



Università della Calabria
Facoltà di Farmacia
e Scienze della Nutrizione e della Salute
Dipartimento Farmaco-Biologico
(BIO/10-11- Biochimica-Biologia Molecolare)

Dottorato di Ricerca in
Biochimica Cellulare
ed Attività dei Farmaci in Oncologia
-XXI CICLO-

Tesi di Dottorato

**CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICO FUNZIONALE DI UNA
SOTTOFAMIGLIA PROTEICA DI *Drosophila melanogaster*
CORRELATA AL TRASPORTATORE MITOCONDRIALE
UMANO DEGLI ACIDI DICARBOSSILICI.**

Docente Tutor

Prof.ssa Vincenza Dolce

Vincenza Dolce

Il Coordinatore del Dottorato

Prof. Diego Sisci

Diego Sisci

Dottorando

Dr. Giancarlo Mazzeo

Giancarlo Mazzeo



Anno Accademico 2007/2008

SUMMARY

CAPITOLO 1

1.INTRODUZIONE	1
1.1 I mitocondri	1
1.2 Sistemi di trasporto mitocondriali: i <i>carrier</i>	4
1.3 Patologie correlate alle deficienze di <i>carrier</i> mitocondriali	16
1.4 Malattie, i cui difetti genici su <i>carrier</i> mitocondriali determinano una azione diretta sulla fosforilazione ossidativa	16
1.4.1 Deficienza dell' isoforma 1 del <i>carrier</i> dell' ADP/ATP (AAC1)	17
1.4.2 Sindrome di Sengers'	18
1.4.3 Deficienza del <i>carrier</i> mitocondriale del fosfato (PiC)	18
1.4.4 Oftalmoplegia Esterna Progressiva autosomica dominante (adPEO)	18
1.5 Patologie da difetto nel funzionamento di <i>carrier</i> mitocondriali che evolvono in intermedi metabolici	19
1.5.1 Sindrome di Stanley. deficienza del <i>carrier</i> mitocondriale carnitina/acilcarnitina (CAC)	19
1.5.2 Sindrome delle HHH (hyperammonemia, hyperornitinemia, homocitrullinuria)	21
1.5.3 Deficienza dell'isoforma 2 del <i>carrier</i> Aspartato /glutammato (AGC2 deficienza)	22
1.5.4 Microcefalia Amish	24
1.5.5 Epilessia Neonatale Mioclonica	24
1.5.6 Autismo: implicazione del <i>carrier</i> dell'aspartato/glutammatoAGC1	25
1.6 Altre patologie correlabili all'attivita' dei <i>carrier</i> mitocondriali	27
1.7 Il trasportatore degli acidi dicarbossilici	27

1.8	<i>D. melanogaster</i> : organismo modello dal quale partire per scoprire i segreti del trasporto mitocondriale	30
-----	---	----

CAPITOLO 2

2.	MATERIALI E METODI	34
2.1	Reverse Trascrittase (RT-PCR)	34
2.2	Reazione di PCR	35
2.3	Costruzione dei primer	36
2.4	Elettroforesi su gel d'agarosio	38
2.5	Purificazione dei frammenti di DNA	38
2.6	Digestione del frammento di DNA	39
2.7	Digestione del plasmide	39
2.8	Vettore di clonaggio per l'espressione delle proteine chimeriche <i>DmDIC1/V5-His</i> , <i>DmDIC2/V5-His</i> e <i>DmDIC3/V5-His</i>	40
2.9	Purificazione del DNA digerito	41
2.10	Reazione di ligazione	41
2.11	Preparazione di cellule di E. Coli ad alta efficienza di trasformazione	42
2.12	Trasformazione di cellule di E. Coli	43
2.13	Estrazione "veloce" del DNA dai batteri	43
2.14	Estrazione del DNA dai batteri con il QIA prep [®] Spin MINIPREP KIT	44
2.15	Preparazione delle cellule di E. Coli competenti in CaCl ₂	44
2.16	Espressione delle proteine <i>DmDIC(1-3-4)/V5-His</i> in cellule di E. Coli BL21λ(DE3)	45
2.17	Estrazione dei corpi di inclusione mediante gradiente di Saccarosio	45

2.18	Delipidificazione e/o desalificazione delle proteine	46
2.19	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS	46
2.20	Colorazione con Comassie Brilliant Blue	47
2.21	Immunoblot su nitrocellulosa (Western-blot)	47
2.22	Ricostituzione dei <i>DmDIC</i> : formazione dei proteoliposomi.	48
2.23	Preparazione dei liposomi.	51
2.24	Preparazione delle colonne di amberlite	51
2.25	Preparazione delle colonne di Sephadex G-75	51
2.26	Preparazione delle colonne Pierce	52
2.27	Determinazione della radioattività entrata nei liposomi e calcolo dell'attività di trasporto	52

CAPITOLO 3

3	RISULTATI E DISCUSSIONI	54
3.1	Identificazione di geni ortologhi dell' <i>SLC25A10-hDIC</i> ed analisi filogenetica.	55
3.2	Analisi dei geni e dei prodotti genici della sottofamiglia del <i>carrier</i> mitocondriale degli acidi dicarbossilici umano in <i>D. melanogaster</i> .	59
3.3	Analisi delle sequenze proteiche correlate all' <i>hDIC</i> in <i>D. melanogaster</i> .	62
3.4	Analisi dei trascritti mediante Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR).	66
3.5	Amplificazione delle sequenze codificanti per <i>DmDIC1</i> , <i>DmDIC3</i> e <i>DmDIC4</i> .	67
3.6	Costruzione dei plasmidi ricombinanti <i>DmDIC(1-3-4)/pET-21b/V5-His</i> .	68
3.7	Espressione dei trasportatori <i>DmDIC(1-3-4)/V5-His</i> in cellule di <i>E. coli</i> del ceppo BL21λ(DE3).	69
3.8	Ottimizzazione dell' attività di trasporto di <i>DmDIC1-V5His</i> , <i>DmDIC3-V5-His</i> e <i>DmDIC4-V5-His</i>	71

