitocondri nei due ceppi è molto simile e maggiore di quella del ceppo Δpor1. **B**: Istogramma ricavato calcolando la percentuale di fluorescenza rispetto al ceppo BY4742. Δ*por*1 presenta un decremento del 75% del numero di mitocondri, rispetto al BY4742 ((*) = p<0.01). L'espressione di hSOD1 causa un aumento della quantità mitocondriale, in modo paragonabile al wild type.

matrice mitocondriale piuttosto che nel citosol probabilmente a causa del pH del compartimento. Per questo motivo la fluorescenza risulta correlata alla massa effettiva totale dei mitocondri.

La figura 3.14 mostra il risultato dell'analisi citofluorimetrica dei ceppi dopo il trattamento con il Mitotracker Green. I picchi del grafico FL1 (fig.3.14C) appaiono stretti e ben compatti, indice di una popolazione omogenea di cellule. L'istogramma in fig.3.14B mostra la quantificazione dei mitocondri, in termini di percentuale relativa al ceppo wt BY4742. I risultati mostrano un decremento nella percentuale della massa mitocondriale del ceppo Δ*por*1 di circa il 70% rispetto al ceppo wild type ($p<0.01$). L'espressione della hSOD1 provoca un aumento della quantità dei mitocondri del ceppo Δ*por1* ripristinando i livelli del ceppo wild type. I risultati ottenuti sono in accordo sia con i risultati dei microarray, che con quelli della PCR Real Time, dimostrando che l'assenza di VDAC1 innesca un meccanismo che porta alla riduzione della massa mitocondriale con conseguente diminuzione del mtDNA. Inoltre in seguito all'espressione di hSOD1, si assiste ad una ripresa (aumento) della massa mitocondriale, che raggiunge livelli molto simili a quelli del ceppo wt.

3.3.4 Conclusione

L'analisi dell'espressione genica ha fornito informazioni riguardanti l'espressione del genoma mitocondriale. E' stato visto che la mancanza della proteina yVDAC1, provoca uno "spegnimento" del mtDNA, in quanto il livello di espressione dei geni mitocondriali delle cellule Δ*por1* sono molto bassi in confronto alle cellule wt. Sono note alcune condizioni in cui la delezione di un determinato gene nucleare comporta la perdita del DNA mitocondriale. Nel caso di questo lavoro, la riduzione dell'espressione genica, nel ceppo Δ*por1*, è accompagnata da una riduzione della quantità di copie di mtDNA e della massa mitocondriale. Probabilmente, questo è dovuto al fatto che la cellula, non riuscendo ad effettuare la respirazione mitocondriale a causa della scarsissima presenza delle subunità della catena di respirazione codificate dal mtDNA, riduce al minimo la biogenesi mitocondriale.

È stato inoltre osservato che l'espressione della proteina hSOD1 riattiva l'espressione dei geni mitocondriali ripristinando la condizione fisiologica del ceppo wt. Contestualmente all'incremento dell'espressione genica nel ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1, si assiste ad un aumento sostanziale della massa mitocondriale ma non a quello del DNA mitocondriale, che aumenta di solo circa il 10% rispetto alla condizione del ceppo wt. Dunque, il recupero della funzionalità mitocondriale del ceppo Δ*por1* in seguito all'espressione della proteina hSOD1 potrebbe essere il risultato dell'aumento della massa mitocondriale con conseguente incremento dell'espressione genica mitocondriale.

3.4. Studio della parete cellulare dei ceppi Δ*por1* e derivati

Il lievito è uno degli organismi più utilizzati come organismo modello per la sua facile manipolazione. Tuttavia alcune sue caratteristiche richiedono alcune precauzioni e reagenti particolari per ottenere determinati risultati. È il caso della parete cellulare, struttura tipica del lievito che protegge la cellula da fattori esterni e ne mantiene la forma. La rottura della parete cellulare è una questione delicata, ben conosciuta da chi manipola frequentemente i lieviti. Infatti se si vogliono isolare organelli del lievito la prima cosa da fare è eliminare la parete cellulare e formare gli sferoplasti, ovvero ottenere le singole cellule circondate esclusivamente dalla membrana plasmatica. Il principale metodo che viene utilizzato per permettere di ottenere gli sferoplasti è l'uso di miscele di endo-glucanase che hanno un'attività specifica nei confronti delle varie componenti della parete e ne permettono la sua degradazione senza distruggere la membrana plasmatica e preservando così tutte le strutture subcellulari.

Durante lo svolgimento degli esperimenti mirati a verificare l'eventuale presenza di hSOD1 nel nucleo delle cellule del ceppo Δ*por1*, era stata programmata l'estrazione di una frazione arricchita di nuclei per effettuare i western blot. Le prove di estrazione dei nuclei dalle colture dei diversi ceppi, hanno permesso di individuare una particolare caratteristica fisica delle cellule del ceppo di lievito Δ*por1* trasformato con hSOD1. In particolare è stato osservato che la Zymolyase,

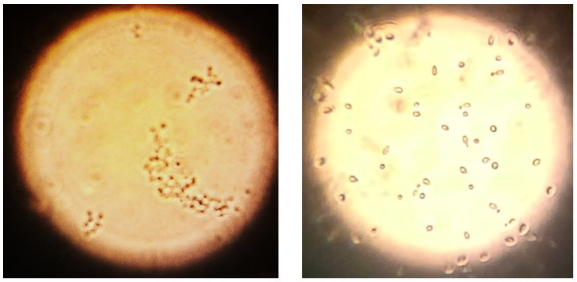


Figura 3.15. Effetto della Zymolyase sui ceppi BY4742 e Δpor1 + hSOD1 osservato al microscopio ottico. I ceppi sono stati trattati con l'enzima per circa 2 ore a 28°C. Dopo l'aggiunta di SDS le cellule del ceppo BY4742 formano questi aggregati a causa della rottura della parete cellulare. Il ceppo Δpor1 + hSOD1 invece, non subisce l'effetto dell'endoglucanase, in quanto SDS non distrugge le membrane plasmatiche delle cellule, che rimangono ben visibili mantenendo la loro forma leggermente ellittica.

un mix di enzimi con attività di endo-glucanase, non ha nessun effetto sulla parete cellulare di Δ*por1* + hSOD1, rendendo così impossibile la formazione degli sferoplasti, necessari per l'estrazione di organuli cellulari integri. La formazione degli sferoplasti, di norma viene seguita al microscopio, aggiungendo qualche goccia di SDS alla coltura trattata con Zymolyase. Come è possibile vedere nelle foto scattate al microscopio ottico in figura 3.15 il lievito BY4742 dopo l'aggiunta di Zymolyase forma gli sferoplasti. Nello specifico le foto sono state scattate dopo 2 ore di trattamento per evidenziare che l'enzima non ha alcun effetto sul ceppo Δ*por*1 trasformato con hSOD1. Infatti il detergente SDS non agisce sulla membrana delle cellule di tale ceppo, lasciandole intatte anche dopo il trattamento con Zymolyase. Al contrario, gli sferoplasti del ceppo BY4742 in presenza di SDS si disgregano e danno luogo agli aggregati visibili nella figura di sinistra.

3.4.1 Test di sensibilità alla Zymolyase

Dopo aver constatato, al microscopio, l'inefficacia della Zymolyase sul ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1, è stato messo a punto un test di sensibilità per confrontare i livelli di resistenza all'enzima, dei diversi ceppi. Le colture di lievito in fase esponenziale (OD_{600}=0.8), sono state trattate con 60 µg di Zymolyase 100T. Dopo l'aggiunta dell'enzima è stato misurato l'OD_{600} ogni mezz'ora per un totale di 2 ore. Il grafico, in fig. 3.15 mostra il risultato medio di 3 esperimenti indipendenti. La sensibilità è stata calcolata come percentuale del decremento dell'OD_{600} nel tempo rispetto all'OD_{600} iniziale. Il ceppo di lievito wild type già nella prima mezz'ora raggiunge un decremento pari al 95% dell'OD_{600} iniziale ($p<0.01$). Ciò dimostra che la Zymolyase agisce in modo specifico sulla parete di questo ceppo, facendo diminuire la densità ottica della coltura che è interamente dovuta alla parete cellulare. Un effetto opposto si può notare per il ceppo deleto della porina mitocondriale, che risulta meno sensibile del ceppo wild type, con una diminuzione di circa il 25% della sua OD_{600} ($p<0.01$). Questa ridotta sensibilità viene ancor più diminuita dalla presenza della SOD1 umana, la quale rende il ceppo Δ*por*1 estremamente resistente all'enzima: dopo 2 ore di trattamento l'OD_{600} non accenna a diminuire mantenendo l'OD_{600} iniziale. L'espressione di hSOD1mutante S60/99A, riporta la sensibilità del ceppo Δ*por*1 a livelli simili a quelli del ceppo

wild type BY4742, mostrando ancora una volta che la mutazione delle serine fosforilabili della hSOD1 in alanine, annulla l'effetto che la proteina wild type conferisce al ceppo deleto della porina mitocondriale. Inoltre l' effetto osservabile in seguito all'espressione della proteina SOD1 di lievito nel Δ*por*1 conferma che è unicamente la proteina SOD1 umana a causare anomalie nella struttura della parete della cellula. La ridotta sensibilità del ceppo Δ*por*1 trasformato con hSOD1, dimostra che la Zymolyase non riesce ad esplicare la sua attività sulla parete cellulare, probabilmente perché la parete presenta una modificazione della composizione in β1,3-glucani, che costituiscono il bersaglio dell'endo-glucanase o lo strato esterno di mannoproteine che limita la permeabilità della parete alle molecole.

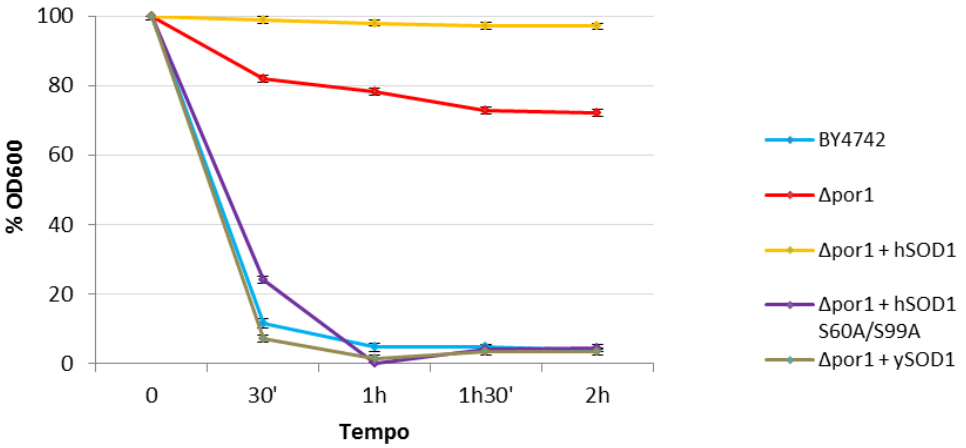


Figura 3.16. Test di sensibilità alla Zymolyase. Le colture in fase esponenziale sono state trattate con 60 µg di Zymolyase 100T, ed è stato misurato l'OD_{600} prima e ogni mezz'ora dopo l'aggiunta dell'enzima, per un totale di 2 ore. Dopo mezz'ora il ceppo BY4742 riduce la densità ottica del 95%, al pari dei ceppi Δ*por1* trasformati con ySOD1 e con il mutante hSOD1 S60/99A. La presenza di hSOD1 wt conferisce al Δ*por1* un'alta resistenza, in quanto l'OD_{600} non diminuisce rimanendo costante a valori molto alti ($p<0.01$ rispetto al ceppo wt). La sola mancanza di VDAC1 invece, provoca una debole resistenza indicata da un decremento dell'OD_{600} pari al 30% ($p<0.01$ rispetto al ceppo wt).

3.4.2 Rimodellamento dello strato di chitina

3.4.2.1 saggi di diluizioni seriale su Calcofluor White

Il Calcofluor White (CFW, Fig. 3.17) è una molecola fluorescente carica negativamente che lega i polimeri nascenti di chitina (polisaccaridi β-1,3 β-1,4)

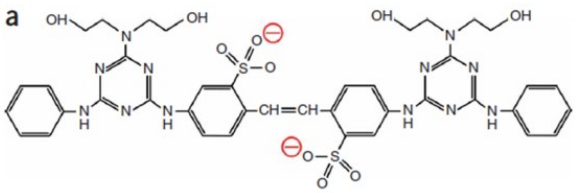


Figura 3.17 Formula di struttura del Calcofluor White. Sono ben visibili gli anelli benzenici con le cariche negative necessarie per la diffusione passiva all'interno delle cellule.

attraverso legami idrogeno e interazioni dipolo, impedendo così la cristallizzazione e la formazione di microfibrille. Quando il lievito cresce in presenza di Calcofluor White il ciclo cellulare non progredisce e la chitina tende ad accumularsi all'interno della cellula. Inoltre si formano strutture multicellulari in seguito ad un'incompleta separazione tra cellula madre e cellula figlia e ad un anomalo assemblaggio del setto. Al microscopio la fluorescenza del CFW, in seguito a legame con la chitina, è di norma osservabile, debolmente sulle pareti laterali, e più intensamente nel punto in cui la cellula sta gemmando (il cosiddetto anello di chitina del setto di divisione) o a livello del *bud-scar*, ovvero della cicatrice rimasta in seguito alla separazione tra cellula figlia e cellula madre (Elorza M.V., 1983).

In questo lavoro, sono stati effettuati saggi di diluizione seriale su terreno solido YPD addizionato di 10, 50, 100 µg/ml di CFW. Le piastre sono state incubate ad una temperatura di 28°C per 3-4 giorni, al termine dei quali, esse sono state esposte alla luce UV per evidenziare la fluorescenza di CFW. Nella figura 3.18 è mostrato il risultato delle diluizioni seriali. Già alla concentrazione di 10 µg/ml di CFW sono evidenti difficoltà di crescita del ceppo Δ*por1* rispetto alla crescita dello stesso ceppo che si ottiene su terreno completo.

Questa sensibilità aumenta sempre di più all'aumentare della concentrazione, fino ad inibire la crescita di Δ*por1* alla massima concentrazione testata (100 µg/ml). L'espressione di hSOD1 invece conferisce resistenza al CFW in quanto il ceppo non presenta alcuna difficoltà di crescita: la crescita è paragonabile a quella del ceppo wild type BY4742. Il ceppo Δ*por1* trasformato con la hSOD1 mutante S60/99A, mostra invece un livello di crescita molto più simile a quello del Δ*por1* trasformato con il vettore vuoto, suggerendone una simile sensibilità al CFW. In fig. 3.18, in basso, sono mostrate le foto delle piastre irradiate con una lampada UV per visualizzare la fluorescenza del composto in seguito al suo legame con la chitina. È subito chiaro che tutti i ceppi analizzati sono fluorescenti, tranne il ceppo Δ*por1* che esprime hSOD1, il quale risulta opaco rispetto al ceppo wt, pur essendo

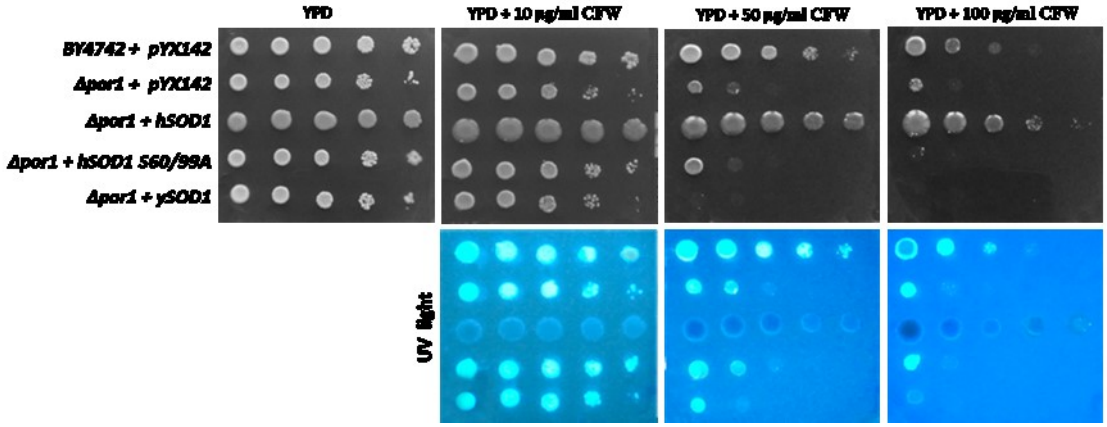


Figura 3.18. Diluizioni seriali su terreno completo addizionato di Calcofluor White (CFW) a 10, 50, 100 µg/ml. Già a 10 µg/ml il ceppo Δ*por1* mostra una leggera sensibilità che aumenta al crescere della concentrazione. Il ceppo Δpor1 trasformato con hSOD1 risulta il più resistente riuscendo a resistere alla concentrazione testata più elevata. In basso, le piastre sono state illuminate con una lampada a raggi UV. Tutti i ceppi risultano fluorescenti a causa del legame del CFW con la chitina. L'unico a risultare opaco è il ceppo Δ*por1* che esprime la proteina hSOD1.

similmente resistente al CFW. Ciò suggerisce che nel ceppo Δ*por1* che esprime hSOD1, il CFW non lega la chitina o per una ridotta quantità o a causa di una ridotta permeabilità della parete.