3.8	Ottimizzazione dell' attivita' di trasporto di <i>DmDIC1-V5His</i> , <i>DmDIC3-V5-His</i> e <i>DmDIC4-V5-His</i>	71
3.9	Caratterizzazione funzionale di <i>DmDIC1-V5-His</i> , <i>DmDIC3-V5-His</i> e <i>DmDIC4-V5-His</i> .	73
3.10	Costanti cinetiche di <i>DmDIC1-V5-His</i> e <i>DmDIC3-V5-His</i> .	76
3.11	Specificita' di substrato di <i>DmDIC1-V5-His</i> e <i>DmDIC3-V5-His</i> .	79
3.12	Sensibilita' di <i>DmDIC1-V5-His</i> e <i>DmDIC3-V5-His</i> agli inibitori.	81
	CONCLUSIONI	83
	BIBLIOGRAFIA	87
	ALLEGATI: PRESENTAZIONI A CONGRESSI E PUBBLICAZIONI	

SUMMARY

Biochemical and functional characterization of a protein subfamily from *Drosophila melanogaster* related to human mitochondrial dicarboxylate carrier.

The mitochondrial carrier family (MCF) is constituted of transport proteins that shuttle metabolites, nucleotides and cofactors across the inner mitochondrial membrane. Family members have a tripartite structure consisting of three tandemly repeated sequences of about 100 amino acids in length. Each repeat contains 2 hydrophobic stretches that span the membrane as α -helices and a characteristic sequence motif^[1]. The yeast genome encodes 35 MCF members^[2], the human genome at least 50^[1] and the *Arabidopsis thaliana* at least 58 members^[3]. An analysis of the *Drosophila melanogaster* genome has led to the identification of 46 genes^[4] that encode at least 58 possible MCF members.

In *Drosophila melanogaster* only five of them have been characterized: two isoforms of the ADP/ATP translocase, the brain uncoupling protein, the carnitine/acylcarnitine carrier and the citrate carrier. Transport functions of the remainders cannot be assessed with confidence. An example is the dicarboxylate carrier (DIC), which catalyzes the transport of dicarboxylates (malate and succinate) in exchange for phosphate, sulfate or thiosulfate. In mammals, DIC plays an important role in gluconeogenesis, urea synthesis and sulphur metabolism especially in liver^[5], whereas in yeast it is believed to have an anaplerotic function^[6]. In *Drosophila*, this carrier could play an important role in several metabolic processes including primary amino acid synthesis, gluconeogenesis and anaplerotic function. Screening of *Drosophila melanogaster* genome revealed four potential homologs of mammalian and yeast mitochondrial dicarboxylate carrier; they are the products of the genes CG8790, CG4323, CG11196 and CG18363 designated as *DmDIC1*, *DmDIC2*, *DmDIC3* and *DmDIC4*. These putative proteins have a length of 280, 304, 287 and 302 amino acids, respectively, they possess the characteristic sequence features of the MCF and display a high homology (of about 38%-50% identical amino acids and 55%-59% similarity)(Fig. 19-22).

CG8790 and CG4323 genes contain evidence of an alternative splice variant that for each gene produces two transcripts coding for the same protein (Fig. 19-20).

The stage distribution of transcripts was investigated through RT-PCR in the RNAs obtained from Oregon R embryos, larvae, pupae and adults. CG8790-RA transcript of CG8790 gene was detected at equal level in embryos, larvae and pupae, while CG8790-RB transcript was

detected in all stages but at higher level in embryos and larvae (Fig. 24). No transcript for CG4323 gene was detected in any of the stage investigated, whereas CG11196 and CG18363 gene transcripts were detected only in pupae stage (Fig. 24).

DmDIC1, *DmDIC3* and *DmDIC4* were overexpressed in *Escherichia coli* (Fig. 27), purified, reconstituted in phospholipid vesicles and identified as DICs by their transport properties and kinetic characteristics.

DmDIC1 showed to have similar transport properties to eukaryotic mitochondrial dicarboxylate carriers, previously biochemically characterized. The K_m values of the recombinant *DmDIC1* for malate and phosphate were $0,81726 \pm 0,12$ and $2,352 \pm 0,2$ mM, respectively. In four experiments, the V_{max} value, corrected for small differences in efficiency of reconstitution, was $64 \pm 0,133$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. The latter value was virtually the same for both malate/malate and phosphate/malate exchanges and was independent from the type of substrate (Fig. 32-33).

DmDIC3 showed to have different transport properties in respect of the eukaryotic mitochondrial dicarboxylate carriers biochemically characterized previously, being able to transport phosphate, sulfate and thiosulfate very efficiently but not the dicarboxylate acids. The K_m and V_{max} values were $3,2 \pm 0,3$ μM and $253 \pm 0,124$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, respectively (Fig. 34).

Substrate specificity of *DmDIC1* recombinant protein was examined in greater detail by measuring the uptake of ^{14}C malate and ^{33}P into proteoliposomes that had been preloaded with a variety of substrates. In the absence of internal substrate, uptake of labeled malate or phosphate was not observed. The highest activities were detected in the presence of internal malate, phosphate, and malonate. To a somewhat lower extent, succinate, sulfate, and thiosulfate were exchanged for both external malate and phosphate (Tab. IX).

Substrate specificity of *DmDIC3* recombinant protein was examined by measuring the uptake of ^{33}P into proteoliposomes that had been preloaded with a variety of substrates. The highest activities were detected in the presence of internal phosphate, and sulfate. To a somewhat lower extent, thiosulfate was exchanged for external phosphate (Tab. IX).

The exchange reactions of *DmDIC1* and *DmDIC3* recombinant proteins were inhibited by mersalyl, pyridoxal 5-phosphate, butilmalonate, benzylmalonate, and bathophenanthroline, they are all inhibitors of eukaryotic DICs (Tab. X).

Preliminary data obtained on *DmDIC4* showed that, like all the other known DICs, it catalyzes the transport of dicarboxylates (malate and succinate) in exchange for phosphate,

sulfate or thiosulfate transport. The determination of the kinetic constants and of the substrate specificity is at the moment under investigation.

Taken together, the data here reported seem to show that *DmDIC1* plays a role in gluconeogenesis and/or amino acid synthesis, while *DmDIC4* could have an anaplerotic role, leading to the transport of dicarboxylic acids into the mitochondria (in exchange for phosphate or sulfate), which are then used as respiratory substrates during the deep metamorphosis that leads the pupae to develop in adult. A similar anaplerotic role could be assumed for *DmDIC3* whose role could be to transport into mitochondria the inorganic phosphate required for ATP synthesis.

1 Palmieri F. (2004) *The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications*. Pflugers Arch. 447:689-709.

2 Palmieri F, Agrimi G, Blanco E, Castegna A, Di Noia MA, Iacobazzi V, Lasorsa FM, Marobbio CM, Palmieri L, Scarcia P, Todisco S, Vozza A, Walker J. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1249-62. Epub 2006 May 23. Review. PMID: 16844075.

3 Nathalie Picault, Michae Hodges, Luigi Palmieri and Ferdinando Palmieri. The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science* Vol.9 No.3 March 2004.

4 Carrisi C, Madeo M, Morciano P, Dolce V, Cenci G, Cappello AR, Mazzeo G, Iacopetta D, Capobianco L. Identification of the *Drosophila melanogaster* Mitochondrial Citrate Carrier: Bacterial Expression, Reconstitution, Functional Characterization and Developmental Distribution. *J Biochem*. 2008 Sep;144(3):389-392. Epub 2008 May 31.

5 Fiermonte G, Palmieri L, Dolce V, Lasorsa FM, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE (1998) The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 273:24754–24759.

6 Palmieri, L., Vozza, A., Hönlinger, A., Dietmeier, K., Palmisano, A., Zara, V. and Palmieri, F. (1999) The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol. Microbiol.* **31**, 569-577.

1. INTRODUZIONE

1.1 I mitocondri

I mitocondri sono organuli citoplasmatici presenti nel citoplasma di tutte le cellule animali e vegetali a metabolismo aerobico. Mancano nei batteri, dove le funzioni respiratorie sono espletate da proteine enzimatiche contenute nella membrana cellulare e nelle sue invaginazioni.

La funzione principale è quella di fornire energia alla cellula, sottoforma di adenosin-5'-trifosfato (ATP), grazie alle diverse reazioni metaboliche che avvengono al loro interno tra cui il ciclo di *Krebs*, la β -ossidazione degli acidi grassi e la fosforilazione ossidativa.

Forma, dimensione, numero e distribuzione sono strettamente associati al momento funzionale e al tipo cellulare. Generalmente di forma bastoncellare, osservati al microscopio ottico in contrasto di fase possono apparire granulari o filamentosi. Le dimensioni variano da 1 μm a 10 μm di lunghezza e da 0.2 μm a 1 μm di diametro. Il numero dei mitocondri, così come la struttura, può variare da cellula a cellula e dipende dalle attività metaboliche delle stesse. Ad esempio nelle cellule di fegato di mammifero i mitocondri occupano il 15-20% del volume totale mentre, una quantità maggiore è presente nelle cellule muscolari le quali, hanno bisogno di una notevole quantità di ATP per alimentare la loro contrazione^[1]. Attraverso la microscopia elettronica sono state individuate quattro subregioni distinte: la membrana esterna, lo spazio intermembrana, la membrana interna e la matrice.

Le due membrane a doppio strato fosfolipidico racchiudono e definiscono due spazi: lo spazio intermembrana, che si trova tra le due membrane, e lo spazio della matrice, dov'è presente del materiale omogeneo. Dal punto di vista strettamente strutturale le membrane del mitocondrio sono elastiche, flessibili e stabili (Fig. 1).