3.4.2.2 Analisi della quantità di chitina mediante microscopia e citofluorimetria

Il Calcofluor White, oltre ad essere utilizzato come agente che perturba l'integrità della parete cellulare nei saggi di crescita, viene sfruttato in microscopia per visualizzare le componenti di chitina o cellulosa della parete di funghi e piante. Esso infatti emette fluorescenza quando viene eccitato con una lunghezza d'onda di 360nm in modo direttamente proporzionale alla quantità di chitina legata. Gli stessi ceppi analizzati mediante diluizione seriale sono stati osservati al microscopio ad epifluorescenza dopo breve trattamento con CFW. Le foto ottenute mostrate in figura 3.19, evidenziano, innanzitutto, che in campo chiaro i tre ceppi presentano morfologia differente: le cellule del ceppo Δ*por1* appaiono di forma sferica rispetto a quelle del wild type di forma leggermente ellittica. Questa forma tipica della specie *S.cerevisiae* viene mantenuta anche dal ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1 wt. Variazioni nella morfologia cellulare del lievito possono verificarsi in risposta a stress osmotici di varia natura, di cui risentono i ceppi mutanti che

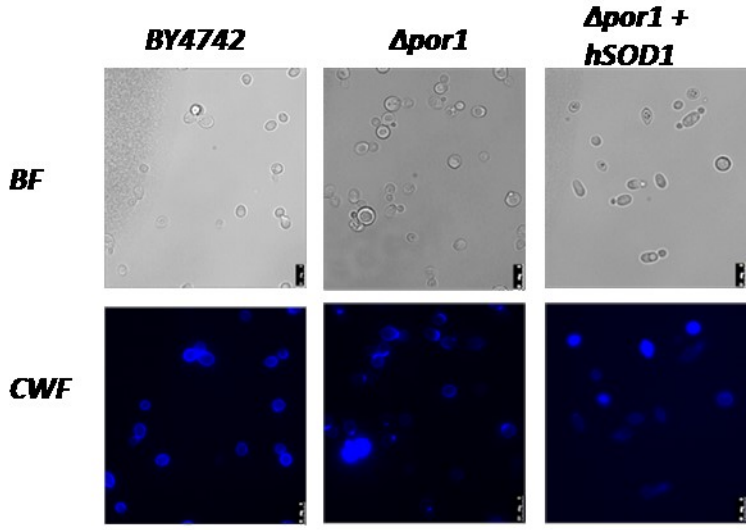


Figura 3.19. Osservazione al microscopio ad epifluorescenza dei ceppi BY4742, Δ*por1* e Δ*por1* + hSOD1. In campo chiaro si notano differenze nella morfologia dei tre ceppi analizzati. Le immagini in fluorescenza rivelano differenze nella quantità e nella localizzazione della chitina. In condizioni fisiologiche nel ceppo wt la chitina è localizzata sul setto di divisione e in scarsa quantità sulle pareti laterali. Δ*por1*presenta chitina esclusivamente sui setti di divisione. In Δ*por1* trasformato con hSOD1 non è visibile la fluorescenza del calcofluorro indicando una probabile assenza di chitina.

presentano una parete debole, o un pathway di mantenimento dell'integrità della parete alterato.

Le colture trattate con CFW ed eccitate con un laser UV mostrano intensità e localizzazione di fluorescenza differente. Nelle cellule del ceppo wt la chitina si localizza principalmente sul setto di divisione, e poco intensamente lungo le pareti laterali. Questa rappresenta la condizione fisiologicamente normale in quanto la chitina viene depositata maggiormente nel punto di gemmazione di una cellula. Il ceppo Δ*por1* presenta una netta riduzione del segnale, localizzato debolmente solo sul setto di divisione, suggerendo un decremento della quantità di chitina. Le cellule del ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1 wt presentano due diverse tipologie di segnale fluorescente. Alcune cellule appaiono colorate in modo omogeneo e se osservate in campo chiaro presentano granulazioni al loro interno. Un altro gruppo di cellule non presentano alcuna fluorescenza, e in campo chiaro corrispondono alle cellule che stanno gemmando.

Una quantificazione statisticamente significativa del segnale fluorescente dovuto al legame del CFW alla chitina è stata effettuata mediante citofluorimetria. Le colture in fase esponenziale di crescita sono state trattate con 50 mM di CFW per 10

minuti e in seguito è stata analizzata la fluorescenza nel canale FL8. I risultati dell'analisi mostrati nella figura 3.20 hanno confermato pienamente ciò che era stato osservato al microscopio. Il ceppo Δ*por1* che esprime hSOD1 presenta una riduzione della fluorescenza di circa 80% in confronto a quella del lievito wild type ($p<0.05$). Tale riduzione si osserva già nel ceppo Δ*por1* ($p<0.05$ rispetto al ceppo wt), ma viene aumentata in presenza della hSOD1. La presenza del mutante S60/99A invece riporta la fluorescenza a un livello simile a quello del ceppo wt.

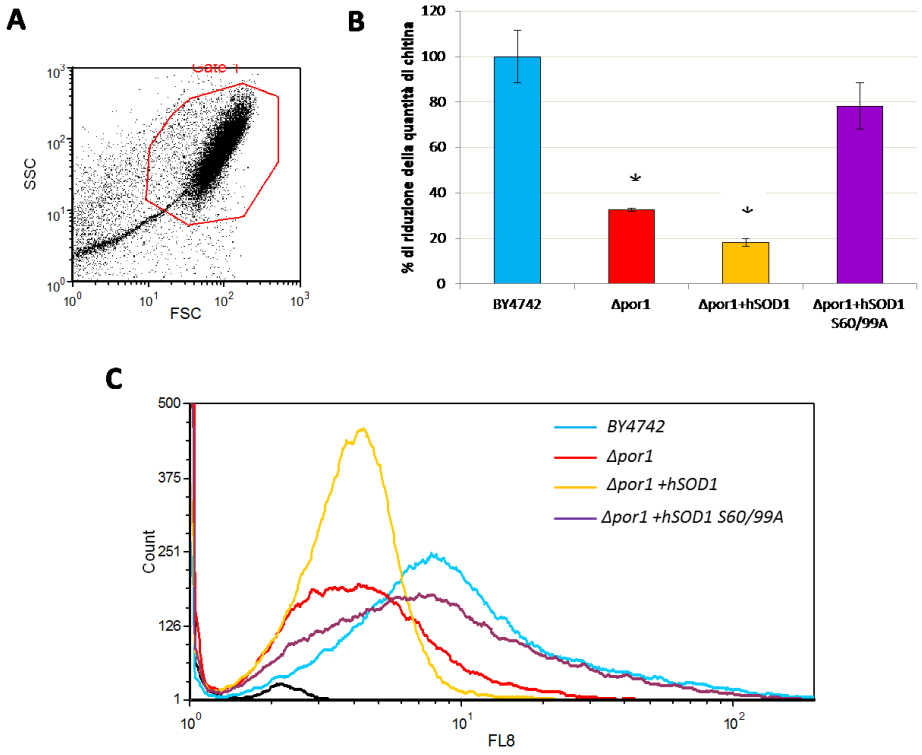


Figura 3.20. Quantificazione del contenuto di chitina mediante citofluorimetria. La fluorescenza a 360 nm è stata misurata nelle colture in fase esponenziale trattate con 50 µg/ml di calcofluoro per 5 minuti. **A**: distribuzione cellulare. La linea rossa racchiude una popolazione omogenea di circa 50000 cellule. **C:** sovrapposizione della fluorescenza dei vari ceppi. Lo spostamento a sinistra del picco del ceppo Δ*por*1 trasformato con hSOD1 indica una minore fluorescenza, ovvero una minore quantità di chitina rispetto al ceppo wt. **B**: quantità di chitina dei vari ceppi in relazione al ceppo wt. (*) = $p<0.05$ rispetto al ceppo wild type.

3.4.3 Saggi di diluizione seriale su altri composti che perturbano la stabilità della parete cellulare

Esistono molti composti in grado di perturbare la parete cellulare, che sono stati utilizzati per identificare i geni coinvolti nella biosintesi delle varie componenti della parete cellulare (de Groot P.W., 2001). Tra questi oltre al Calcofluor White che, come già spiegato precedentemente inibisce la polimerizzazione di chitina (Elorza M.V., 1983), vi è il sodio-dodecil-solfato (SDS), un detergente che destabilizza la membrana plasmatica e di conseguenza la corretta biosintesi della parete, infatti una parete non perfettamente integra presenta un aumentata accessibilità a SDS (Shimizu J., 1994). Altro agente che interferisce con il corretto assemblaggio della parete è costituito dalla caffeina. Questo composto viene generalmente aggiunto alle colture di *S.cerevisiae* per valutare la funzionalità del pathway di Slt2 nota anche come Mpk1, una MAP kinase effettrice che assicura l'integrità della parete cellulare. I mutanti con problemi a questo pathway sono sensibili alla caffeina. Il risultato di questa cascata è l'attivazione del fattore di trascrizione Rlm1 che controlla i geni relativi al cell wall (Smits A., 2001; Jung U.S., 2002). Questo pathway è in grado di proteggere l'integrità cellulare e per questo motivo viene attivato in condizioni che compromettono la stabilità della parete cellulare: alta temperatura, shock iposmotico, danni alla biosintesi della parete, esposizione ad agenti che legano la parete come CFW, Congo red, Zymolyase.

3.4.3.1 Saggi di diluizione seriale su caffeina

In questo lavoro la caffeina è stata aggiunta al terreno completo YPD con una concentrazione di 12 mM addizionato di agar per la preparazione di piastre su cui effettuare i saggi di diluizione seriale. Oltre alla caffeina in una piastra è stato aggiunto 0.5M sorbitolo, uno zucchero non degradabile dalla cellula che serve per variare l'osmolarità del terreno di crescita. In questo modo è possibile testare se viene attivata la via metabolica relativa alla risposta all'iperosmolarità (HOG pathway) oltre a quella di mantenimento dell'integrità della parete, in quanto una ripresa di crescita.

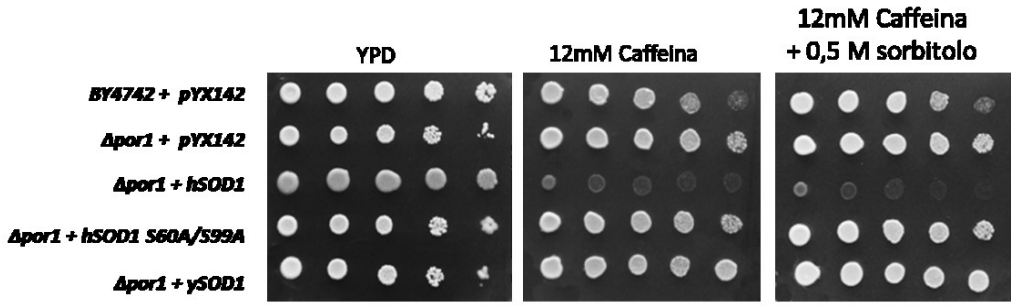


Figura 3.21. Saggi di diluizione seriale su terreno completo addizionato di 12 mM di Caffeina, o 12 mM Caffeina in presenza di 0,5 M Sorbitolo. L'assenza della porina mitocondriale non causa particolari difetti di crescita su caffeina, permettendo al ceppo *Δpor1* di crescere a livelli simili a quelli del ceppo wt. Tra tutti l'unico ceppo che mostra difficoltà di crescita è il ceppo *Δpor1*trasformato con hSOD1. Tale difficoltà di crescita si presenta anche su sorbitolo. L'espressione di hSOD1 mutante e di ySOD1 non conferisce particolari fenotipi di crescita sui substrati testati, che risultano essere simili a quelli del ceppo wt.

Le piastre sono state incubate a 28°C insieme alla piastra di controllo YPD senza caffeina. Il risultato è mostrato nella figura 3.21. Come è possibile osservare, i ceppi testati non mostrano particolari difficoltà di crescita in presenza di caffeina eccetto il ceppo Δ*por*1 trasformato con hSOD1, il quale presenta una crescita difettiva sia su caffeina che su caffeina addizionata di sorbitolo. Questo risultato suggerisce chiaramente che la presenza della proteina hSOD1 nel Δ*por1* causa anomalie nel pathway di trasduzione del segnale che assicura l'integrità della parete cellulare. Da notare come l'espressione della proteina mutante hSOD1 S60A/S99A riporta ad un fenotipo di crescita simile a quello del ceppo Δ*por1.*

3.4.3.2 Saggi di diluizione seriale su SDS

Il sodio dodecil fosfato, o SDS, è un detergente anionico che a basse concentrazioni interferisce con la normale biosintesi della parete cellulare. Normalmente la parete cellulare è impermeabile a SDS, ma se viene sottoposta a qualche stress che ne causa il suo rimodellamento, le molecole possono infiltrarsi attraverso di essa e raggiungere la membrana plasmatica intaccandone la stabilità e favorendo la lisi cellulare. In questo lavoro, 400 µg/ml di SDS sono stati aggiunti al terreno YPD e su tale terreno solido sono state depositate le diluizioni seriali delle varie colture. Dopo 2 e 4 giorni di incubazione a 28°C è stato osservato il risultato, mostrato in

figura 3.22. Già al secondo giorno di incubazione è evidente che, mentre i ceppi Δ*por1* presentano una crescita ridotta rispetto al wild type, il ceppo Δ*por1* trasformato con SOD1 risulta essere l'unico sensibile alla presenza di SDS, e non riesce a crescere nemmeno dopo 4 giorni di incubazione. Questo risultato potrebbe far pensare ad un rimodellamento della parete cellulare che permette l'ingresso della molecola testata attraverso la parete rendendo la membrana plasmatica più accessibile e più soggetta all'azione dell'SDS.

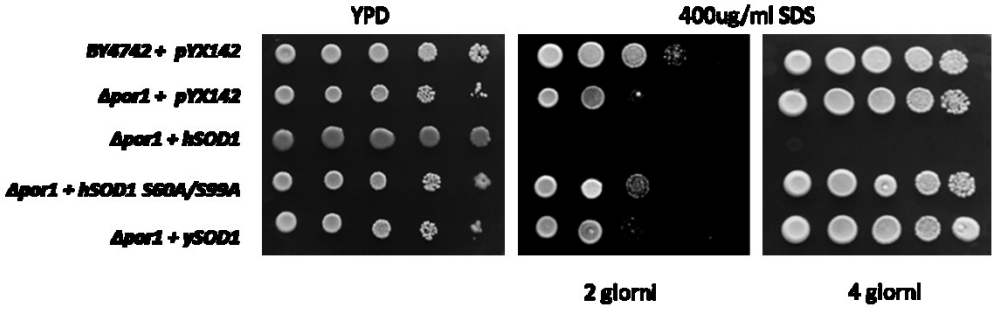


Figura 3.22. Saggi di diluizione seriale su terreno completo addizionato di SDS. Le piastre su cui sono state depositate le diluizioni delle colture sono state incubate per 4 giorni a 28°C. Dopo 2 giorni, Δ*por1* trasformato con SOD1 presenta difficoltà di crescita, che continuano anche al 4°, rispetto al controllo Δ*por1* e wt. Di contro i ceppi controllo BY4742 e Δ*por1*, non mostrano difetti nella crescita. La trasformazione con hSOD1 S60/99A riporta allo stesso fenotipo dei ceppi controllo.

3.4.5 Conclusione

L'applicazione del protocollo di formazione degli sferoplasti, necessario per l'estrazione dei nuclei, ha permesso di osservare una particolare resistenza all'enzima Zymolyase del ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1. Questa osservazione ha dato inizio all'approfondimento dello studio della parete cellulare. I saggi effettuati per verificare le resistenze a diversi tipi di composti hanno rivelato che la parete cellulare del ceppo Δ*por1* che esprime hSOD1 ha subito un rimodellamento che da una parte lo rende più resistente all'endoglucanase e al Calcofluor White, dall'altra invece aumenta la sua sensibilità a caffeina e SDS. La resistenza alla Zymolyase, suggerisce una modificazione a livello dei β1,3-glucani e dei β1,6-glucani che costituiscono lo strato più spesso della parete cellulare. La chitina, rivelata dal legame con il composto fluorescente CFW, risulta essere scarsamente presente nel ceppo Δ*por1* che esprime la proteina SOD1. L'aumentata

resistenza di questo ceppo a Zymolyase e CFW è contrapposta alla sensibilità nei confronti di caffeina e SDS. L'assenza di crescita su SDS, suggerisce che il rimodellamento ha reso la parete più lassa permettendo la diffusione delle molecole di detergente attraverso di essa, le quali degradano la membrana plasmatica impedendo la riproduzione delle cellule. Infine la sensibilità alla caffeina dimostra che nel ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1, è attiva la via metabolica di mantenimento dell'integrità di parete, mediata dalle MAP-kinasi Slt2, la quale viene inattivata dalla caffeina stessa, impedendo la crescita del ceppo. La mancata ripresa di crescita su caffeina in seguito all'aggiunta di sorbitolo mostra che il rimodellamento della parete non è dovuto all'attivazione della via di risposta all'osmoregolazione.

SENSIBILITÀ		Agente chimico			
		Zymolyase	**Calcofluor**	**Caffeina**	**SDS**
Ceppi	**BY4742**	si	no	no	no
	Δpor1	intermedio	si	no	no
	Δpor1+hSOD1	no	no	si	si
	Δpor1+hSOD1 S60A/S99A	si	si	no	si

Tabella 3.5. Riepilogo della sensibilità dei vari ceppi agli agenti chimici.

3.5 La seconda isoforma di VDAC nel lievito *S.cerevisiae*

Nel lievito *S.cerevisiae* esistono due geni che codificano per le proteine VDAC della membrana mitocondriale esterna. Il gene *por1* codifica per la prima isoforma yVDAC1, la forma più abbondante e più studiata. È stato individuato pure un secondo gene, *por2,* codificante per una proteina le cui predizioni bioinformatiche prevedono una struttura β-barrel. Questa proteina non è mai stata estratta dai mitocondri a causa della sua scarsa abbondanza.

In questo lavoro, alla luce dei risultati di PCR Real Time che mostrano un aumento dell'espressione di *por2* nel ceppo Δ*por*1 trasformato con hSOD1, è stato intrapreso lo studio di tale proteina. In particolare, in un primo momento è stata prodotta la proteina ricombinante per effettuare una caratterizzazione di tipo elettrofisiologico. Successivamente è stata analizzata la funzionalità della proteina direttamente in vivo utilizzando come organismo modello diversi ceppi di lievito *S.cerevisiae*.

3.5.1 Caratterizzazione elettrofisiologica della proteina ricombinante yVDAC2

3.5.1.1 Espressione eterologa della proteina yVDAC2 in *E.coli*

Per ottenere la proteina ricombinante, la sequenza codificante ottenuta mediante amplificazione dei cDNA ricavati dagli RNA estratti da *S.cerevisiae* è stata clonata all'interno del vettore pET21A, specifico per l'espressione in *E. coli*. Il protocollo di espressione è stato ottimizzato testando diverse concentrazioni di IPTG, diverse temperature e tempi di incubazione (fig. 3.23A), e alla fine le condizioni ritenute migliori sono state una concentrazione di IPTG pari a 4mM, una temperatura di 30°C per un tempo totale di 3 ore di induzione.

Una volta effettuata l'induzione, il pellet cellulare è stato lisato con un tampone di lisi contenente un'alta concentrazione di urea, adatto a denaturare e solubilizzare tutte le proteine di ogni compartimento cellulare. Un'aliquota di lisato del campione indotto insieme a quello del campione non indotto sono stati caricati su un gel di poliacrilammide 12% per controllare mediante SDS-PAGE che l'induzione della proteina eterologa fosse avvenuta. Successivamente il lisato proteico è stato

purificato mediante cromatografia di affinità sfruttando la tag di 6xHis, e in seguito le eluizioni sono state caricate per controllare quale frazione contenesse la proteina. In fig. 3.23B è possibile osservare il risultato della corsa elettroforetica delle varie frazioni dell'eluato. L'espressione della proteina yVDAC2 è avvenuta con successo: nell'indotto è presente una banda a circa 30 kDa che non è visibile nel campione non indotto. Utilizzando un'aliquota di campione non indotto e un'aliquota della 3° eluizione è stato effettuato un western blot con l'anticorpo anti-6xHis al fine di verificare che la proteina estratta sia quella desiderata (fig.3.22C). Infine parte della 3° eluizione, contenente gran parte della proteina è stata refoldata in 1%LDAO e dializzata al fine di ottenere una proteina ripiegata correttamente in una soluzione priva di tracce di urea. La proteina ricombinante così ottenuta è stata utilizzata per effettuare la caratterizzazione elettrofisiologica al bilayer artificiale.

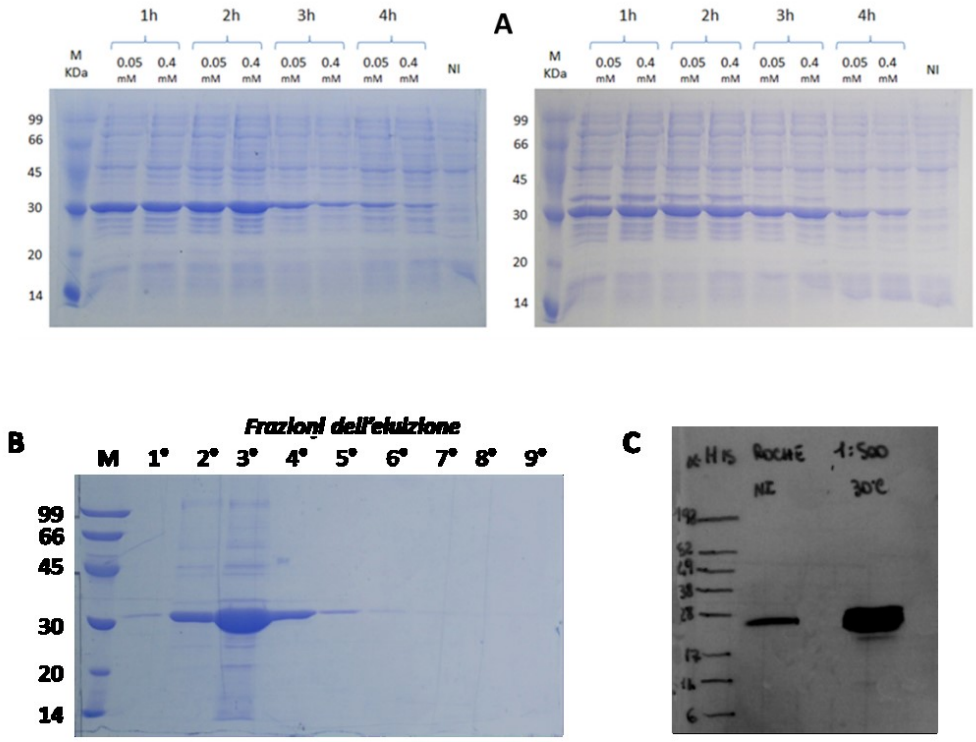


Figura3.23. SDS-PAGE di controllo della purificazione della proteina ricombinante. A: Prove di induzione a diversa concentrazione di IPTG, temperature e tempi. Le condizioni ottimali sono state definite in 0.4mM IPTG, 30°C,e 3 ore. **B**: gel elettroforetico delle frazioni dell'eluizione. La proteina è maggiormente presente nella terza frazione. **C**: Western blot del lisato non indotto e della 3°frazione dell'eluizione.. Nella lastra autoradigrafica è evidente che l'anticorpo anti-6xhis ha riconosciuto una singola banda all'altezza di circa 28 KDa, sovrapponibile alla banda del gel elettroforetico in B.

3.5.1.2 Analisi della conduttanza e della voltaggio dipendenza della proteina yVDAC2 ricombinante

La ricostituzione in un bilayer artificiale della proteina yVDAC2 ricombinante ha permesso di verificare la sua attività e di descrivere le sue proprietà fisiologiche. Per prima cosa è stata determinata la conduttanza del canale, ovvero la capacità che ha il canale, una volta ricostituito, di far passare ioni da un lato all'altro della membrana. Questo parametro ci dà informazioni sulla grandezza del poro della proteina canale, e in base alla specie di ioni che passano, quindi alla corrente ionica generata, si può capire se il canale è selettivo per i cationi o per gli anioni (vedi prossimo paragrafo).

In questo lavoro, la conduttanza della proteina yVDAC2 è stata misurata riempiendo i due compartimenti della cuvetta del bilayer artificiale con una soluzione salina 1M KCl pH 7. Sul setto di divisione dei due compartimenti è stata dipinta una membrana fosfolipidica, a cui è stata applicata una differenza di potenziale di 10 mV. La soluzione contenente la proteina yVDAC2 è stata aggiunta al compartimento *cis* non appena la membrana è apparsa ampia e stabile, con una capacità intorno a 150 pF. La proteina, sebbene dopo lunghe attese, è stata in grado di inserirsi in membrana formando canali che lasciano passare una corrente ionica di circa 40 pA, come mostrato nella traccia rappresentativa in figura 3.24.

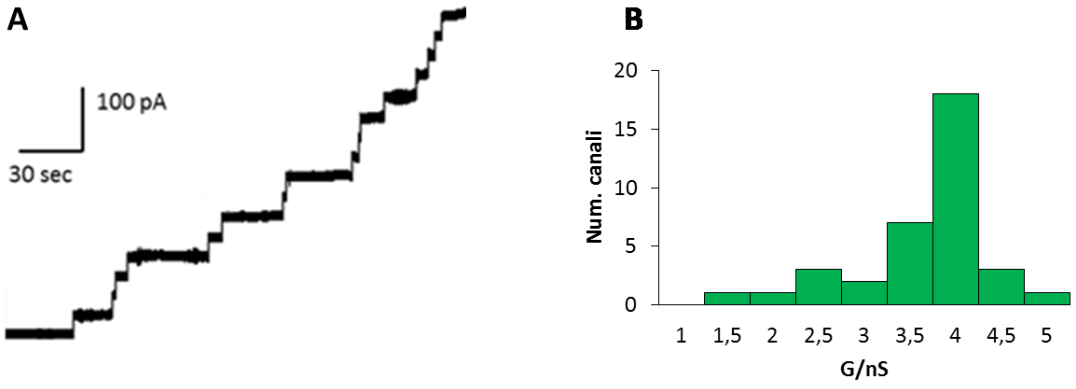


Figura 3.24. Analisi della conduttanza della proteina yVDAC2 ricombinante. A: Traccia rappresentativa delle inserzioni su membrana di fosfatidilcolina in 1 M KCl pH7 a 10mV. **B** Distribuzione delle conduttanze ottenute per le 112 inserzioni.

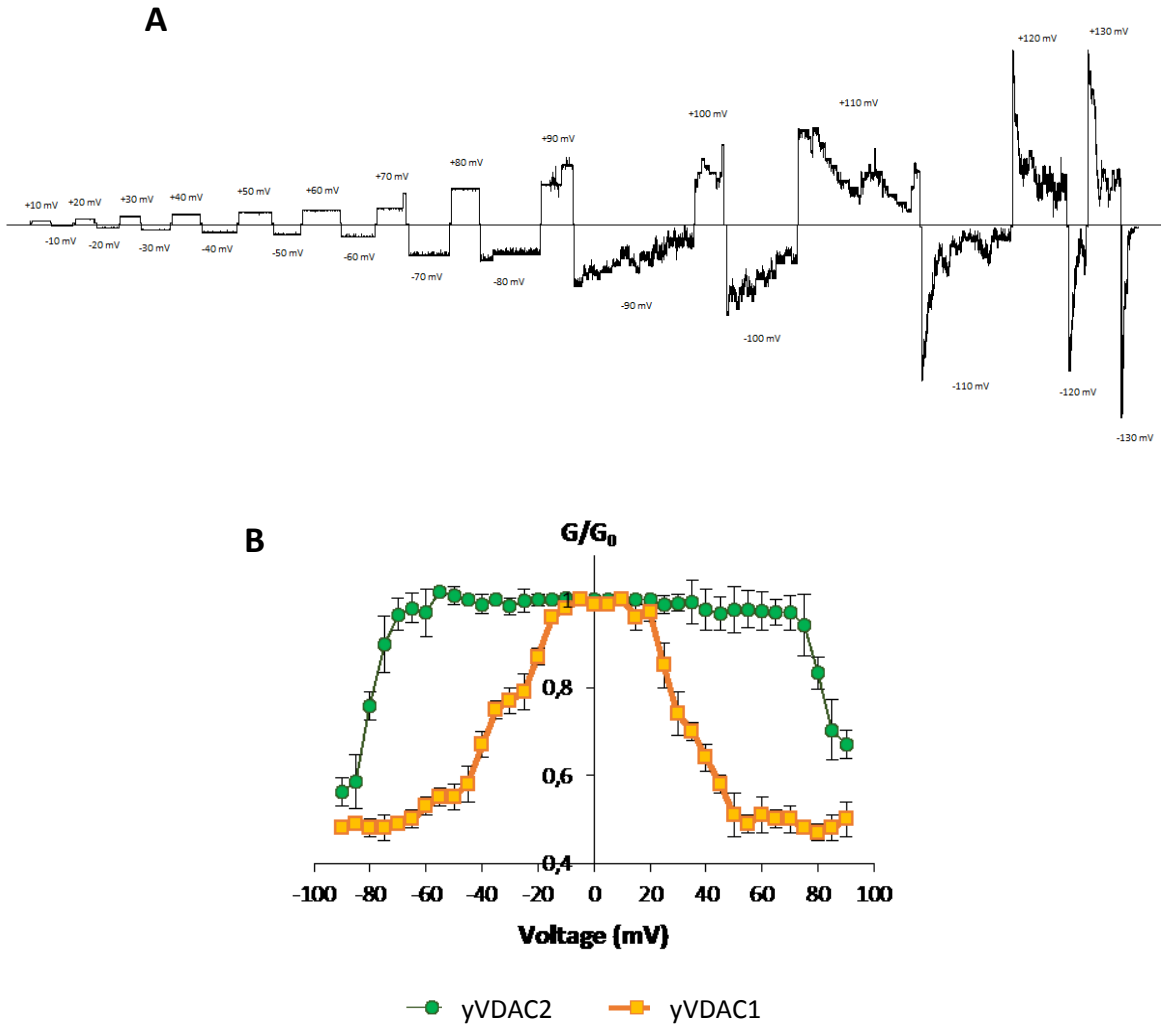


Figura 3.25. Analisi della voltaggio dipendenza. A:traccia rappresentativa della curva di voltaggio dipendenza di yVDAC2 ottenuta applicando alternativamente voltaggi positivi e negativi in funzione del tempo dopo la ricostituzione in membrana di 5 canali. **B:**Curva a campana di correlazione tra G/G_0 e il voltaggio applicato ottenuta dall'analisi di 6 esperimenti indipendenti. G/G0 è il rapporto tra la conduttanza ad un dato voltaggio V_m e la conduttanza iniziale a 10 mV. La curva in verde mostra una tendenza del canale yVDAC2 a diminuire la sua conduttanza a partire da ± 80 mV, diversamente da yVDAC1 (giallo)

La conduttanza, calcolata dividendo i valori di corrente per il voltaggio applicato (pA/mV), è risultata essere di circa 4 nS. Il risultato è un valore medio calcolato su un centinaio di inserzioni ottenute in diversi esperimenti con deviazione standard di ±0,83. Una volta ottenute le inserzioni in membrana, è stata testata la dipendenza dal voltaggio, ovvero il comportamento che assume il canale in seguito all'applicazione di voltaggi crescenti, positivi o negativi. A differenza della prima isoforma che normalmente passa ad uno stato di bassa conduttività già a ±30 mV

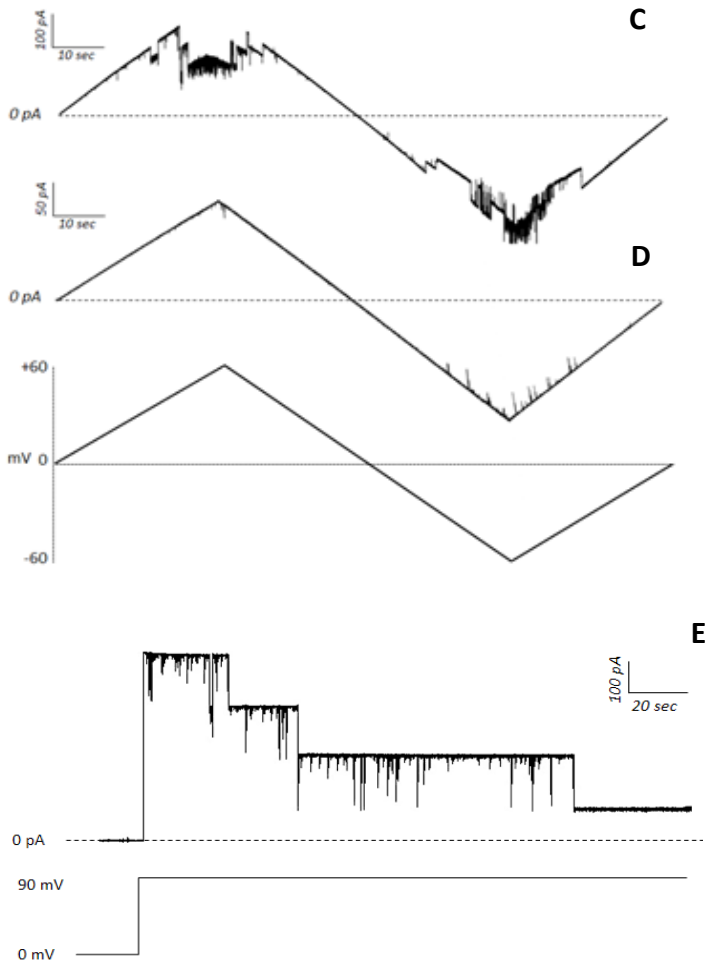


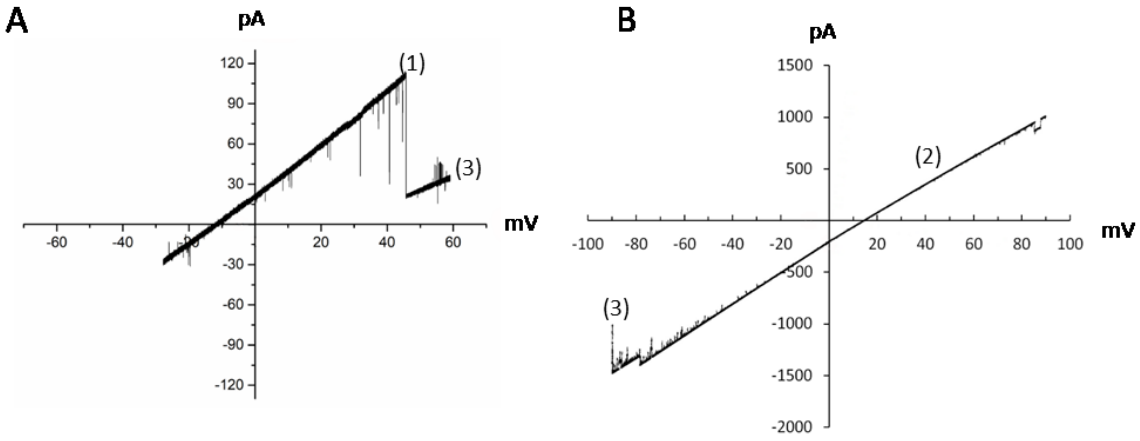
Figura 3.25 Analisi della voltaggio dipendenza. In alto sono mostrate le tracce rappresentative della dipendenza dal voltaggio ottenuta applicando rampe continue di voltaggio (curve triangolari) comprese tra ± 60mV, dopo la ricostituzione in membrana di 5 canali. (C) yVDAC1; (D) yVDAC2. yVDAC2 non cambia il suo stato in nessun punto della rampa, al contrario di yVDAC1 il quale passa ad uno stato chiuso quando i mV applicati superano i ± 30 mV. (D) Applicazione di un voltaggio pari a +90 mV dopo l'inserzione di 3 canali yVDAC2. È subito evidente che a pochi secondi dall'applicazione del voltaggio i canali iniziano a chiudersi.