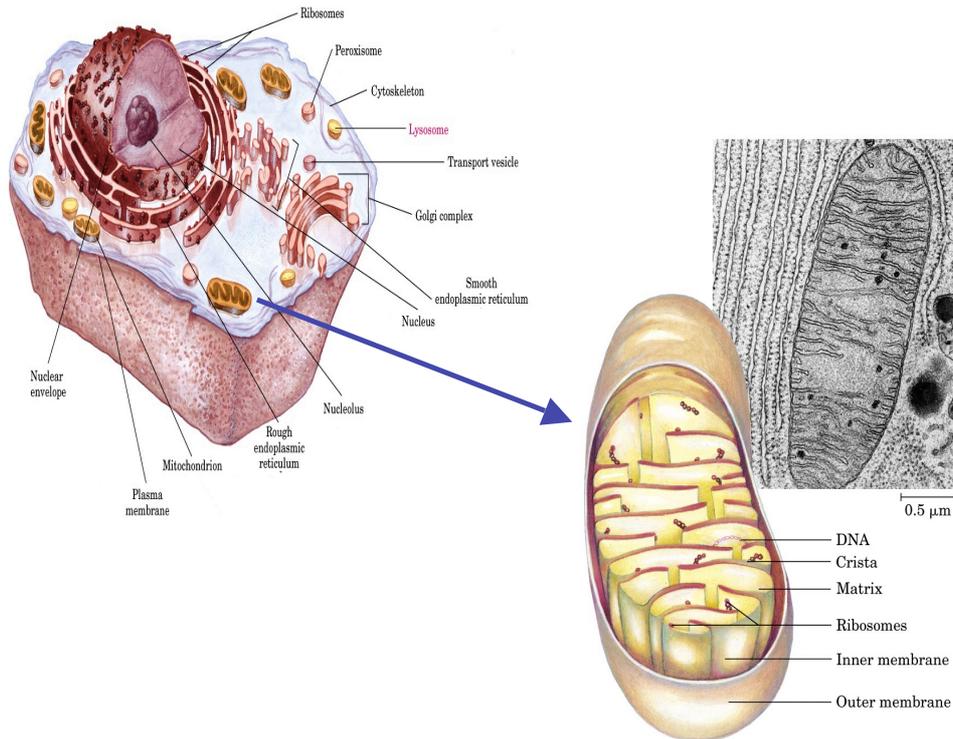


Fig.1: Rappresentazione schematica di una tipica cellula eucariotica. Sezione sottile al microscopio elettronico e rappresentazione schematica di un mitocondrio.

La **membrana esterna** è liscia, composta per lo più da lipidi, che la rendono molto permeabile a molecole con peso molecolare inferiore a 5 kDa, mentre gli ioni possono facilmente attraversarla tramite le porine, proteine canale a voltaggio dipendenti (VDAC). Le porine, si dispongono in modo da delimitare dei pori, atti a facilitare il passaggio bidirezionale, non selettivo, di metaboliti con peso molecolare inferiore a 10000 Da. Una tale permeabilità è confermata dal fatto che la composizione biochimica dello spazio intermembrana è simile a quella del citoplasma.

La **membrana interna** ha una organizzazione molecolare del tutto diversa rispetto a quella della membrana esterna. Non solo ha una particolare ricchezza di proteine (80%) e una relativa povertà di lipidi (20%), ma possiede una sua peculiare organizzazione molecolare. La membrana interna è fittamente ripiegata a formare delle creste o pliche che si proiettano all'interno del mitocondrio e, spesso, quasi lo attraversano da parte a parte. Si tratta di invaginazioni della membrana a forma di tubuli o di sacculi che penetrano in profondità nella matrice mitocondriale. A livello della membrana mitocondriale interna avviene la fosforilazione ossidativa (sintesi di ATP). Il processo ha inizio mediante una serie sequenziale di reazioni di ossidoriduzione (trasporto di elettroni), eseguite dai quattro

complessi enzimatici della catena respiratoria mitocondriale (complesso I, complesso II, complesso III, complesso IV o citocromo C-ossidasi). L'energia liberata durante queste reazioni viene utilizzata dal complesso V, o F_0F_1 ATP sintetasi per produrre, a partire da ADP e fosfato inorganico, ATP, il "carburante" fondamentale del metabolismo cellulare.

La maggior parte delle restanti proteine partecipa al trasporto di sostanze dall'esterno all'interno dei mitocondri e viceversa. Si tratta di specifiche proteine di trasporto note come "*carrier mitochondrial*" a volte organizzati in sistemi di trasporto chiamati sistemi navetta o "shuttle". Infatti, la membrana interna ha una permeabilità molto selettiva: tramite le proteine di trasporto, possono passare solo le piccole molecole che devono essere metabolizzate nello spazio della matrice, e' evidente pertanto l'importanza di questi *carrier mitochondriali*.

La **matrice mitocondriale** è delimitata dalla membrana interna, ed è compresa tra le creste mitocondriali. Essa contiene tutti gli enzimi coinvolti nel ciclo di Krebs, β -ossidazione, ciclo dell' urea e, la sua densità varia in funzione dello stato funzionale. All'interno della matrice mitocondriale e' presente un piccolo patrimonio genetico che codifica per 13 proteine appartenenti ai complessi della catena respiratoria, 2 RNA ribosomiali e 22 RNA transfer. Questi rappresentano solo una piccola parte della proteina e RNA necessari per le funzioni mitocondriali, pertanto la maggior parte delle proteine mitocondriali e fra queste i *carrier mitochondriali* sono codificate dai geni nucleari, sintetizzati sui ribosomi citoplasmatici ed in seguito trasferite all'organismo.

A differenza di altri organuli cellulari che sono prodotti ex novo, i mitocondri al momento della divisione cellulare si duplicano per scissione binaria. Gli organuli completi sono poi ereditati dalle cellule figlie, casualmente, metà in una cellula e metà nell'altra, secondo quella che viene definita eredità non mendeliana o citoplasmatica.

Un'altra caratteristica importante dei mitocondri degli animali superiori è che, al momento della riproduzione sessuata, essi vengono trasmessi ai figli solo dalla madre (eredità matrilineare). Al contrario dei geni nucleari che sono presenti nell'uomo in duplice copia (allele materno ed allele paterno), vi sono centinaia di molecole di mtDNA all'interno di ogni cellula. In un individuo normale, tutte le molecole di mtDNA sono identiche (omoplasma). Mutazioni deleterie del mtDNA generalmente colpiscono solo alcuni genomi mitocondriali; perciò, all'interno di ogni cellula e, conseguentemente, in ogni tessuto sono presenti due popolazioni di mtDNA: una normale ed una mutata (eteroplasma). Solo quando il numero di genomi mutati supera un valore critico (effetto soglia), si inizia ad avere una riduzione dell'attività della fosforilazione ossidativa e la

conseguente comparsa di manifestazioni cliniche di malattia. Poiché i mitocondri sono presenti in tutti i tessuti, le malattie mitocondriali possono colpire qualsiasi organo dell'organismo, tuttavia interessano maggiormente il muscolo ed il cervello, data la maggiore richiesta di energia di questi tessuti. Per questo motivo le malattie mitocondriali sono spesso definite come encefalo-mio-patie mitocondriali.