(fig. 3.25 B e C), yVDAC2 ricombinante è risultata scarsamente voltaggio-dipendente in quanto passa allo stato chiuso solo a valori superiori a ±80 mV (fig.3.25 A, C e D). In fig. 3.25 A, è mostrata una traccia della curva di voltaggio-dipendenza ottenuta applicando voltaggi alternati in positivo e negativo da ±10 mV a ±130 mV dopo l'inserzione di circa 5 canali. Prendendo in considerazione i dati ottenuti in 6 esperimenti simili effettuati utilizzando separatamente yVDAC1 estratto da mitocondri di *S.cerevisiae* e yVDAC2 ricombinante è stato elaborato il grafico B (fig. 3.25) che mette in correlazione la conduttanza con il voltaggio

applicato. Questo fornisce i risultati della media di diversi esperimenti e mostra chiaramente come all'aumentare del voltaggio, sia verso valori positivi che verso quelli negativi, la conduttanza si abbassa. In particolare, yVDAC2 ricombinante subisce un decremento della conduttanza quando la differenza di potenziale applicata supera ±80mV. Questo comportamento è ben diverso da quello osservato per yVDAC1, la cui proteina passa allo stato chiuso quando il voltaggio applicato è pari a ±30mV (fig. 3.25 C).

3.5.1.3 Analisi della selettività ionica

La selettività ionica della proteina ricombinante è stata testata misurando il potenziale di reversione corrispondente al voltaggio raggiunto quando la corrente è uguale a zero, in presenza di un gradiente di KCl tra i due compartimenti della cuvetta (0.1M *cis*, 1 M *trans*). yVDAC1 estratto dai mitocondri di cellule di *S.cerevisiae* è stato ricostituito in membrana e testato allo stesso modo di yVDAC2 ricombinante al fine di rendere possibile un confronto tra le due isoforme. A partire dal potenziale di reversione è stato calcolato il rapporto tra coefficiente di permeabilità dei cationi e degli anioni (PK^+/PCl^-) mediante l'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz (vedi materiali e metodi). Tale rapporto fornisce informazioni sulla selettività ionica del canale, in quanto un rapporto tendente a zero è indice di un canale anione selettivo, viceversa, all'aumentare di questo rapporto, aumenta la selettività per i cationi. I rapporti calcolati per yVDAC1 e per yVDAC2 sono indicati nella tabella in figura 3.26 C. Le tracce rappresentate in figura 3.26 A e B mostrano che mentre yVDAC1 possiede 2 stati funzionali, di cui uno aperto ad alta conduttanza anionica (stato 1) e uno chiuso a bassa conduttanza cationica (stato 3), yVDAC2 presenta un unico stato ad alta conduttanza cationica (stato 2), passando ad uno stato di bassa conduttanza solo ad elevati voltaggi. Ciò è evidente dal confronto dei coefficienti di permeabilità calcolati ad ogni stato e mostrati in figura 3.26 C. In particolare, si può osservare che yVDAC1 allo stato ad alta conduttanza (1) ha un rapporto PK^+/PCl^- pari a 0.57 tipico di un canale anione selettivo, mentre yVDAC2 al suo stato aperto (3), presenta un PK^+/PCl^- pari a 1.94, confermando la sua tendenza alla catione selettività.



C

	P_K/P_{Cl} (state 1)	P_K/P_{Cl} (state 2)	P_K/P_{Cl} (state 3)
yVDAC1	0.57 ±0.09 (2.04±0.19)	-	3.9 ±0.4 (1.1±0.1)
yVDAC2	-	1.94 ±0.19 (2.08±0.07)	11.2 ±2.8 (0.23±0.09)

Figura 3.26 Selettività ionica dei canali VDAC di lievito. Traccia rappresentativa dellla selettività ionica di yVDAC1 (A) e yVDAC (2). L'analisi è stata condotta su un singolo canale in gradiente di KCl. Dopo l'inserzione è stato applicata una rampa di voltaggio compreso tra ±70mV per yVDAC1 e tra ±100mV per yVDAC2. Il grafico mette in relazione la corrente (pA) passante attraverso il canale e il voltaggio applicato (mV). Il punto in cui la curva incontra l'asse dei mV (x) indica il potenziale di reversione. La traccia di yVDAC1 (A) mostra i differenti stati funzionali corrispondenti allo stato anionico ad alta conduttanza e quello cationico a bassa conduttanza. yVDAC2 (B) presenta uno stato ad alta conduttanza cationica. I numeri indicano i differenti stati: 1 stato anionico ad alta conduttanza, 2 stato cationico ad alta conduttanza, 3 stato cationico a bassa conduttanza. La tabella in C contiene i coefficenti di pemeabilità che caratterizzano i tre stati. Tra parentesi è indicato il valore di conduttanza espresso in nS calcolato per ogni stato. (c) Tabella riassuntiva dei rapporti dei coefficenti di permeabilità.

3.5.2 Saggi di funzionalità *in vivo*

La caratterizzazione elettrofisiologica della proteina yVDAC2 è stata affiancata da uno studio della funzionalità *in vivo*, utilizzando il lievito *S.cerevisiae* come organismo modello. In particolare sono stati utilizzati due ceppi ottenuti per delezione del gene *por1* (ceppo Δ*por1*) o di entrambi i geni codificanti per le porine mitocondriali *por1* e *por2* (ceppo Δ*por1*/Δ*por2*).

3.5.2.1 Espressione di yVDAC2 nel ceppo di lievito Δ*por*1

La sequenza codificante yVDAC2 è stata clonata nel vettore di espressione in lievito pYX212, con il quale è stato trasformato il ceppo Δ*por1*. Come controllo il ceppo Δ*por1* è stato trasformato con la sequenza codificante yVDAC1. I ceppi trasformati così ottenuti sono stati utilizzati per effettuare i saggi di complementazione mediante diluizione seriale su terreno completo addizionato di glucosio e glicerolo a 28°C e a 37°C. In fig. 3.27, si osservano i risultati dei saggi di complementazione. L'assenza di VDAC1 nel lievito (Δ*por1*) causa un difetto di crescita su glicerolo, mostrando che la sola presenza di yVDAC2 endogeno non è in grado di sostituire yVDAC1. L'overespressione di yVDAC2 mediante vettore di espressione pYX212 riesce a complementare il difetto di crescita su glicerolo al pari di yVDAC1, ma solo a 28°C. A 37°C non avviene la complementazione invece nè del trasformante con yVDAC1, né di quello con yVDAC2. L'abilità di crescita dei ceppi trasformati è stata verificata, inoltre, mediante la costruzione delle curve di crescita, ovvero monitorando la densità ottica della coltura nel tempo. In fig. 3.27B sono mostrate le curve di crescita dei ceppi Δ*por1* trasformato con yVDAC1 e yVDAC2, e BY4742 e Δ*por1* trasformati con il vettore vuoto, come controllo. I ceppi trasformati con *por1* e *por2* mostrano un andamento di crescita nel tempo intermedio tra il ceppo wt e il Δ*por1*, in accordo con i risultati dei saggi di diluizione seriale.

Ma perchè l'espressione di yVDAC1 non ripristina il fenotipo del ceppo deleto della proteina endogena (Δ*por1*), riportandolo a un livello simile, se non uguale, a quello del lievito wild type? Il problema è stato affrontato considerando i livelli di espressione della proteina endogena e quelli forniti dal vettore pYX212 che reca le sequenze codificanti per le due isoforme fornendo alla cellula la stessa quantità di trascritto.

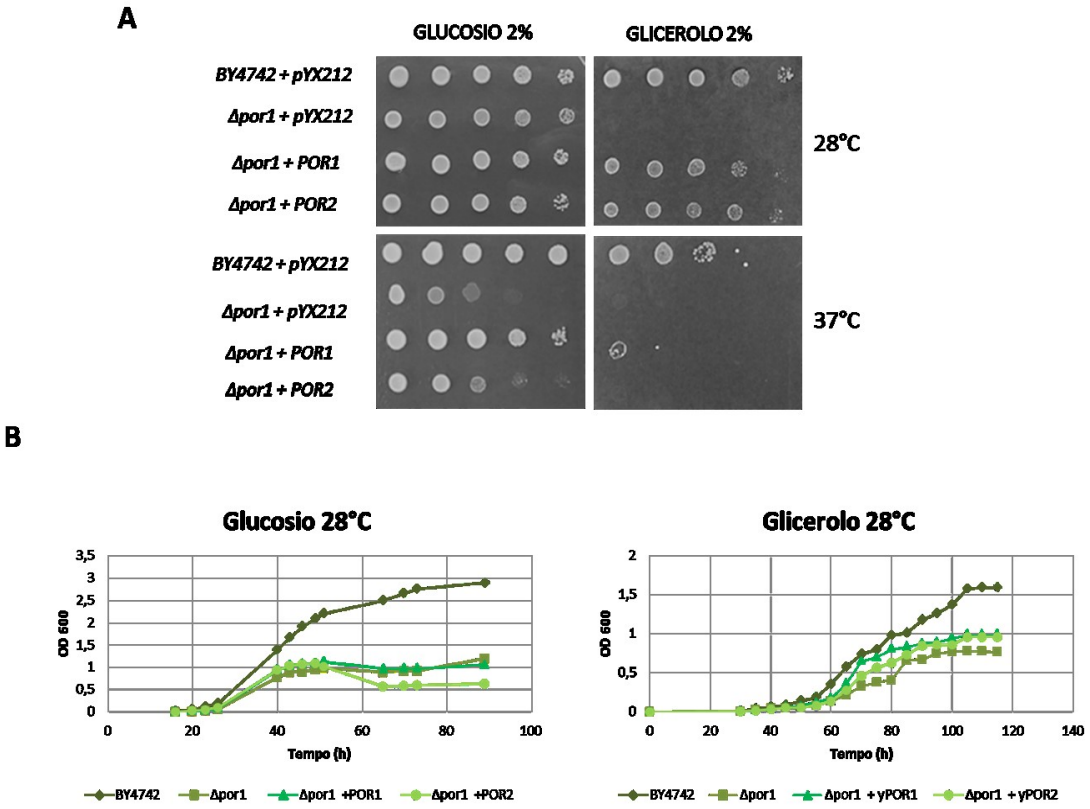


Figura 3.27. Analisi funzionale di yVDAC2 in *S. cerevisiae*:A: saggio di diluizione seriale su glicerolo e glucosio a 28°C e 37°C. l'overespressione di yVDAC2 complementa il difetto di crescita su glicerolo a 28°C ma non a 37°C. **B**: curve di crescita dei ceppi in terreno minimo (SD) con glucosio o glicerolo a 28°C. in glucosio i ceppi mantengono lo stesso andamento di crescita. In glicerolo, Δpor1 presenta una crescita abbastanza lenta rispetto al ceppo wild type. i trasformanti con yVDAC1 e yVDAC2 hanno una crescita intermedia tra il wt e il Δpor1.

3.5.2.2 Quantificazione dell' espressione dei geni *por1* e *por2* nel lievito *S.cerevisiae*

Per spiegare la mancata complementazione del ceppo Δ*por1* trasformato con le sequenze codificanti per yVDAC1 e con yVDAC2 su glicerolo a 37°C, è stata posta l'attenzione sui livelli di espressione forniti dal vettore pYX212. A tal fine è stata effettuata una quantificazione dell'espressione dei geni *por1* e *por2* mediante PCR Real Time nei ceppi trasformati, per confrontare i livelli di trascritto endogeno con quelli esogeni. Come calibratore è stato utilizzato il gene *cit1*, che è già stato verificato rimanere costante sia nel ceppo wt che nel ceppo Δ*por1* (vedi paragrafo 3.1.3). I risultati della quantificazione sono visibili in figura 3.28. Come già detto in precedenza, nelle cellule del lievito wt, l'isoforma più abbondante è la 1, che risulta

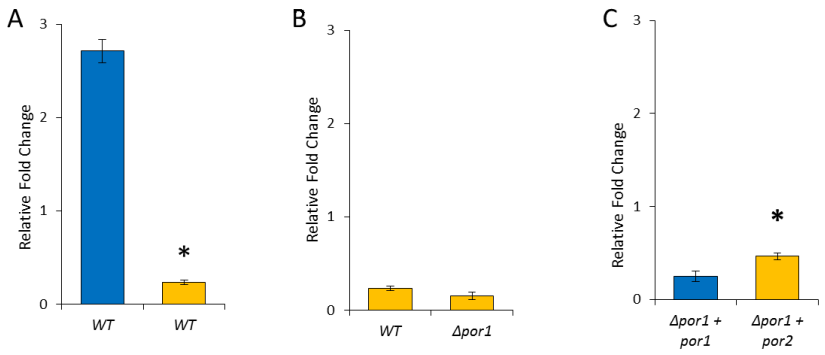


Figura 3.26. Quantificazione mediante PCR Real time dei trascritti por1 e por2 nel ceppo BY4742, Δpor1 e Δpor1 trasformato con por1 e por2. Le quantificazioni sono state ottenute in relazione al gene calibratore cit1. **A:** Por1 nel wt è espresso circa 3 volte in più di por2 .(*)p<0.05 rispetto a Δpor1+por1 . **B:** la quantità di por2 nei ceppi wt e Δpor1 è molto simile e non si osservano incrementi di por2 in seguito a delezione di por1. **C**: espressione rispettivamente di por1 e por2 nei ceppi trasformanti: l'espressione scarsa di por1 (circa 8 volte inferiori rispetto al livello di trascritto fornito dal genoma) spiega il mancato recupero di crescita del ceppo Δpor1+por1 su glicerolo a 37°C.(*)p<0.05 rispetto a Δpor1+por1.

circa 3 volte più espressa della seconda (fig.3.28 A). I livelli di espressione del gene *por2* nei due ceppi sembrano mantenersi costanti seppur con una minima variabilità, ciò presuppone che in seguito alla delezione del gene *por1*, non vi siano cambiamenti nell'espressione della seconda isoforma (fig.3.28 B). L'espressione genica di *por1* e *por2* dovuta all'azione del vettore pYX212 rivela che vi è una grande differenza tra la quantità di trascritto fornita dal vettore e quella fornita dal genoma. Infatti in fig. 3.28C, l'espressione di *por1* nel ceppo Δ*por1+por1* è interamente dovuta al vettore ed è circa la metà rispetto ai livelli di *por2* nel ceppo Δ*por1+por*2, dove il tasso di espressione di *por2* è il risultato della somma del trascritto fornito dal vettore e quello fornito dal genoma. Alla luce di questi risultati è possibile concludere che la quantità di trascritto del gene prodotto a partire dal vettore non è mai uguale a quella che si ritrova fisiologicamente all'interno della cellula prodotto a partire dal genoma. La quantità del trascritto *por1* infatti, fisiologicamente è 8 volte più alta di quando lo si esprime mediante vettore ricombinante. Quindi questo scarso livello di espressione può spiegare la mancata complementazione su glicerolo a 37°C del ceppo Δ*por1* trasformato con le sequenze geniche *por1* o con *por2* .

3.5.3 Espressione di yVDAC2 nel ceppo di lievito deleto di entrambe le porine mitocondriali (Δ*por*1/ Δ*por*2)

Per avere un'ulteriore conferma dell'ipotesi che la complementazione su glicerolo a 37°C del ceppo Δ*por1* trasformato con *por1* e *por2* non avviene a causa della quantità di trascritto fornito dal vettore pYX212, sono stati effettuati saggi di complementazione utilizzando come ospite il ceppo mutante deleto di entrambe le porine mitocondriali (ceppo Δ*por1*/ Δ*por2*).

In fig. 3.29, è mostrato il risultato delle diluizioni seriali delle colture su piastre YPD e YPY incubate a 28°C e 37°C. Su glucosio il ceppo Δ*por1*/ Δ*por2* non presenta alcuna crescita difettiva, in quanto cresce al pari del ceppo parentale wild type M3. È su glicerolo, sia a 28°C che a 37°C che si evidenzia assenza di crescita in confronto al ceppo di controllo wt. La presenza di crescita delle prime diluizioni dei ceppi trasformati con *por*1 e *por*2, indicano un debole ripristino del difetto di crescita. Si osserva infatti ad un intensità di crescita uguale per entrambi i ceppi trasformanti, in particolare su glicerolo fino alla 3°diluizione a 28°C, e fino alla 2° diluizione a 37°C. Questo risultato conferma che è proprio il livello di trascritto fornito dal vettore a causare la mancata complementazione su glicerolo a 37° del ceppo trasformante Δ*por1* con entrambe le isoforme della porina mitocondriale.

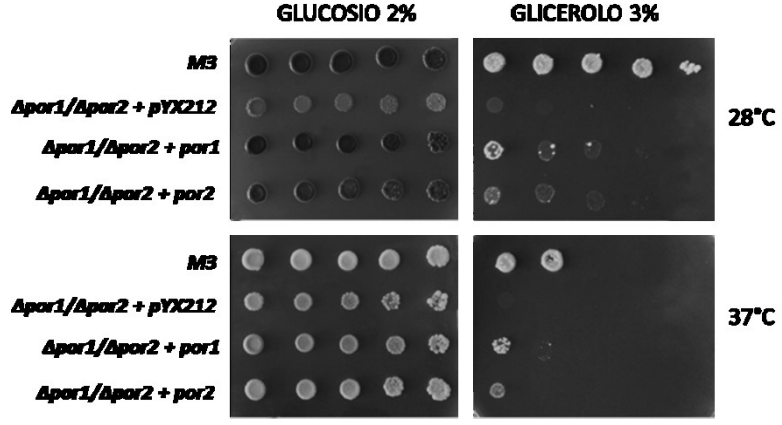


Figura 3.29. Saggi di diluizioni seriale su glucosio e glicerolo del ceppo Δ*por1*/ Δ*por2*. Su glucosio l'assenza di entrambe le porine non provoca alcun problema nella crescita. Queste difficoltà appaiono evidenti su glicerolo a 28°C e ancora più a 37°C, dove Δ*por1*/ Δ*por2* non sopravvive in confronto al ceppo wt. L'espressione di yVDAC1 e yVDAC2, ripristina in egual misura, ma solo parzialmente il difetto di crescita.

3.5.3 Conclusioni

Lo studio presentato in questo capitolo ha permesso di comprendere meglio la funzionalità della proteina yVDAC2. Questa isoforma è da sempre stata considerata diversa da quella più abbondante yVDAC1, soprattutto perché nonostante sia presente nel ceppo Δ*por1*, non è in grado di sostituire la mancanza di yVADC1, impedendo così la crescita del ceppo su fonti di carbonio non fermentabili come il glicerolo. Solo la sua overespressione permette un recupero del difetto (Blachy D.E., 1997), ripristinando il metabolismo mitocondriale del ceppo mutante Δ*por*1 su glicerolo ad una temperatura di 28°C. Se da una parte gli studi elettrofisiologici hanno confermato la capacità della proteina ricombinante yVDAC2 di formare canali in modo molto simile a yVDAC1 su membrane fosfolipidiche artificiali, dall'altra sono state dimostrate rilevanti differenze nelle proprietà elettrochimiche. Infatti il canale presenta una dipendenza dal voltaggio che si discosta molto da quella di VDAC1 del lievito e dei mammiferi, il quale passa allo stato di bassa conduttività quando viene applicato un voltaggio superiore a ±30 mV. Anche la selettività agli ioni risulta variata, infatti mentre yVDAC1 allo stato aperto risulta essere anione selettivo e allo stato chiuso mostra una debole selettività cationica (Colombini M., 2004; Shoshan-Barmatz V., 2010), la proteina ricombinante yVDAC2 risulta catione selettiva già allo stato aperto (±80mV).

Nonostante queste differenze, i saggi di funzionalità *in vivo* mediante diluizioni seriali hanno dimostrato che la proteina è in grado di recuperare il difetto di crescita su glicerolo dovuto alla mancanza di yVDAC1, ma solo a 28°C. Lo stesso comportamento osservato anche nel caso dell'espressione del gene *por1*, è stato attribuito ai livelli di espressione forniti dal vettore pYX212. La quantificazione mediante PCR Real Time, ha rivelato infatti che l'espressione dei geni *por1* e *por2* fornita dal vettore è molto più bassa rispetto a quella che normalmente si ha nel ceppo wt. Dunque la scarsa presenza di proteina non è in grado di complementare il difetto di crescita su glicerolo del ceppo deleto del gene *por1*. Questa osservazione trova supporto in uno studio sui promotori che regolano l'espressione di *por1* e *por2* (Blachky-D.E., 1997). E' stato visto infatti che il gene *por2* sottoposto alla regolazione del promotore del gene *por1*, è in grado di

complementare pienamente il difetto di crescita del ceppo Δ*por1*. Quindi, riassumendo, il prodotto del gene *por*2, yVDAC2, è una proteina in grado di formare canali con proprietà elettrofisiologiche diverse da quelle di yVADC1. Nella condizione del lievito wild type, yVDAC2 non viene espressa a livelli tali da sostituire l'attività di yVDAC1. In mancanza del gene *por1*, e sotto determinati stimoli, quali l'overespressione di hSOD1, vengono incrementati i suoi livelli di espressione che probabilmente provocano un ripristino delle attività mitocondriali.

4. CONCLUSIONI GENERALI

hSOD1 recupera la funzionalità mitocondriale del ceppo Δpor1 modulando l'espressione delle proteine della membrana mitocondriale esterna

In questo lavoro di tesi è stato osservato che l'overespressione della proteina SOD1 umana nel lievito è in grado di recuperare il difetto di crescita del ceppo Δ*por1* su glicerolo, riattivando la funzionalità mitocondriale e inducendo l'espressione di geni codificanti per proteine della membrana mitocondriale esterna. In particolare, esperimenti di quantificazione relativa mediante PCR Real Time, hanno evidenziato che il gene codificante la seconda isoforma di VDAC risulta 8 volte più espresso nel ceppo Δpor1 trasformato con hSOD1 rispetto al controllo non trasformato. Per spiegare il meccanismo attraverso il quale hSOD1 modula l'espressione genica nel lievito, è stato ipotizzato che tale proteina possa agire da attivatore trascrizionale sulla base del modello elaborato da Tsang C.K. (2014). Secondo questi autori la proteina SOD1 sarebbe infatti in grado di migrare al nucleo in seguito alla fosforilazione delle serine 60 e 99. Tale ipotesi ha trovato conferma nei saggi di diluizione seriale del ceppo Δpor1 trasformato con la sequenza mutante hSOD1 S60/99A, in cui la rimozione del sito di fosforilazione ha annullato l'effetto della hSOD1 wild type, suggerendo un ruolo rilevante delle serine nel recupero del metabolismo mitocondriale. Questo risultato rafforza ulteriormente l'ipotesi della migrazione al nucleo della SOD1, e la sua probabile funzione di attivatore trascrizionale.

L'overespressione di hSOD1 nel ceppo Δpor1 incrementa la quantità dei mitocondri e le copie di mtDNA.

La ripresa del metabolismo mitocondriale è stata confermata dall'analisi dell'espressione genome-wide, che mostra il recupero dei livelli di espressione delle proteine codificate a partire dal DNA mitocondriale. Dal confronto tra l'espressione genica del ceppo di lievito wild type e quella del ceppo Δ*por1* è emerso che la mancanza di VDAC1 causa un drastico abbassamento dei livelli di trascritto mitocondriale, accompagnato da una diminuzione della massa

mitocondriale. E' interessante notare che l'espressione di hSOD1 nel ceppo Δ*por1* incrementa notevolmente i livelli di trascritti mitocondriali e la quantità stessa dei mitocondri ripristinando la condizione fisiologica che si ritrova nel lievito wild type.

È noto che, nel lievito, l'espressione genica del DNA mitocondriale è regolata dalla presenza di ATP (Amiott E.A. e Jaehning J. A., 2006) in quanto i promotori mitocondriali hanno una sequenza consenso conservata di 30 nucleotidi al 3' ricca di adenina (ATATAAGTA) (Osinga K.A., 1982). La scarsa presenza di ATP dovuta sia alla mancanza di VDAC1, che normalmente assicura lo scambio di metaboliti tra mitocondrio e citosol, sia all'impossibilità dei mitocondri di effettuare la respirazione ossidativa, potrebbe essere la causa del decremento della trascrizione del DNA mitocondriale. Alla luce di ciò, è possibile ipotizzare che l'induzione dell'espressione di *por2*, ad opera di hSOD1, complementi l'assenza di VDAC1 nel ceppo Δ*por1* ripristinando gli scambi metabolici indispensabili per la trascrizione del DNA mitocondriale. E' interessante notare come il gene *por2* di per sé, non sia in grado di complementare la assenza di yVDAC1 e lo stress cellulare che ne deriva: solo in seguito a determinati stimoli (come ad esempio l'aggiunta di hSOD1) avviene un aumento dell'espressione di *por2* con il ruolo di vicariare l'assenza di *por1*.

L'espressione di hSOD1 nel ceppo Δpor1 provoca un rimodellamento della struttura della parete cellulare.

La resistenza alla Zymolyase del ceppo Δ*por1* trasformato con hSOD1 ha fatto supporre un cambiamento della composizione della parete cellulare e in particolare della componente β-glucanica. Tale modificazione si estende inoltre alla componente chitinica come rivelato dalla resistenza di queste cellule al Calcofluor White e dalla quantificazione mediante citofluorimetria. Numerose sono le condizioni di stress che comportano un rimodellamento della parete: stress osmotico, da temperatura, da agenti chimici, da raggi UV, da stress ossidativo o da pH. Per ognuna di queste condizioni viene attivato un pathway diverso di trasduzione del segnale che poi conduce all'attivazione di regolatori di fattori di trascrizione che sono coinvolti nell'espressione dei geni della biosintesi della

parete (Burgwyn Fuchs B. e Mylonakis E., 2009 manca tra le references). Nel caso di agenti chimici il pathway attivato è quello innescato da una cascata di MAP kinase (PCK) la cui proteina chiave sono Slt2 e il fattore di trascrizione Rlm1.
La resistenza del ceppo Δ*por1* che esprime hSOD1 a Zymolyase e Calcofluor White, è accompagnata da un'estrema sensibilità a SDS e caffeina. In condizioni fisiologiche, la parete cellulare del lievito non permette la diffusione di SDS, detergente che destabilizza la membrana plasmatica (Shimizu J., 1994). Alte dosi di caffeina (superiori a 10 mM) provocano l'inibizione di due fosfoinoditolo3-kinasi(PI3K), Tel1 e Mec1/Rad3, omologhi delle proteine umane ATM (ataxia-talengiectasia mutated) e kinasi relative a ATM (Moser B.A., 2000; Saiardi A., 2005). La presenza di uno stabilizzante che aumenta l'osmolarità del medium di crescita, come il sorbitolo, previene la lisi dipendente da caffeina e SDS delle cellule che hanno una cascata PKC difettiva (Martin H., 1996). Il sorbitolo, infatti, aumentando l'osmolarità del medium fa diminuire la pressione di turgore esterna, per cui le cellule appaiono meno gonfie. In questo caso dovrebbe innescarsi un meccanismo di regolazione per contrastare l'iposmolarità: la chitina dovrebbe ridursi e la parete dovrebbe risultare più stabile, permettendo alle cellule di riprodursi. Il ceppo Δ*por*1+hSOD1 rimane però sensibile alla caffeina anche in presenza di sorbitolo. È chiaro dunque in questo caso che la sensibilità alla caffeina non può essere attribuita né alla debolezza della parete, né all'attivazione della cascata enzimatica di trasduzione ad opera della protein-kinase3.

L' isoforma yVDAC2 è in grado di formare canali in membrane artificiali

La funzione della proteina yVDAC2, seconda isoforma della porina mitocondriale del lievito, è da sempre poco nota, probabilmente perché la sua scarsa abbondanza sulla membrana esterna ne ha reso difficile l'isolamento al fine di effettuare una caratterizzazione completa. Inoltre, il fatto che fisiologicamente essa non sia in grado di complementare l'assenza di yVDAC1 nel ceppo Δ*por1*, ha fatto ipotizzare una funzione diversa da quella dell'isoforma 1.
I primi risultati di questo lavoro, in cui yVDAC2 ha dimostrato un ruolo chiave nel ripristino della funzionalità mitocondriale del ceppo Δ*por1*, hanno fatto supporre che tale proteina potesse effettivamente funzionare come un canale. Questa ipotesi

è stata confermata dalla caratterizzazione elettrofisiologica in bilayer artificiali, dove la proteina è in grado di formare canali simili a quelli di VDAC1, ma con voltaggio-dipendenza e selettività ionica differenti. Poiché le sequenze di yVDAC1 e yVDAC2 presentano un'elevata omologia, è possibile che le peculiari caratteristiche elettrofisiologiche dell'isoforma 2, siano attribuibili alle cariche che si accumulano all'interno del poro (Guardiani C. et al, sottomesso)

Grazie alla caratterizzazione di tipo funzionale, effettuata *in vivo*, è stato possibile ipotizzare che l'incapacità di yVDAC2 di far fronte alla mancanza di yVDAC1, permettendo la crescita su glicerolo e quindi una normale attività mitocondriale del ceppo Δ*por1*, sia dovuta ai suoi livelli di espressione genica. Infatti la quantificazione relativa dell'espressione genica, ha rivelato che la quantità fisiologica di trascritto del gene *por1* è 3 volte più abbondante rispetto a quella del gene *por2*.

I saggi di diluizione seriale hanno mostrato che l'overespressione di *por2* mediante il vettore plasmidico pYX212 nel ceppo Δ*por*1, complementa il difetto di crescita su glicerolo solo a 28°C. Lo stesso effetto è stato osservato in seguito all'overespressione di *por1* con lo stesso vettore. Poiché, come verificato mediante PCR Real Time, la quantità di trascritto fornita dal vettore pYX212 è nettamente inferiore a quella fisiologica, è possibile che l'incompleto recupero della crescita su glicerolo possa essere attribuita alla quantità di proteina che il vettore plasmidico riesce a fornire. Questa ipotesi confermerebbe l'osservazione descritta in Blachy-D.E. (1997), in cui l'espressione del gene *por2* sottoposto alla regolazione del promotore di por1, era in grado di complementare il difetto di crescita del ceppo Δ*por1* su glicerolo. Al contrario l'espressione di *por1,* sotto il controllo del promotore del gene *por2*, non ripristina il difetto di crescita, suggerendo l'importanza della regolazione dell'espressione che si traduce in quantità di molecole effettivamente presenti nella membrana dell'organello.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Ceppi di lievito *S.cerevisiae* utilizzati

In questo lavoro di tesi, sono stati utilizzati diversi ceppi del lievito *S. cerevisiae.* Le caratteristiche, il genotipo e la provenienza sono descritte dettagliatamente in Tabella 5.1.

Ceppo	Genotipo	Descrizione	Ref.
BY4742	MATα,his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0	Wild type	*EUROSCARF* (Frankfurt, Germany)
Δ*por1*(BY4742)	MATα, his3Δ1, leu2Δ0,lys2Δ0, ura3Δ0, por1::kanMX4	Delezione del gene *por1*	*EUROSCARF* (Frankfurt, Germany)
M3	MATa lys2 his4 trp1 ade2 leu2 ura3	Wild type	Blachly-Dyson,1997
M22-2-1 Δ*por1*/Δ*por2*	MATa lys2 his4 trp1 ade2 leu2 ura3 por1::leu2; por2::trp1	Delezione dei geni *por1* e *por2*	Blachly-Dyson,1997

Tabella 5.1. Ceppi di lievito *S.cerevisiae* utilizzati

Le colture cellulari per il ceppo BY4742 ed il mutante isogenico Δ*por1* sono state preparate in terreno completo YP (1% estratto di lievito, 2% peptone) con aggiunta di 2% glucosio (YPD) o 2% glicerolo (YPY), e su terreno minimo sintetico (0.67% Yeast nitrogen base) con aggiunta di 2% di glucosio (SD) o 2% glicerolo(SY) e 10 μg/ml di aminoacido richiesto dall'auxotrofia in base al genotipo del ceppo. Per le piastre è stato aggiunto 2% agar.

Per i ceppi M3 e mutante isogenico Δ*por1*/Δ*por2* i terreni di coltura sono stati preparati in maniera analoga utilizzando tuttavia una percentuale di glicerolo pari al 3%. Le temperature di crescita utilizzate sia per le colture su terreno liquido che su quello solido sono state 30°C e 37°C. La crescita delle colture liquide è stata monitorata misurando la densità ottica a 600nm (OD_{600}) allo spettrofotometro.

I diversi ceppi sono stati trasformati con i vettori plasmidici descritti precedentemente, attraverso un protocollo di trasformazione che prevede l'uso dell'acetato di litio per permeabilizzare la membrana plasmatica. La selezione dei ceppi trasformanti è stata effettuata su terreno SD addizionato di auxotrofie ad esclusione di leucina (pYX142) ed uracile (pYX212).
Il grado di crescita delle colture è stato monitorato attraverso la misura di OD_{600}. Sono state considerate in fase esponenziale colture con valori di OD_{600} compresi tra 0.2 e 1, ed in fase stazionaria colture con valori di OD_{600} superiori ad 1.

5.2 Clonaggio delle sequenze SOD1 wt e mutanti

Le sequenze codificanti per SOD1 di *Homo sapiens* (hSOD1) e *Saccharomyces cerevisiae* (ySOD1) wild-type sono state amplificate con PCR a partire da librerie di cDNA, utilizzando specifiche coppie di primers le cui sequenze sono riportate in Tabella 5.2. Le sequenze sono state successivamente clonate in vettori d'espressione in lievito pYX142 (Novagen) utilizzando rispettivamente EcoRI/SalI per hSOD1 e EcoRI/BamHI per ySOD1.

hSOD1 EcoRI FW	5'-TTTGAATTCATGGCCACGAAGGCCGTGTGCGTG-3'
hSOD1 SalI REV	5'-TTTGAGCTCTTATTGGGCGATCCCAATTACACC-3'
ySOD1 EcoRI FW	5'-TTTTGAATTCATGGTTCAAGCAGTCGCAGT-3'
ySOD1 BamHI REV	5'-TTTTGGATCCGTTGGTTAGACCAATGACACCAC-3'

Tabella 5.2. Primers utilizzati per il clonaggio di SOD1 umana (hSOD1) e di lievito (ySOD1) nel vettore plasmidico pYX142.

Le sequenze mutanti sono state ottenute mediante mutagenesi sito-diretta che ha permesso di introdurre mutazioni puntiformi nelle sequenze hSOD1 e ySOD1. La mutagenesi sito-diretta è stata effettuata mediante PCR utilizzando il kit QuickChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent). A tale scopo, sono stati utilizzati specifici primers recanti la mutazione desiderata, e le sequenze sono riportate in Tabella 5.3. Il corretto inserimento delle sequenze all'interno del

vettore e le mutazioni inserite sono state verificate tramite sequenziamento di Sanger.

hSOD1 G85R FW	5'-CATGTTGGAGACTTGCGCAATGTGACTGCTGAC-3'
hSOD1 G85R REV	5'-GTCAGCAGTCACATTGCGCAAGTCTCCAACATG-3'
hSOD1 S60A FW	5'-ACAGCAGGCTGTACCGCTGCAGGTCCTCACTTT-3'
hSOD1 S60A REV	5'-AAAGTGAGGACCTGCAGCGGTACAGCCTGCTGT -3'
hSOD1 S99A FW	5'-GGTGTGGCCGATGTGGCTATTGAAGATTCTGTG-3'
hSOD1 S99A REV	5'-CACAGAATCTTCAATAGCCACATCGGCCACACC-3'
hSOD1 C111S FW	5'-CACTCTCAGGAGACCATAGCATCATTGGCCGCACACTGG-3'
hSOD1 C111S REV	5'-CCAGTGTGCGGCCAATGATGCTATGGTCTCCTGAGAGTG-3'
ySOD1 S111C FW	5'-CAAGCTTATCGGTCCTACCTGCGTTGTAGGCAGAAGCGTCG-3'
ySOD1 S111C REV	5'-CGACGCTTCTGCCTACAACGCAGGTAGGACCGATAAGCTTG-3'

Tabella 5.3. Primers di mutagenesi sito-diretta

5.3 Clonaggio delle sequenze yVDAC

La sequenza codificante per la proteina VDAC2 di *Saccharomyces cerevisiae* (yVDAC2) è stata amplificata con PCR a partire da una libreria di cDNA estratti da lievito (ceppo BY4742) utilizzando i primers descritti in Tabella 5.4. La sequenza ottenuta è stata in seguito clonata nel vettore d'espressione batterica pET-21a sfruttando gli enzimi di restrizione NdeI/XhoI, in frame con la tag 6xHIS al C-terminale per la purificazione della proteina ricombinante.