I mitocondri sono veri e propri regolatori della vita e della morte cellulare. Sono il principale bersaglio dei processi d' invecchiamento; tendono ad accumulare delezioni e mutazioni puntiformi, che portano ad un cambiamento della morfologia e della funzionalità mitocondriale.

L'invecchiamento e la perdita di efficienza del mitocondrio, compromettono la produzione energetica e, spesso, conducono alla morte del tessuto. In seguito ai processi di invecchiamento o a messaggi fisiologici che giungono alla cellula, si attivano una serie di processi che comportano modificazioni strutturali delle membrane mitocondriali. I segnali apoptotici determinano transizione di permeabilità mitocondriale; la formazione di pori nella membrana mitocondriale interna provoca riduzione del potenziale di membrana e rigonfiamento mitocondriale. I segnali possono anche causare aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna, rilasciando un fattore di innesco dell'apoptosi, il citocromo c, che passa dai mitocondri al citosol e, mette in moto gli eventi proteolitici che uccidono la cellula^[2].

1.2 Sistemi di trasporto mitocondriali: i *carrier*

Mentre la membrana mitocondriale esterna è completamente permeabile a diverse sostanze e rappresenta una barriera di scarsa o nulla efficacia per il controllo dell'ingresso di diversi substrati, la permeabilità della membrana interna è piuttosto limitata rappresentando l'effettivo filtro di selezione, tra citosol e matrice mitocondriale. Studi di frazionamento proteico sulla membrana mitocondriale interna, hanno dimostrato che a tale livello sono presenti proteine transmembrana chiamate trasportatori o *carrier*, che permettono il trasporto selettivo di substrati, dalla matrice verso lo spazio intermembrana e viceversa.

Questi trasportatori sono inoltre coinvolti nella formazione di sistemi navetta o shuttle, ad esempio, lo shuttle malato/aspartato viene utilizzato dal NADH, che prodotto dagli enzimi citosolici non può attraversare la membrana mitocondriale interna per essere ossidato sulla catena respiratoria. Occorre, perciò, che gli equivalenti di riduzione siano veicolati fino ai

complessi respiratori sulla membrana mitocondriale interna, senza che il coenzima, come tale, sia fisicamente trasferito.

Questo shuttle particolarmente attivo nel fegato, e' dato dalla coordinazione del carrier del chetoglutarato^[3-4] con quello dell'aspartato/glutammato^[5]. Al fine di approfondire le caratteristiche dei trasportatori presenti a livello della membrana mitocondriale interna, sin dagli anni 70 sono stati condotti numerosi studi sia in mitocondri intatti^[6] che su sistemi di ricostituzione artificiali di proteine isolate dai mitocondri e/o di proteine ricombinanti^[7-8]. Le informazioni funzionali, così ottenute, hanno aiutato ad ottenere delle informazioni specifiche sul ruolo fisiologico dei *carrier* mitocondriali nel metabolismo cellulare. La comune funzione dei *carrier* mitocondriali fornisce un legame, tra mitocondri e citosol, grazie al flusso di una larga varietà di soluti, attraverso la membrana mitocondriale interna. Questo legame è indispensabile in quanto alcuni processi fisiologici richiedono la partecipazione simultanea di reazioni enzimatiche intra-mitocondriali ed extra-mitocondriali.

Il flusso di ioni e molecole mediati da *carrier* a livello della membrana mitocondriale interna esercitano un controllo su vie metaboliche come: la fosforilazione ossidativa, il ciclo dell'acido citrico, l'ossidazione degli acidi grassi, la gluconeogenesi, la lipogenesi, nel trasporto di equivalenti riducenti, nella sintesi di urea, nella degradazione amminoacidica, nella sintesi di DNA, RNA e proteine mitocondriali e in altre funzioni che avvengono tra citosol e mitocondri.

I substrati trasportati dai *carrier* mitocondriali sono molto diversi tra loro, sia per quanto attiene la loro struttura che la loro dimensione: si passa dal più piccolo substrato trasportato, l' H^+ ^[9], fino ad arrivare alle specie più grandi e più cariche, come l' ATP^{4-} ^[10]. La maggior parte dei substrati trasportati sono anioni, ma non solo, alcuni sono cationi, altri zwitterioni.

I *carrier* mitocondriali attualmente noti, possono essere suddivisi in trasportatori elettrogenici ed elettroneutri; in particolare la caratterizzazione funzionale dei *carrier* noti ha permesso di suddividerli ulteriormente in tre categorie, in base al tipo di substrato trasportato:

- ✓ *Carrier* che catalizzano un trasporto elettrogenico, come il trasportatore dei deossinucleotidi^[11]
- ✓ *Carrier* che catalizzano un trasporto elettroneutro, in cui le cariche trasportate verso l'interno, sono controbilanciate da cariche uguali in uscita (simporto: anione/ H^+) o

cariche opposte in entrata (antiporto: anione/ OH^-), come il *carrier* del fosfato^[12-13] o il *carrier* degli acidi tricarbossilici^[14].

- ✓ *Carrier* che catalizzano un trasporto neutro in cui la molecola trasportata non ha cariche elettriche, come nel caso del *carrier* della carnitina/acilcarnitina^[15].