POR2 NheI Fw	5'-TTTTGCTAGCATGGCACTACGATTTTTCAACGAT-3'
POR2 Xho1 REV	5'-TTTTCTCGAGGGGCGAGAACGATAGAGACCA-3'

Tabella 5.4 Primes utilizzati per il clonaggio del gene *por2* nel vettore pET21A

La sequenza codificante per yVDAC2 è stata anche inserita nel vettore di espressione per lievito pYX212 (Novagen) utilizzando gli enzimi EcoRI/SalI. Come controllo, la sequenza codificante per yVDAC1 è stata clonata nello stesso vettore sfruttando il sito CpoI. I primers utilizzati per l'amplificazione delle sequenze sono descritti in Tabella 5.5. Il corretto inserimento delle sequenze nei vettori è stato verificato mediante sequenziamento

POR1 CpoI FW	5'-TTTTCGGTCCGCCACCATGTCTCCTCCAGTTTACAG-3'
POR1 CpoI Rev	5'-TTTTCGGACCGTCAAGCGTCGAAGGACAAAG-3'
POR2 Eco RI FW	5'-TTTTGAATTCATGGCACTACGATTTTTCAACGAT-3'
POR2 SalI REV	5'-TTTTGTCGACTCAGGGCGAGAACGATAGAGACCA3'

Tabella 5.5 Primer utilizzati per il clonaggio di *por1* e *por2 nel vettore pYX212*

.

5.4 Saggi di diluizione scalare

I saggi di diluizione scalare, conosciuti anche come saggi di complementazione, permettono di capire se l'espressione di una determinata proteina eterologa in un ceppo di lievito mutante è capace di recuperare il fenotipo del lievito wild-type.

Diverse diluizioni di cellule di lievito cresciute in terreno minimo sono state preparate in acqua sterile, contenenti rispettivamente 10^8 , 10^7, 10^6, 10^5e 10^4 cellule, in un volume totale di 200 µl. In seguito, 2 µl di ogni diluizione sono stati, depositati su terreno solido. Le piastre sono state incubate per 1-2/3-4 giorni alle temperature stabilite di 28°C e di 37°C.

5.5 Test di sensibilità alla Zymolyase

Il test di sensibilità alla Zymoliase permette di capire in che modo la parete cellulare dei ceppi risponde all'azione litica dell'enzima. E' stato effettuato come descritto in (de Grot P.Y.J. et al; 2001).10^7 cellule sono state lavate con 10mM Tris HCl pH7.4, ed il pellet raccolto per centrifugazione (4000 RPM per 5 min) è stato risospeso in 1 ml di 10mM Tris HCl pH7.4, misurando il valore di OD_{600} iniziale. I campioni sono stati successivamente trattati con 60 ug di Zymolyase 100T incubando a 28°C sotto agitazione. La misurazione del valore di OD_{600} è stata effettuata ad intervalli di circa 30 minuti. L'esperimento è stato condotto in triplicato.

5.6 Microscopia delle colture di lievito

Campioni di coltura cellulare con OD_{600} pari a circa 0.5 sono stati trattati con 50ug/ml di Calcofluoro (CFW) diluito in acqua sterile. Le cellule sono state

successivamente visualizzate utilizzando un microscopio a epifluorescenza invertito mediante l'uso di un obbiettivo 63x ad immersione in olio. Il microscopio utilizzato in questo lavoro è un Leica DMI 6000B fornito di una lampada a mercurio con un estesa quantità di filtri di eccitazione (360, 488, 560, 604 nm) per la fluorescenza e una lampada alogena per il campo chiaro e il DIC. Possiede inoltre 4 lenti (10, 20, 40, 63x) e una telecamera ad alta risoluzione (Hamamatsu Orca R2 CCD 1344x1024 pixels). Le immagini sono state ottenute con il software Leica LAS Extended Annotation.

5.7 Analisi citofluorimetrica

La citofluorimetria a flusso consente l'analisi automatica di caratteristiche fisiche e biochimiche di sospensioni cellulari. È basata su una tecnologia che consente di misurare la luce diffusa o diffratta (scattering) da un flusso laminare di particelle microscopiche in sospensione (cellule o organelli) attraversato da una luce laser. Lo scattering ci da informazioni sul volume, sulla dimensione e forma cellulare. Variando la lunghezza d'onda della luce laser è possibile utilizzare sonde o anticorpi coniugate a fluorocromi che possono legare DNA, organelli proteine e piccole molecole all'interno delle cellule. I vantaggi di questa tecnica sono molteplici in termini di riproducibilità ed affidabilità statistica in quanto si possono analizzare grandi quantità di cellule con un estrema rapidità e sensibilità d'analisi.

In questo lavoro, tutti gli esperimenti di citofluorimetria sono stati condotti utilizzando *CyFlow® ML flow cytometer* (Partec). Questo strumento possiede tre sorgenti laser con 10 filtri dedicati e un alta apertura numerica dell'obiettivo (50× NA 0.82) per la rivelazione di differenti segnali di diffrazione e fluorescenza.

Campioni contenenti 10^6 cellule, provenienti da colture con un OD_{600} compreso tra 0.5 e 1, sono state trattate con le quantità e modalità di sonda fluorescente descritti in tabella 5.6. L'analisi è stata effettuata su un numero di cellule pari a 50000 per ogni ceppo e ripetute almeno tre volte in triplicato. Sui risultati degli esperimenti è stata effettuata una analisi statistica utilizzando il test One-Way Anova. La

quantificazione della fluorescenza in ogni singolo esperimento è stata effettuata in maniera relativa utilizzando il ceppo WT come controllo.

SONDA	LASER E CANALE DI LETTURA	QUANTITÀ	APPLICAZIONE
DHR123 (Sigma)	laser blu argon 488 nm ; FL1	5 µg/mL, incubazione per 2h a 28°C	Quantificazione dei ROS intracellulari
DASPMI (Molecular Probes)	laser blu argon 488 nm ; FL1	5 µM, incubazione per 30 min a 28°C	Misura del potenziale di membrana mitocondriale
Calcofluoro (Sigma)	Laser UV 375 nm; FL8	50 µg/mL, incubazione per 5 min a 28°C	Quantificazione della chitina
MitoTracker Green (Molecular Probes)	laser blu argon 488 nm ; FL1	20 nM, incubazione per 20 min a 28°C	Quantificazione della massa mitocondriale

Tabella 5.6. Sonde fluorescenti e loro proprietà, usate per le analisi di tipo citofluorimetrico

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante *FlowMax* software (*Partec*) e sono stati sottoposti ad analisi statistica considerando la deviazione standard della media dei campioni. Le immagini sono state elaborate mediante il software *FCS express 4 flo. Research edition.*

5.8 Analisi dell'espressione genica mediante microarray

Le variazioni nell'espressione genica nel ceppo BY4742 wt e mutante isogenico, e nei rispettivi trasformanti con hSOD1, sono state valutate mediante microarray. Gli insiemi di tutti gli RNA sono stati estratti a partire da colture cresciute in SD a 28°C fino alla fase esponenziale di crescita (OD_{600} =0.6/0.8). L'estrazione dell'acido nucleico è stata effettuata mediante il kit "PureLink™ RNA Mini kit" (Invitrogen) e conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

La quantità del RNA totale estratto, è stata determinata tramite misura spettrofotometrica utilizzando il Nanodrop (Thermo Fisher). La qualità degli RNA è stata analizzata tramite 2100 Bioanalyzer (Agilent), che permette di effettuare una corsa elettroforetica microcapillare automatizzata e di determinarne la purezza.

I vetrini utilizzati per l'ibridazione (G4813A-016322 Yeast (V2) Gene Expression Microarray, 8×15K (1 slide)) sono stati acquistati da Agilent insieme a tutto il kit One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling) Protocol. I microarray basati su tecnologia one –color o singolo canale sfruttano un unico fluorocromo (nel nostro caso il Cy3) per marcare gli RNA dei campioni. Il risultato della scansione ottenuta mediante *SureScan Microarray Scanner* (Agilent Genomics) in abbinamento a *Feature Extraction software* (Agilent), è un valore di intensità assoluta corrispondente alla fluorescenza del target che lega il probe del vetrino. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata mediante *Agilent Genespring GX vers. 14.5.* Questi valori di intensità assoluta così elaborati acquistano un significato se confrontati con altre intensità assolute di altri campioni processati nello stesso esperimento. In questo lavoro è stato scelto di considerare come termine di paragone per i diversi confronti il ceppo Δ*por*1. I confronti effettuati sono indicati di seguito:

BY4742 + pYX142	vs	Δ*por*1
Δ*por*1+ pYX142	vs	Δ*por*1
Δ*por*1+ hSOD1 wt	vs	Δ*por*1
BY4742 +hSOD1 wt	vs	Δ*por*1

5.9 Estrazione del DNA dai ceppi di lievito

L'estrazione del DNA totale dalle cellule di lievito è stata effettuata come descritto in (M.Looke; 2011). In questo lavoro, il DNA totale è stato estratto a partire dai ceppi seguenti:

BY4742 + pYX212
Δ*por*1 + pYX212
Δ*por*1 + pYX212 + *por1*
Δ*por*1+ pYX212 + *por2*

Le cellule sono state precedentemente cresciute in SD fino al raggiungimento della fase esponenziale (con OD_{600} compreso tra 0.6-0.8). Il pellet è stato risospeso in

100 µl di buffer di lisi (200 mM LiOAc, 1% SDS) e incubato a 70°C per 5 min. Sono stati aggiunti 300 µl di 100% Etanolo e vortexato. Dopo aver centrifugato a 12000 RPM per 5 minuti, il pellet è stato lavato con 70% etanolo e ricentrifugato. Il pellet dopo l'evaporazione dell'etanolo è stato risospeso in 100 µl di acqua. Prima di usare la sospensione di DNA per le PCR, è stato dato uno spin in centrifuga alla massima velocità per 1 minuto ed è stato prelevato il surnatante contente la miscela di acidi nucleici per effettuare le PCR.

5.10 Quantificazione dell'espressione genica mediante Real time PCR

L'RNA totale dei ceppi è stato estratto seguendo un protocollo che prevede l'uso di Trizol Plus RNA Purification Kit (Life Technologies) accoppiato ad un trattamento di lisi meccanica mediante le glass beads. L'estratto totale è stato poi purificato utilizzando Pure Link RNA Minikit (Life Technologies) e in seguito quantificato utilizzando il Nanodrop. 2 µg di RNA totale sono stati digeriti con 1 µl di DNase I (Invitrogen) per eliminare le tracce di DNA a singolo o doppio filamento. Con questo volume di campione ottenuto sono stati direttamente sintetizzati i cDNA mediante trascrizione inversa, una variante della PCR in cui si usa le Reverse Transcriptase virale (*SuperScript II Reverse Transcriptase* Invitrogen) per retro-trascrivere gli RNA in DNA complementari. Nella trascrizione inversa, oltre alle componenti tradizionali di una PCR, vengono utilizzati come primer gli oligo-dT, ovvero oligonucleotidi poliT che vanno a legare la coda di poli A degli mRNA, in questo modo si avrà l'amplificazione di tutti i trascritti sottoforma di cDNA.

Una volta ottenuti i cDNA, è stato possibile effettuare la PCR Real time, per quantificare i trascritti. In particolare in questo lavoro di tesi è stata effettuata un a quantificazione relativa, in cui i livelli di trascritto di un determinato gene viene confrontato con il livello di una altro gene che si presuppone si mantenga stabile.

Nella PCR Real time, i livelli di trascritto amplificati vengono rivelati grazie ad una sonda fluorescente che si intercala nelle molecole di DNA e inoltre, la quantificazione non avviene solo alla fine della reazione, come nella PCR normale, ma *in fieri,* ovvero durante tutto il processo di amplificazione. In questo modo si può quantificare il prodotto dell'amplificazione ad ogni ciclo, mettendo in correlazione la fluorescenza con il numero di cicli. Il numero di cicli a cui la

fluorescenza supera il ciclo soglia, stabilito inizialmente, viene detto ciclo soglia C_t (threshold); per normalizzare la quantità e qualità dei campioni il C_t del gene target viene sottratto al C_t del gene housekeeping, ovvero di un gene la cui espressione rimane costante, appartenente allo stesso campione (ΔCt). Oltre al gene housekeeping, la quantificazione relativa prevede la presenza di un gene calibratore, ovvero di un gene di riferimento per il calcolo del ΔΔCt. Infine così sarà possibile calcolare il fold change che ci indica quante volte varia l'espressione di un gene in relazione al gene di riferimento. In particolare:

$$\boldsymbol{R} = \mathbf{2}^{-\Delta\Delta\boldsymbol{Ct}}$$

In questo lavoro di tesi sono state effettuate 3 PCR Real time. Nella prima, sono stati quantificati i livelli di espressione dei geni codificanti le proteine βbarrel della membrana mitocondriale esterna nei ceppi BY4742 e Δpor1, trasformati o non con hSOD1. In particolare sono stati disegnati degli oligonucleotidi che amplificano *por2, tom40, sam50, act1 e cit1. Act1* è il gene housekeeping ed è stato utilizzato come controllo per la normalizzazione, mentre *cit1* è il calibratore. In tabella 5.7, le sequenze dei primer, aventi temperatura di annealing pari a 54°C.

qPCR Por1 FW	5'-AACCTTTCTTCACCGCAAGA-3'
qPCR Por1 FW	5'-GCCATGGCATAACGAGAAAT-3'
qPCR Por2 FW	5'-CCTGGTTGGAAAGGTGATGT-3'
qPCR Por2 REV	5'-TGGCCCAAAGTAACACTTCC-3'
qPCR Tom40 FW	5'-GTCTCCCGTGACGTGTTTTT-3'
qPCR Tom40 REV	5'-AATGCGGAGAATGCGTACTT-3'
qPCR Sam50 FW	5'-GGGCAGCTAGTGAAAAATGC-3'
qPCR Sam50 REV	5'-ACTTCCATCAAAGGCACCAC-3'
qPCR Act1 FW	5'-GCCTTCTACGTTTCCATCCA-3'
qPCR Act1 REV	5'-GGCCAAATCGATTCTCAAAA-3'
qPCR Cit1 FW	5'-TGGTTTAGCTGGCCCATTAC-3'
qPCR Cit1 REV	5'-GAACAACTCTCCCTGCGTTC-3'

Tabella 5.7. Primers della PCR Real time, per quantificare l'espressione dei geni codificanti per le proteine della membrana mitocondriale

Il secondo esperimento di quantificazione è stato effettuato per valutare la presenza del genoma mitocondriale nei diversi ceppi controllando l'espressione di gene *cox1*. Questa quantificazione è stata effettuata utilizzando come stampo il DNA totale estratto dalle cellule e i primers (tabella 5.8) sono stati disegnati sulla base di quelli utilizzati in (Osman C. 2015).

qPCR cox3 fw	5'-TTGAAGCTGTACAACCTACC-3'
qPCR cox3 rv	5'-CCTGCGATTAAGGCATGATG-3'
qPCR act1 fw	5'-CACCCTGTTCTTTTGACTGA-3'
qPCR act1 rv	5'-CGTAGAAGGCTGGAACGTTG-3'

Tabella 5.8 Primer per la quantificazione del DNA mitocondriale (Osman C. 2015).

La PCR-Real Time è stata utilizzata inoltre, per valutare l'espressione genica fornita dal vettore pYX212 nei ceppi trasformanti e la quantità di trascritto di *por1* e *por2* presente nei ceppi BY4742 e Δ*por1*. Come calibratore è stato considerato il gene *cit1*, e per la normalizzazione il gene *act1*. In questo caso, sono stati disegnati primer per l'amplificazione dei geni *por1* e *por2,* aventi temperatura di annealing pari a 58°C (tabella 5.9).

qPCR Por1 FW	5'-AACCTTTCTTCACCGCAAGA-3'
qPCR Por1 FW	5'-GCCATGGCATAACGAGAAAT-3'
qPCR Por2 FW	5'-CCTGGTTGGAAAGGTGATGT-3'
qPCR Por2 REV	5'-TGGCCCAAAGTAACACTTCC-3'

Tabella 5.9. Primer utilizzati per quantificare i trascritti genici forniti dal vettore

In tutti i tre casi, la Real Time è stata effettuata utilizzando il termociclatore Eppendorf MasterCycler RealPlex (Thermo Fisher Scientific) in piastre da 96 pozzetti e il kit SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Il ciclo di PCR è stato composto da un primo step di attivazione enzimatica a 95°C per 5 minuti, seguiti da un sub-ciclo formato da uno step di denaturazione a 95°C per 30 secondi e uno step combinato di annealing ed estensione alla temperatura di annealing specifica dei primer per ogni singolo esperimento per 30 secondi, ripetuto per 35

volte. Sono stati effettuati tre prove in triplicato per ogni singolo esperimento al fine di validare la riproducibilità. L'analisi statistica è stata effettuata mediante test One-Way Anova.

5.11 Espressione della proteina yVDAC2 in *E.coli*

Per effettuare l'espressione della proteina è stato usato il ceppo *E.coli* BL21-DE3 trasformato con il vettore contenente la sequenza *por2.* La coltura batterica è stata preparata in terreno Luria-Bertani ad una temperatura di 37°C, fino al raggiungimento di un OD_{600} pari a 0.6. A questo punto sono state effettuate delle prove di induzione per individuare le condizioni ottimali di induzione variando la concentrazione di IPTG (0.05 mM e 0.4mM), la temperatura di induzione (30°C e 37°C) e i tempi di induzione (1, 2, 3, 4 ore). La resa dell'induzione è stata controllata mediante SDS-PAGE confrontando leil campione non indotto con gli indotti. Una volta individuate le condizioni ottimali (0.4 mM IPTG per 3h a 30°C) è stata effettuata l'induzione su larga scala, partendo da 200 ml di coltura. Al termine dell'induzione, la coltura è stata centrifugata a 5000 RPM e lisata per tutta la notte a 4°C con Buffer B di lisi pH8 (8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris HCl pH8).