I *carrier* mitocondriali utilizzano come loro driving-force, il gradiente di concentrazione dei soluti e/o il potenziale elettrochimico protonico a cavallo della membrana mitocondriale interna, generato dalla catena respiratoria. Anche la componente elettrica del potenziale elettrochimico protonico ($\Delta\mu\text{H}^+$) è piuttosto elevata, ed alcuni *carrier* sfruttano tale gradiente elettrico per effettuare il loro trasporto.

Le proprietà cinetiche di molti *carrier* mitocondriali e la variazione della loro attività in base al pH, ΔpH , potenziale di membrana, fosfolipidi e altri parametri, sono state chiarite nel dettaglio nei mitocondri e, specialmente, dopo la loro ricostituzione funzionale in liposomi. La maggior parte dei *carrier* mitocondriali^[4-5], catalizza una reazione di scambio di specifici soluti. Studi di cinetica, variando le concentrazioni di entrambi i substrati, esterni ed interni, hanno messo in evidenza, con l'eccezione del *carrier* della carnitina^[7;15], che tutti i *carrier* mitocondriali analizzati finora concordano nella funzione di un meccanismo sequenziale, che implica che, i substrati, uno interno ed uno esterno, formino un complesso ternario con il *carrier*, affinché avvenga la traslocazione^[7]. Il *carrier* della carnitina, per contro, segue un meccanismo a ping-pong che suppone la formazione di un complesso binario *carrier*-substrato: il sito di legame del *carrier* è alternativamente esposto ai lati della membrana.

La prima sequenza amminoacidica di un *carrier* mitocondriale ad essere riportata fu quella del *carrier* ADP/ATP, nel 1982^[16]. L'analisi della sequenza primaria di tale *carrier*, mostrava che la struttura completa, di circa trecento amminoacidi, poteva essere suddivisa in tre domini correlati, costituiti da circa cento residui ciascuno^[17]. Tale pattern di ripetizioni omologhe fu osservato anche nel secondo *carrier* mitocondriale sequenziato: l'UCP o uncoupling protein^[18]. Tali evidenze portarono ad ipotizzare che queste proteine ed altri possibili *carrier* mitocondriali, potessero derivare da un'unica famiglia proteica, originatasi dalla triplicazione in tandem di un comune gene ancestrale^[4-10]. La validità di questa ipotesi fu ampiamente dimostrata, in seguito al sequenziamento di altri *carrier* mitocondriali, come il *carrier* del fosfato^[19], del 2-chetoglutarato^[3], del citrato^[20] e della carnitina/acilcarnitina^[15]. La sequenza di tali *carrier* è stata ottenuta mediante procedure lunghe e faticose come purificazione e sequenziamento proteico che hanno portato a questa

ipotesi solo dopo venti anni dalla scoperta del primo *carrier* mitocondriale il trasportatore dell' ADP/ATP.

Tutti i *carrier* mitocondriali a funzione nota presentano una struttura primaria a sequenza tripartita, che contiene tre domini omologhi, ripetuti in tandem, di circa 100 amminoacidi. Ogni dominio, costituito da 2 regioni idrofobiche, che attraversano la membrana mediante struttura ad α -elica e che sono connesse da lunghi loop, presenta una sequenza amminoacidica caratteristica, altamente conservata detta sequenza firma o consenso.^[7]

P-h-D/E-X-h-K/R-X-K/R-(20-30 aa)-D/E-G-(4 aa)-a-K/R-G

h= aa idrofobico; a= aa aromatico; X= aa qualunque.

Nei vari *carrier* mitocondriali tale sequenza è parzialmente modificata, in uno, due, o addirittura in tutti e tre i domini.

La tipica struttura tripartita, la presenza delle due regioni idrofobiche ad α -elica in ogni dominio e della sequenza firma, sottolineano l'appartenenza di tali proteine alla stessa famiglia (Fig.1).

Un modello bidimensionale dei *carrier* mitocondriali, generalmente accettato, è stato costruito basandosi sulla sequenza caratteristica, sulla accessibilità da parte di anticorpi peptido-specifici dei *carrier*, di enzimi proteolitici, e di altri reagenti impermeabili.

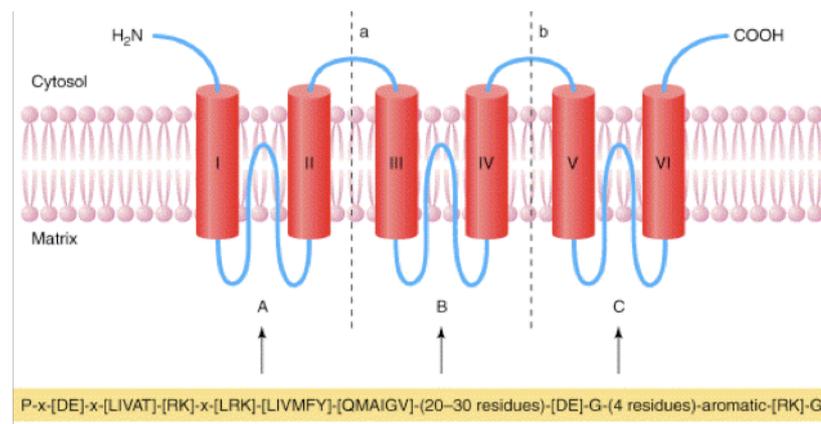


Fig.1 Modello topografico di un monomero di carrier mitocondriale.

In accordo con questo modello bidimensionale, ogni *carrier* mitocondriale monomero ha sei α -eliche che attraversano la membrana, connesse tra loro mediante loop idrofilici e

presentano l'N- e il C- terminale, entrambi sul lato citosolico della membrana mitocondriale interna. Ulteriori osservazioni hanno mostrato che i residui localizzati nella regione della matrice idrofilica di alcuni *carrier* mitocondriali, reagiscono con reagenti che non permeano la membrana, applicati dal lato citosolico, e suggeriscono che i loops della matrice di questi *carrier*, protrudano nella membrana, tra i segmenti transmembrana della proteina^[7].