La purificazione è stata condotta per gravità sfruttando un gradiente di pH, su una colonna contente resina NiNTA i cui ioni Nickel legano la 6xHIS tag della proteina. Il lisato centrifugato a 5000 RPM per 15 min, è stato caricato sulla colonna equilibrata. È stato effettuato un lavaggio con 12 volumi di Buffer C pH 6.3 (8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris HCl pH 6.3) ed infine la proteina è stata eluita con 5 volumi di Buffer E pH 3.5 (8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris HCl pH 3.5), raccogliendo 10 frazioni da 500 µl ciascuna.

L'efficienza di purificazione è stata controllata mediante SDS-PAGE su gel 12% di acrilamide caricando 10ul di ogni frazione di eluizione.

Il refolding della proteina è stato effettuato diluendo l'eluato in un rapporto di 1:10 nel buffer di Refolding (25 mM TrisHCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% LDAO), incubando sotto leggera agitazione per 16 ore a 4°C. la soluzione dopo il refolding è stata dializzata contro un buffer di dialisi a pH 7.0 (25 mM TrisHCl pH

7.0, 1 mM EDTA) nelle Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (3.5 K MWCO), per eliminare la presenza dell'urea denaturante e completare così il refolding.
La purezza della proteina è stata controllata mediante SDS-PAGE su gel 12% di acrilamide colorando con il Coomassie ed effettuando un immunoblotting della corsa elettroforetica trasferita su membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata bloccata con soluzione 1% BSA, incubata con l'anticorpo monoclonale anti-HIS (Roche) diluito 1:500 in 1% BSA e il secondario anti-mouse coniugato con HRP diluito 1:10000 in 1%BSA. Dopo l'incubazione con gli anticorpi la membrana è stata lavata con buffer salino, e trattata con la soluzione (ECL Pierce) per evidenziare e impressionare la chemiluminescenza su lastra autoradiografica.
La proteina purificata è stata poi aliquotata e conservata a 4 °C fino all'uso.

5.12 Elettrofisiologia della proteina yVADC2 ricombinante

Uno dei metodi più comuni per la caratterizzazione e di proteine-canale è il bilayer fosfolipidico planare (PLB) che permette la ricostituzioone di proteine su membrane artificiali che riproducono quelle naturali. La membrana viene formata sull'apertura microscopica di un setto che separa in due compartimenti una cuvetta di teflon (compartimenti detti cis e trans). I due compartimenti sono connessi a due elettrodi che misurano la variazione della corrente ionica che passa da un compartimento all'altro attraverso quest'apertura. Dopo la formazione della membrana fosfolipidica i compartimenti risultano fisicamente separati e solo dopo l'inserzione di una o più proteine, si avrà il passaggio di corrente da un compartimento all'altro.
Questa metodologia si rivela molto utile per definire la conduttanza, la selettività ionica e comportamento della proteina in seguito ad applicazione alla membrana di diversi valori di potenziale.
In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un apparato della Warner Instruments supportato dal software *Axon pClamp Electrophysiology Data Acquisition*. Per la preparazione delle membrane è stato usato 1,2- Diphytanoyll-sn-Glycero-3-Phosphocoline (Avanti Polar Lipids), in particolare con una concentrazione w/v 2% in cloroformio per il prepainting della cuvetta, e 1% in una soluzione 20% Butanolo e 80% N-Decano per la formazione vera e propria del bilayer

fosfolipidico. La cuvetta utilizzata è di polistirene con un setto divisorio avente un foro di diametro di 250 μM e con due compartimenti che vengono riempiti con 3 ml di soluzione 1M KCl, 10mM Hepes pH 7. I due compartimenti sono connessi a due elettrodi Ag/AgCl mediante ponti agar costituiti da 3 M KCl. Per stabilire la qualità della membrana, si tiene conto della misura della sua capacità ovvero l'abilità che ha di accumulare e separare le cariche ai suoi lati. Una membrana efficente e adatta a questo tipo di esperimenti ha una capacità di circa 150–200 pF. Tutte le misure sono state effettuate a temperatura ambiente.

La proteina è stata aggiunta dopo l'ottenimento di una membrane grande e stabile. Una volta ottenute le inserzioni i dati sono stati analizzati per ottenere la conduttanza come descritto in Benz R. (1985).

Una volta che la proteina si inserisce in membrana, lo strumento rivela il passaggio di corrente ionica che avviene dal compartimento cis a quello trans. Il rapporto tra gli ampere (pA) e la differenza di potenziale applicata alla membrana (mV) da come risultato la conduttanza (nS):

$$nS=pA/mV$$

La voltaggio dipendenza è stata descritta applicando voltaggi positivi o negativi crescenti e osservando a quale voltaggio si verificano eventuali chiusure. Infine è stata calcolata la selettività ionica, ossia la capacità che hanno le porine di far passare ioni positive o negativi, questa capacità dipende dalle cariche che si trovano rivolte verso il lume del canale. Dopo aver ottenuto le inserzioni, viene creato un gradiente tra un compartimento e l'altro in modo che inizino a passare ioni attraverso il canale per equilibrare la concentrazione. La differenza di potenziale misurata quando si crea l'equilibrio, corrisponde al potenziale di reversione. Partendo dal potenziale di membrana si può calcolare attraverso l'equazione di Goldmann-Hodgin-Katz il coefficiente di permeabilità (Pa/Pc).

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI USATE NEL TESTO

hSOD	Superossido dismutase umana
ySOD	Superossido dismutase di lievito
ALS (SLA)	sclerosi laterale amiotrofica
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
GPI-CPW	glycosylphosphatidylinositol cell wall proteins
Pir-CWP	protein internal repeat
DASPMI	2-[4-(Dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium iodide
DHR123	Dihydrorhodamine 123
Wt	wild type
ROS	specie reattive dell'ossigeno
OMM	membrana mitocondriale esterna (outer mitochondrial membrane)
mtDNA	DNA mitocondriale
SDS	sodio dodecil solfato
OD_{600}	densità ottica a lunghezza d'onda 600 nm
CFW	Calcofluor White
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
KDa	kilo Dalton
LDAO	N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide
TOM40	Traslocatore della membrana mitocondriale esterna subunità 40 kDa
SAM50	Sorting assembly machinery subunità 50 kDa
por1-2	geni codificanti yVDAC1 e yVDAC2
COX3	cytochrome c oxidase III
CIT1	citrato ossidase isoforma 1

ACT1	actina isoforma 1
YPD	terreno completo addizionato di glucosio
YPY	terreno completo addizionato di glicerolo
SD	terreno sintetico addizionato di glucosio
ATP	adenosin trifosfato

6. Bibliografia

Abu-Hamad S., Zaid H., Israelson A., Nahon E., Shoshan-Barmatz V. *Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding.* J Biol Chem (2008) 19, 13482–13490.

Alberghina L., Mavelli G., Drovandi G., Palumbo P., Pessina S., Tripodi F., Coccetti P., Vanoni M. *Cell growth and cell cycle in Saccharomyces cerevisiae: Basic regulatory design and protein–protein interaction network.* Biotechnol Adv (2012) 30, 52-72.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular biology of the cell*. Fifth ed. New York: Garland Science, 2008.

Amiott E.A. and Jaehning J.A., *Mitochondrial Transcription Is Regulated via an ATP "Sensing" Mechanism that Couples RNA Abundance to Respiration.* Molecular Cell (2006) 22, 329–338.

Bayrhuber M., Meins T., Habeck M., Becker S., Giller K., Villinger S., Vonrhein C., Griesinger C.,Zweckstetter M., Zeth K. *Structure of the human voltage-dependent anion channel*. Proc Atl Nat Sci (2008) 105 (40), 15370-15375.

Benz R. *Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins.* Biochim Biophys Acta (1994) 1197, 167-196.

Benz R., Janko K., Boos W., Läuger P. *Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta (1979) 511, 305-319.

Benz R., Schmid A., Hancock R.E. *Ion selectivity of gram-negative bacterial porins.* J Bacteriol (1985) 162, 722-727.

Bermejo C., Rodríguez E., García R., Rodríguez-Peña J.M., Rodríguez de la Concepción M.L., Rivas C., Arias P., Nombela C., Posas F., Arroyo J. *The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress*. Mol Biol Cell (2008) 19, 1113–1124.

Blachly-Dyson E., Song J., Wolfgang W.J., Colombini M., Forte M. *Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein*. Mol Cell Biol (1997) 17, 5727–5738.

Blake J.A. et Harris M., *The Gene Ontology Project: Structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and expression analysis*. In: A.D. Baxevanis, D.B. Davison, R. Page 2003.

Borchelt D.R.,. Lee M.K, Slunt H.S., Guarnieri M., Xu Z.S., Wong P.C., Brown R.H. Jr., Price D.L., Sisodia S.S., Cleveland D.W. *Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial*

amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994) 91, 8292-8296.

Botstein D., Chervitz S.A., Cherry M.J. *Yeast as a Model Organism*. Science (1997) 277(5330), 1259–1260.

Brunori M., Rotilio G. *Biochemistry of oxygen radical species*. Methods Enzymol. (1984) 105, 22-35.

Burgwyn F. B. and Mylonakis E. *Our Paths Might Cross: the Role of the Fungal Cell Wall Integrity Pathway in Stress Response and Cross Talk with Other Stress Response Pathways* Eukaryot Cell. (2009) 8(11), 1616–1625.

Cabib, E. *Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both β(1–6)- and β(1–3)glucan in the Saccharomyces cerevisiae cell wall.* Eukaryot. Cell (2009) 8, 1626–1636.

Cabib, E., and Duran A. *Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast*. J. Biol. Chem. (2005) 280, 9170–9179.

Cao X., Antonyuk S.V., Seetharaman S.V., Whitson L.J., Taylor A.L., Holloway S.P., Strange R.W., et al. *Structures of the G85R Variant of SOD1 in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis*. J Biol Chem. (2008) 283(23), 16169–16177.

Cappellaro C., Baldermann C., Rachel R. and Tanner W. *Mating type-specific cell-cell recognition of Saccharomyces cerevisiae : cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin.* EMBO J. (1994) 13, 4737-4744.

Caro L.H, Tettelin H., Vossen J.H., Ram A.F., van den Ende, H. and Klis, F.M. *In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of Saccharomyces cerevisiae.* Yeast (1997) 13, 1477-1489.

Checchetto V., Reina S., Magrì A., Szabò I., De Pinto V. *Recombinant Human Voltage Dependent Anion Selective Channel Isoform 3 (hVDAC3) Forms Pores with a Very Small Conductance.* Cell Physiol Biochem (2014) 34, 842-853.

Chen K.C., Csikasz-Nagy A., Gyorffy B., Val J., Novak B., Tyson J.J. *Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle*. MBoC, (2000) 11, 369-391.

Ciancarelli D., Amicis C. M. et al., "*Influence of intensive multifunctional neurorehabilitation on neuronal oxidative damage in patients with Huntington's disease,"* Functional Neurology, (2015) 30, 47–52.

Cid V.J., Duran A., Del Rey F., Snyder M.P., Nombela C., Sa´nchez M. *Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev (1995) 59, 345–386.

Colombini M. *Structure and mode of action of a voltage dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane*. Ann NY Acad Sci (1980) 341, 552–563.

Colombini M., Blachly D.E., Forte M. *VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. Ion Channels*. (1996) 4, 169–202.

Colombini M., *VDAC: The channel at the interface between mitochondria and the cytosol.* Mol. Cell Biochem(2004) 256-257, 107–115.

Culotta V.C., Klomp L.W.J., Strain J., Casareno R.L.B., Krems B.,. Gitlin J.D, *The copper chaperone for superoxide dismutase*, J. Biol. Chem. (1997) 272, 23469–23472.

de Groot P.W., Ruiz C., Vázquez de Aldana C.R., Duenas E., Cid V.J., Del Rey F., Rodríquez-Peña J.M., Pérez P., Andel A., Caubín J., et al. *A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in Saccharomyces cerevisiae.* Comp Funct Genom (2001) 2, 124–142.

De Pinto V., Guarino F., Guarnera A., Messina A., Reina S., Tomasello F.M., Palermo V., Mazzoni C. *Characterization of human VDAC isoforms: a peculiar function for VDAC3?* Biochim Biophys Acta (2010) 1797, 1268-1275.

De Pinto V., Ludwing O., Benz R ., Krause J., Palmieri F. *Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells: biochemical and biophysical characterization.* Biochim Biophys Acta (1987) 894, 109-119.

Delcour A.H, 1989) Martinac B., Kung C., Adler J. *Voltage-sensitive ion channel of Escherichia coli.* J Membr Biol (1989) 112, 267–275.

Diamonds R. *Atlas of fungal infections* ED.1999 Introduction of Medical Mycology. Merk and Co (2001).

Dickinson J.R.. *Life cycle and morphogenesis*. In: Dickinson JR and Schweizer M eds. *The metabolism and molecular physiology of Sacharomyces cerevisiae.* London (2004) T&F, pp. 1-19.

Dunn C. D., LeeM.S., Spencer F.A., and Jensen R.E. *A Genomewide Screen for Petite-negative Yeast Strains Yields a New Subunit of the i-AAA Protease Comple*x. Mol Biol Cell. (2006) 17(1), 213–226.

Dyall S.D., Brown M.T., and Johnson P.J.. *Ancient invasions: from endosymbionts to organelles*. Science (2004) 304, 253-257.

Elchuri S., Oberley T.D., Qi W., Eisenstein R.S., Jackson Roberts L., Van Remmen H., Epstein C.J., and Huang, T.T. *CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life*. Oncogene (2005) 24, 367–380.

Elorza M. V., Rico H. And Sentandreu R. *Calcofluor White Alters the Assembly of Chitin Fibrils in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans Cells*. Journal of General Microbiology (1983) 129, 1577-1582.

Ephrussi, B., Hottinguer, H. & Tavlitzki, J. *Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude genetique du mutant 'petite colonies'.* Ann. Inst. Pasteur (1949) 79, 419–450.

Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B. *The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae.* FEBS J. (1998) 440, 325-331.

Furukawa Y., Torres A.S., O'Halloran T.V. *Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS.* EMBO J (2004) 23, 2872–2881.

Gershon H. and Gershon D. *The budding yeast, Saccharomyces cerevisiae, as a model for aging research: a critical review.* Mech Ageing Dev, (2000) 120, 1-22.

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D.,Jacq C., Johnston M., Louis E.J., et al. *Life with 6000 genes.* Science (1996) 274, 546.

Guardiani C. et al. *Channel activity of yVDAC2, the second mitochondrial porin isoform of Saccharomyces cerevisiae* Biochim Biophys Acta (submitted)

Guidot, D. M., McCord, J. M., Wright, R. W., and Repine, J. E. *Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient Saccharomyces cerevisiae in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo.* J. Biol. Chem. (1993) 268, 26699–26703

Hartwell LH. *Saccharomyces cerevisiae Cell Cycle*. Bacteriol Rev, (1974) 38, 164-198.

Held P. *Monitoring growth of beer brewing strains of Saccharomyces cerevisiae., Monitoring of Cell Suspensions by Kinetic Absorbance Measurements*. Application Note (2010).

Hiller S., Garces R.G., Malia T.J., Orekhov V.Y., Colombini M., Wagner G. Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles. Science (2008) 32, 1206-1210.

Ishtar Snoek I.S., Steensma H.Y. *Factors involved in anaerobic growth of Saccharomyces cerevisiae.* Yeast (2007) 24, 1-10.

Israelson A., Arbel N., Da Cruz S., Ilieva H., Yamanaka K., Shoshan-Barmatz V., Cleveland D.W. *Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a MouseModel of Inherited ALS.* Neuron (2010) 67, 575–587.

Jigami Y. and Odani T. *Mannosylphosphate transfer to yeast mannan*. Biochim. Biophys. Acta (1999) 1426, 335-345.

Jigami Y. *Yeast glycobiology and its application*. Biosci Biotechnol. Biochem (2008) 72, 637–648.

Jung U. S., Sobering A. K., Romeo M. J., Levin D. E. *Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase.* Mol. Microbiol. (2002) 46, 781–789.

Kang M.S., Elango N., Mattia E., Au-Young J., Robbins P.W. et al. *Isolation of chitin synthetase from Saccharomyces cerevisiae.Purification of an enzyme by entrapment in the reactionproduct.* J. Biol. Chem. (1984) 259, 14966–14972.

Kapteyn J.C., Van Den Ende H., and Klis F. M., *The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall.* Biochim. Biophys. Acta (1999) 1426, 373–383.

Karachitos A., Galganska H., Wojtkowska M., Budzinska M., Stobienia O., Bartosz G., Kmita H. *Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in Saccharomyces cerevisiae cells.* FEBS Lett (2009) 583, 449-455.

Kinnula V.L. and Crapo J.D.. *Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors.* Free Radic. Biol. Med. (2004) 36, 718–744.

Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. *Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae.* Yeast (2006.) 23, 185–202.

Klis FM. *Review: cell wall assembly in yeast*. Yeast (1994) 10,851–869.

Lebovitz R.M., Zhang H., Vogel H., Cartwright J.Jr., Dionne L., Lu N., Huang S., and Matzuk M.M. *Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 9782–9787.

Lesage G. and Bussey H. *Cell Wall Assembly in Saccharomyces cerevisiae* Microbiology And Molecular Biology Reviews, June (2006) 317–343.

Levin D.E. *Regulation of cell wall biogenesis in Saccharomyces cerevisiae: The cell wall integrity signaling pathway.* Genetics (2011) 189, 1145– 1175.

Lipke P.N. and Ovalle R. *Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges* Journal Of Bacteriology (1998) 180 (15), 3735–3740.

Longo V.D., Gralla E.B., Valentine J.S. *Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in Saccharomyces cerevisiae: mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo.* J Biol Chem (1996) 271, 12275–12280.

Lõoke M1, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Biotechniques. *Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications* Biotechniques (2011) 50(5), 325-8.

Lynn M., *Serial endosymbiotic theory (SET) and composite individuality*. Microbiology Today, (2004), 172.

Magrì A., Belfiore R., Reina S., Tomasello M.F., Di Rosa M.C., Guarino F., Leggio L., De Pinto V. & Messina A. *Hexokinase I N-terminal based peptide prevents the VDAC1-SOD1 G93A interaction and re-establishes ALS cell viability*. Scientific Reports (2016) 6,4802.

Mannella C.A. *On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC*. J Bioenerg Biomembr. (1997) 29, 525–531.

Margulis L. *Serial endosymbiotic theory (SET) and composite individuality.* Microbiology Today, (2004) 172.

Marklund S.L., Holme E., Hellner L. *Superoxide dismutase in extracellular fluids* Clin. Chim. Acta (1982) 126, 41-51.

Martin H., Castellanos M.C., Cenamor R., Sanchez M., Molina M., Nombela C. *Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants*. Curr. Genet. (1996) 29, 516–522.

McCord J.M., Fridovich I. *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem. (1969) 244, 6049–6055.

Messina A., Reina S., Guarino F., De Pinto V. *VDAC isoforms in mammals*. Biochim Biophys Acta (2012) 1818, 1466-1476

Michejda J., et al. *The respiration of cells and mitochondria of porin deficient yeast mutants is coupled.* Biochem Biophys Res Commun (1990) 171(1), 354-61.

Miller AF. *Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights.* FEBS Lett. (2012) 586(5), 585–595.

Mokranjac D., and Neupert W. *Protein import into mitochondria*. Biochem.SocTrans (2005) 33, 1019-1023.

Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. *The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. Mol Microbiol* (1996) 19, 651–658.

Moser B.A., Brondello J.M., Baber-Furnari B., and Russell P. *Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast.* Mol Cell Biol. (2000) 20, 4288–4294.

Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M. and Tanner, W. *Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identi¢cation of four covalently linked O -annosylated proteins of Saccharomyces cerevisiae.* Yeast (1997) 13, 1145-1154.

Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., Shou C., Raha D., Gerstein M., Snyder M. *The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing.* Science (2008) 320, 5881, 1344-1349.

O'Brien K.M., Dirmeier R., Engle M., Poyton R.O. *Mitochondrial Protein Oxidation in Yeast Mutants Lacking Manganese- (MnSOD) or Copper- and Zinc-containing Superoxide Dismutase (CuZnSOD)*. J Biol Chem (2004) 279, 51817–51827.

Ogawa Y., Kosaka H., Nakanishi T., Shimizu A., Ohoi N., Shouji H., Yanagihara T., Sakoda S., *Stability of mutant superoxide dismutase-1 associated with familial amyotrophic lateral sclerosis determines the manner of copper release and induction of thioredoxin in erythrocytes,* Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997) 241 (2), 251–257.

Okada H., Kono K., Neiman A.M., Ohya Y. *Examination and Disruption of the Yeast Cell Wall.* Topic introduction Cold Spring Harb Protoc(2016).

Orlean P. *Architecture and Biosynthesis of the Saccharomyces cerevisiae Cell Wall* Genetics(2012) 192, 775–818.

Orlean P. *Biogenesis of yeast wall and surface components,. In* J. Pringle, J. Broach, and E. Jones (ed.), Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, Vol. 3. Cell cycle and cell biology (1997) 229–362.

Osinga K.A., De Haan M., Christianson T., and Tabak H.F. *A nonanucleotide sequence involved in promotion of ribosomal RNA synthesis and RNA priming of DNA replication in yeast mitochondria*. Nucleic Acids Res. (1982) 10, 7993–8006.

Osman C., Noriega T.R., Okreglak V., Fung J.C., Walter P. *Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion*. PNAS (2015) 17, E947–E956.

Osumi M. *The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation.* Micron (1998) 29, 207-233.

Papa L., Hahn M., Marsh E.L., Evans B.S., and Germain D.. *SOD2 to SOD1 switch in breast cancer*. J. Biol. Chem. (2014) 289, 5412–5416.

Perry J.J.P., Shin D.S., Getzoff E.D., and Tainera J.A. *The structural biochemistry of the superoxide dismutases*. Biochim Biophys Acta. (2010) 1804(2), 245-62.

Perry J.J.P., Shin D.S., Getzoff E.D., Tainera J.A. *The structural biochemistry of the superoxide dismutases.* Biochim Biophys Acta. (2010) 1804(2), 245–262.

Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., Gelbard H.A., *Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide,*. Biotechniques (2011) 50, 98–115.

Popolo L., Gilardelli D., Bonfante P., and Vai M. *Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1D mutant of Saccharomyces cerevisiae.* J. Bacteriol. (1997) 179, 463–469.

Raimondi S., Uccelletti D., Matteuzzi D., Pagnoni U.M., Rossi M., Palleschi C. *Characterization of the superoxide dismutase SOD1 gene of Kluyveromyces marxianus L3 and improved production of SOD activity.* Appl Microbiol Biotechnol (2008) 77, 1269–1277.

Ramadass R. and Bereiter-Hahn J. *How DASPMI reveals mitochondrial membrane potential: fluorescence decay kinetics and steady-state anisotropy in living cells* Biophys J. (2008) 15;95(8), 4068-4076.

Reddi A.R., Culotta V.C.. *SOD1 Integrates Signals from Oxygen and Glucose to Repress Respiration*; Cell. (2013) 152, 224–235.

Saiardi A., Resnick A.C., Snowman A.M., Wendland B., and Snyder S.H. *Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide3-kinase-related protein kinases*. Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102, 1911–1914.

Schein S.J., Colombini M., Finkelstein A. *Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltagedependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria*. J Membr Biol (1976) 30, 99-120.

Schmidt A., Gube M., Schmidt A., and Kothe E. *In silico analysis of nickel containing superoxide dismutase evolution and regulation.* J. Basic Microbiol (2009) 49, 109–118.

Sehati S., Clement M.H.S., Martins J., Xu L., Longo V.D., Valentine J.S., Gralla E.B. *Metabolic alterations in yeast lacking copper-zinc superoxide Dismutase.* Free Radic. Biol. Med. (2011) 50, 1591–1598.

Sherman F. *An Introduction to the genetics and molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae.* The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. (1998) 302-325.

Shimizu J., Yoda K., Yamasaki M. *The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the Saccharomyces cerevisiae hpo2 mutant is due to a mutation in PKC1, which regulates expression of β-glucanase*. Mol Gen Genet. (1994) 242, 641–648.

Shimizu J., Yoda K., Yamasaki M. *The hypo-osmolaritysensitive phenotype of the Saccharomyces cerevisiae hpo2 mutant is due to a mutation in PKC1, which regulates expression of b-glucanase.* Mol Gen Genet (1994) 242, 641–648.

Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N., Arbel N., *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and dead.* Mol. Aspects Med. (2010) 31, 227–285.

Smits, G. J., Van Den, E. H. & Klis, F. M. *Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast.* Microbiology (2001) 147, 781–794.

St. Clair D.K., Oberley T.D., Muse K.E., St Clair W.H. *Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation* Free Radic. Biol. Med., (1994) 16, 275-282.

Tainer J.A., Getzoff E.D., Beem K.M., Richardson J.S., Richardson D.C. *Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase.* J Mol Biol (1982) 160, 181–217.

Tissenaum H.A. and Guarente L. *Model organisms as a guide to mammalian aging.* Dev Cell, (2002) 1, 9-19.

Tsang C.K., Liu Y., Thomas J., Zhang Y., Zheng X.F.S. *Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance*. Nature Comm (2014) 5, 3446.

Ujwal R., Cascio D., Colletier J.P., Faham S., Zhang J., Toro L., Ping P., Abramson J. *The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating.* Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105 (46), 17742-17745.

Utsugi T., Minemura M., Hirata A., Abe M., Watanabe D., Ohya Y. *Movement of yeast 1,3-β-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis.* Genes Cells (2002) 7, 1–9.

Van der Rest M.E., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W.N. *The plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae: structure, function, and biogenesis.* Microbiol Rev (1995) 59, 304-322.

Wallace DC. *A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine*. Annu Rev Genet. (2005) 39, 359–407.

Woese C. *On the evolution of cells*. Proc Natl Acad Sci USA. (2002) 99, (13) 8742–7.

Woo-Hyun Chung. *Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging*. Journal of Microbiology (2017) 55 (6), 409–416.

Yoo H.Y, Kim S.S., Rho H.M., *Overexpression and simple purification of human superoxide dismutase (SOD1) in yeast and its resistance to oxidative stress*, J. Biotechnol. (1999) 68, 29–35.

Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.* Free Radical Biology and Medicine. (2002) 33, (3) 337-349.

Zetterström P., Stewart H.G., Bergemalm D., Jonsson P.A., Graffmo K.S., Andersen P.M., Brännström T., Oliveberg M., and Marklund S.L. *Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models* Proc Natl Acad Sci U S A. (2007) 104(35), 14157–14162.

Zhang Y., Zhao W., Zhang H.J., Domann F.E., and Oberley L.W. *Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth.* Cancer Res. (2002) 62, 1205–1212.

Biochimica et Biophysica Acta 1857 (2016) 789–798

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbabio

Overexpression of human SOD1 in VDAC1-less yeast restores mitochondrial functionality modulating beta-barrel outer membrane protein genes

Andrea Magrì [a,c], Maria Carmela Di Rosa [a,c], Marianna Flora Tomasello [d], Francesca Guarino [a,c], Simona Reina [a,c], Angela Messina [b,c,*], Vito De Pinto [a,c,**]

[a] BIOMETEC, Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, University of Catania, Italy
[b] Department of Biological, Geological and Environmental Sciences, Section of Molecular Biology, University of Catania, Italy
[c] National Institute for Biostructures and Biosystems, Section of Catania, Italy
[d] CNR Institute of Biostructures and Bioimaging, Catania, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 November 2015
Received in revised form 20 January 2016
Accepted 1 March 2016
Available online 4 March 2016

Keywords:
SOD1
VDAC
Mitochondria
S. cerevisiae
Gene expression
tom40
sam50

ABSTRACT

Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1), the most important antioxidant defense against ROS in eukaryotic cells, localizes in cytosol and intermembrane space of mitochondria (IMS). Several evidences show a SOD1 intersection with both fermentative and respiratory metabolism. The Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) is the main pore-forming protein in the mitochondrial outer membrane (MOM), and is considered the gatekeeper of mitochondrial metabolism. *Saccharomyces cerevisiae* lacking VDAC1 (Δ*por1*) is a very convenient model system, since it shows an impaired growth rate on non-fermentable carbon source. Transformation of Δ*por1* yeast with human SOD1 completely restores the cell growth deficit in non-fermentative conditions and re-establishes the physiological levels of ROS, as well as the mitochondrial membrane potential. No similar result was found upon yeast SOD1 overexpression. A previous report highlighted the action of SOD1 as a transcription factor. Quantitative Real-Time PCR showed that β-barrel outer-membrane encoding-genes *por2*, *tom40*, *sam50* are induced by hSOD1, but the same effect was not obtained in Δ*por1*Δ*por2* yeast, indicating a crucial function for yVDAC2. Since the lack of VDAC1 in yeast can be considered a stress factor for the cell, hSOD1 could relieve it stimulating the expression of genes bringing to the recovery of the MOM function. Our results suggest a direct influence of SOD1 on VDAC.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) represents the most important antioxidant defense against ROS in eukaryotic cells, since it catalyzes the disproportionation of superoxide anions to oxygen and hydrogen peroxide [1]. SOD1 is an abundant cytosolic enzyme well conserved throughout evolution; however, SOD1 fractions were found also in nucleus [2], lysosomes [3], peroxisome [4] and intermembrane space (IMS) of mitochondria [5,6]. A Mn SOD (SOD2) isoform is expressed in most eukaryotes and it is exclusively located into the mitochondrial matrix [7]. Notably, mutations in SOD1 gene have been associated to the familial form of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) [8,9], even though also wild type SOD1 is implicated in sporadic ALS by a mechanism not yet understood [10]. Although structure and dismutase activity of SOD1 have been well characterized, many recent evidences indicate a SOD1 participation in metabolism regulation.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* grows in an exponential way in the presence of glucose, using alcoholic fermentation and repressing respiration, as long as the sugar is available. When glucose level drops, yeast undergoes the "diauxic shift": the mitochondrial respiration is re-activated, allowing the ethanol utilization for energy production [11,12]. A series of metabolic alterations has been found in yeast cells devoid of SOD1 (Δ*sod1*). Yeast lacking endogenous SOD1 does not completely repress respiration upon fermentative conditions and shows impaired growth on glucose, while it better grows on non-fermentable carbon sources, such as lactate and pyruvate [13]. In addition, Δ*sod1* cells show a significant increase in mitochondrial mass and oxygen consumption, and when diauxic shift occurs, they are no longer able to grow using ethanol [14]. The repression of mitochondrial respiration requires the activation of yeast homologous casein kinases I γ, YCK1 and its paralog YCK2, which relieve the transcriptional repression from the glucose transport transcription regulator RGT1, resulting in the constitutive expression of glucose transporter HXT genes [15]. SOD1 stabilizes

* Correspondence to: A. Messina, Department of Biological, Geological and Environmental Sciences, Section of Molecular Biology, University of Catania, v.le A. Doria 6, 95125 Catania, Italy.
** Correspondence to: University of Catania, v.le A.Doria, 6, 95125 Catania, Italy.
E-mail addresses: mess@unict.it (A. Messina), vdpbiofa@unict.it (V. De Pinto).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.03.003
0005-2728/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Hexokinase I N-terminal based peptide prevents the VDAC1-SOD1 G93A interaction and re-establishes ALS cell viability

Received: 23 June 2016
Accepted: 20 September 2016
Published: 10 October 2016

Andrea Magrì[1,2,3], Ramona Belfiore[2,3], Simona Reina[1,2,3], Marianna Flora Tomasello[4], Maria Carmela Di Rosa[1,2], Francesca Guarino[2,3], Loredana Leggio[1,2], Vito De Pinto[2,3] & Angela Messina[1,2]

Superoxide Dismutase 1 mutants associate with 20–25% of familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) cases, producing toxic aggregates on mitochondria, notably in spinal cord. The Voltage Dependent Anion Channel isoform 1 (VDAC1) in the outer mitochondrial membrane is a docking site for SOD1 G93A mutant in ALS mice and the physiological receptor of Hexokinase I (HK1), which is poorly expressed in mouse spinal cord. Our results demonstrate that HK1 competes with SOD1 G93A for binding VDAC1, suggesting that in ALS spinal cord the available HK1-binding sites could be used by SOD1 mutants for docking mitochondria, producing thus organelle dysfunction. We tested this model by studying the action of a HK1-N-terminal based peptide (NHK1). This NHK1 peptide specifically interacts with VDAC1, inhibits the SOD1 G93A binding to mitochondria and restores the viability of ALS model NSC34 cells. Altogether, our results suggest that NHK1 peptide could be developed as a therapeutic tool in ALS, predicting an effective role also in other proteinopathies.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the progressive degeneration of both upper and lower motor neurons[1] (MNs). Over 160 missense mutations in the Superoxide Dismutase 1 (SOD1) gene account for 20–25% of familial ALS cases[2], causing MNs death by accumulation of mutant SOD1 (mutSOD1) insoluble toxic aggregates[3]. Interestingly, mutSOD1 aggregates associate with the mitochondrial cytoplasmic side, especially in spinal cord MNs, producing mitochondrial failure[4,5]. Despite it is well known that mitochondria play a central role in bioenergetics metabolism, oxidative stress, apoptosis and axonal transport, the intimate underlying mechanism linking mitochondrial dysfunction in MNs of ALS patients or mice to mutSOD1 still remains elusive. Moreover, it is not yet well understood why MNs are more susceptible to the disease in comparison to other tissues.

A previous report showed that, only in the ALS rat spinal cord, mutSOD1 bind directly to the Voltage Dependent Anion Channel isoform 1 (VDAC1), reducing its channel activity[6]. VDAC1 is considered the master regulator of the mitochondria thanks to its crucial action of gate for metabolic and energetic substrates of the organelle[7,8]. Moreover, VDAC1 is the physiological receptor of Hexokinases[9] (HKs). HKs catalyze the glucose phosphorylation and, by binding to VDAC1, they gain a preferential access to newly synthesized ATP. Furthermore, mitochondrial-bound HKs protect the cell from apoptosis, since they diminish VDAC1 propensity to interact with pro-apoptotic protein Bax[10,11]. Interestingly, reduced levels of HK1 were detected in spinal cord, compared to the brain[6] or to other tissues[12]. Therefore, high levels of mutSOD1 binding to VDAC1 correlate with low levels of HK1 in spinal cord. Based on these evidences, we have hypothesized that in ALS a reduction of HK1 concentration increases VDAC1 propensity to interact with mutSOD1, producing thus mitochondrial dysfunction and cell death.

[1]Department of Biological, Geological and Environmental Sciences, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Catania, Italy. [2]National Institute of Biostructures and Biosystems (INBB), Italy. [3]Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, University of Catania, Italy. [4]CNR Institute of Biostructures and Bioimaging, Catania, Italy. Correspondence and requests for materials should be addressed to A. Messina (email: mess@unict.it)

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Prof Vito De Pinto, la Prof. Angela Messina e la Prof. Francesca Guarino, che mi hanno sostenuto in questi anni, guidandomi all'interno del meraviglioso mondo della ricerca scientifica.

Ringrazio i miei colleghi Andrea Magrì, Simona Reina, Ramona Belfiore, Loredana Leggio e Marinella Pittalà che oltre a consigliarmi in ogni mio dubbio, hanno contribuito a rendere familiari e piacevoli le giornate in laboratorio.

E infine un pensiero particolare alle mie sorelle Antonella e Lucia e a mio fratello Vincenzo che insieme ai miei genitori mi hanno sempre incoraggiato e supportato in ogni mia decisione.