Studi recenti di cristallografia a raggi X hanno portato alla risoluzione di una struttura tridimensionale, che i *carrier* mitocondriali possono assumere in vivo. In particolare, è stata cristallizzata la proteina che catalizza il trasporto ADP/ATP (AAC1) di cuore bovino in complesso con l'inibitore carboxyatractyloside^[21].

Nel lavoro di Brandolin e collaboratori^[21], viene presa in considerazione la struttura tridimensionale del *carrier* in forma monomerica; la proteina presenta sei domini transmembrana organizzati in α -eliche, poste in direzione ortogonale alla membrana, parallele fra di loro e leggermente inclinate. Le estremità ammino- e carbossi-terminale sono dirette verso lo spazio intermembrana e le sei α -eliche sono legate fra di loro da loop idrofilici. I collegamenti interni fra le α -eliche pari e dispari di ciascun peptide contengono brevi segmenti α -elicoidali. Nella architettura complessiva della proteina tali loop sembrano sistemati parallelamente alla membrana, con il compito di fortificare la conformazione chiusa del *carrier* sul lato della matrice. Le superfici orientate verso la membrana sono idrofobiche e probabilmente interagiscono con la stessa. Nel complesso la proteina, dall'esterno appare come un barile e dall'interno è visibile una depressione profonda cono-sagomata cui il substrato può accedere (Fig.2).

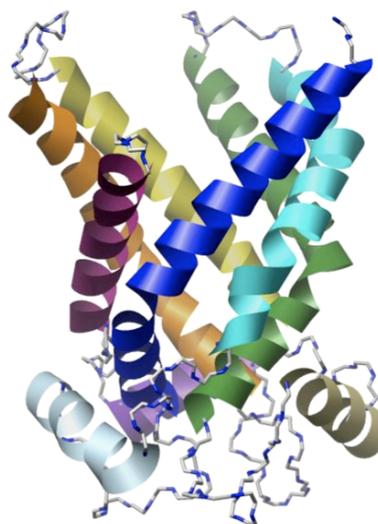


Fig.2 Struttura del *carrier* AAC1 bovino proposta in seguito alla cristallizzazione della proteina in complesso alla carbossiatrattiloside.

La maggior parte dei *carrier* mitocondriali isolati, formano degli omodimeri, e ciò sembrerebbe applicabile a tutti i membri della famiglia dei *carrier* mitocondriali. Quale sia il ruolo degli omodimeri nel meccanismo di trasporto deve essere ancora chiarito; potrebbe essere la formazione del canale tra i monomeri o la presenza di due canali uguali, uno per ogni monomero. Se i *carrier* mitocondriali funzionassero come dimeri, queste strutture consisterebbero di dodici segmenti transmembrana, come la maggior parte delle proteine di trasporto di membrana^[21].

In seguito al sequenziamento del genoma umano e di quello di altri organismi disponibili nelle banche dati telematiche e' stata possibile l'identificazione, in breve tempo, di molti membri della famiglia dei *carrier* mitocondriali.

In questi studi, la sequenza caratteristica, tipica della famiglia dei *carrier* mitocondriali, è stata usata per la ricerca di *carrier* a funzione non nota, codificati dal genoma di vari organismi. I prodotti genici sono stati espressi in *Escherichia coli* e/o *Saccharomyces cerevisiae*, purificati ed incorporati in forma attiva in vescicole fosfolipidiche (liposomi) e le proteine ricombinanti sono state caratterizzate funzionalmente e cineticamente, nel loro trasporto^[8;10;22-24].

Usando tale strategia, procedendo quindi dal gene alla funzione, sono state identificate le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche di diversi nuovi *carrier* mitocondriali nell'uomo^[8], nei lieviti (*S.cerevisiae*)^[25-28] e nelle piante (*Arabidopsis*)^[29-32]. Taluni sono stati caratterizzati nel loro trasporto, di altri se ne assume la funzione per omologia di sequenza (Vedi Tab.I,II,III), altre ancora, presumibilmente appartenenti alla famiglia dei *carrier* mitocondriali, sono presenti nelle banche dati di cui si conosce la loro sequenza amminoacidica, ma non la loro funzione.

Tabella I

SLC25: Caratteristiche principali della famiglia dei carrier mitocondriali umani ^[8]

Human gene name Accession number	Protein name	Aliases	Predominant substrates	Transport type/ coupling ions*	Tissue distribution, cellular/subcellular expression and Link to disease#
SLC25A1 NM_005984 22q11.21	CIC (citrate carrier)	CTP, tricarboxylate carrier	Citrate, malate, PEP	E/citrate-H ⁺ /malate	Liver, kidney, pancreas (also in brain, lung, heart)/inner mitochondrial membrane
SLC25A2 NM_031481.1 5q31.3	ORC2 (ornithine carrier 2)	ORNT2	Ornithine, citrulline, lysine, arginine, histidine	E/ornithine/citrulline plus H ⁺ ; ornithine/H ⁺	Liver, testis, spleen, lung, pancreas, small intestine, brain, kidney/inner mitochondrial membrane
SLC25A3 NM_005888 isoform A NM_002635 isoform B 12q23.1	PiC (phosphate carrier)	PTP	Phosphate	C/phosphate plus H ⁺ E/phosphate/OH ⁻	Isoform A: heart, skeletal muscle and diaphragm; isoform B: liver, kidney, brain, thymus, lung, heart, skeletal muscle, diaphragm/inner mitochondrial membrane
SLC25A4 NM_001151 4q35.1	AAC1 (ADP/ATP carrier 1)	ANT 1, T1, PEO2, PEO3, adenine nucleotide translocator 1	ADP, ATP	E/ADP/ATP	Heart, skeletal muscle, much less in brain, pancreas, prostate, kidney, lung, thymus/inner mitochondrial membrane. adPEO ^G , Sengers syndrome ^G
SLC25A5 NM_001152 Xq24	AAC2 (ADP/ATP carrier 2)	ANT 2, T2, adenine nucleotide translocator 2	ADP, ATP	E/ADP/ATP	Brain, lung, kidney, pancreas, heart, skeletal muscle, spleen/inner mitochondrial membrane
SLC25A6 XM_114724 Xp22.32	AAC3 (ADP/ATP carrier 3)	ANT3, T3, adenine nucleotide translocator 3	ADP, ATP	E/ADP/ATP	Brain, lung, kidney, liver, pancreas, heart, skeletal muscle, spleen, thymus/inner mitochondrial membrane
SLC25A7 NM_021833.2 4q28-q31	UCP1 (uncoupling protein 1)	Thermogenin, proton carrier	H ⁺	F	Brown adipose tissue/inner mitochondrial membrane
SLC25A8 NM_003355 11q13	UCP2 (uncoupling protein 2)	Proton carrier, UCPH	H ⁺	F	Brain, lung, kidney, spleen, heart/inner mitochondrial membrane. Obesity, type 2 diabetes

Continuazione Tabella I

SLC25: Caratteristiche principali della famiglia dei carrier mitocondriali umani ^[8]

Human gene name Accession number	Protein name	Aliases	Predominant substrates	Transport type/ coupling ions*	Tissue distribution, cellular/subcellular expression and Link to disease [#]
SLC25A9 AF001787 11q13	UCP3 (uncoupling protein 3)	Proton carrier	H ⁺	F	Skeletal muscle, lung/inner mitochondrial membrane. Obesity ?
SLC25A10 NM_012140.2 17q25.3	DIC (dicarboxylate carrier)		Malate, phosphate, succinate, sulphate, thiosulphate	E/malate/phosphate	Liver, kidney, heart, brain, lung, pancreas/inner mitochondrial membrane
SLC25A11 NM_003562.2 17p13.3	OGC (oxoglutarate carrier)	Oxoglutarate/malate carrier	Oxoglutarate, malate	E/oxoglutarate/malate	Heart, skeletal muscle, liver, kidney, brain, pancreas/inner mitochondrial membrane
SLC25A12 NM_003705.2 2q31.1	AGC1 (aspartate/glutamate carrier 1)	aralar1	Aspartate, glutamate	E/aspartate/glutamate plus H ⁺	Brain, heart, skeletal muscle, lung, pancreas, kidney, but not in liver/inner mitochondrial membrane
SLC25A13 NM_014251.1 7q21.3	AGC2 (aspartate/glutamate carrier 2)	Citrin	Aspartate, glutamate	E/aspartate/glutamate plus H ⁺	Liver, kidney, pancreas, heart, skeletal muscle, brain/inner mitochondrial membrane. Citrullinaemia type II (CTLN2) ^G
SLC25A14 AF155809 (long) AF155811 (short) AF155810 (short + insertion) Xq24	UCP5 (uncoupling protein 5)	BMCP1, brain mitochondrial carrier protein	H ⁺ (?) homologous to UCP1/2/3	Unknown	Widely expressed, with highest levels in brain and testis
SLC25A15 NM_014252.1 13q14.11	ORC1 (ornithine carrier 1)	ORNT1	Ornithine, citrulline, lysine, arginine	E/ornithine/citrulline plus H ⁺ ; ornithine/H ⁺	Liver, pancreas, lung, testis, small intestine, spleen, kidney, brain, heart/inner mitochondrial membrane. HHH syndrome ^G
SLC25A16 NM_005673.1 10q21.3	GDC (Graves disease carrier)	GP	CoA or CoA precursor (?)	Unknown	Liver, kidney, thyroid, lung, heart, skeletal muscle, brain/inner mitochondrial membrane

Continuazione Tabella I
SLC25: Caratteristiche principali della famiglia dei carrier mitocondriali umani ^[8]

Human gene name Accession number	Protein name	Aliases	Predominant substrates	Transport type/ coupling ions*	Tissue distribution, cellular/subcellular expression and Link to disease [#]
SLC25A17 NM_00635 8, 22q.13.2	ANC(peroxisomal adenine nucleotide carrier)	ANT1, PMP34	ATP, ADP, AMP	E/ATP/AMP	Brain, kidney, lung, heart, liver, pancreas/peroxisomal membrane
SLC25A18 NM_03148 1.1, 22q11.21	GC2 (glutamate carrier 2)		Glutamate	C/glutamate plus H ⁺ , E/glutamate/OH ⁻	Brain, testis, heart, pancreas, kidney, lung/inner mitochondrial membrane
SLC25A19 NM_02173 4.2 17q25.3	DNC (deoxynucleotide carrier)	MUP1	dNDPs, dNTPs, NDPs, ATP, ddNTPs	E/dNDPs/ATP	Brain, testis, lung, kidney, liver, spleen, skeletal muscle, heart/inner mitochondrial membrane. Amish microcephaly (MCPHA) ^G
SLC25A20 Y10319 3p21.31	CAC (carnitine/acylcarnitine carrier)	CACT, carnitine carrier	Carnitine, acylcarnitines	E/carnitine/acylcarnitines F (at slow rate)	Heart, skeletal muscle, liver (also in lung, kidney, brain, pancreas, placenta)/inner mitochondrial membrane. CAC deficiency ^G
SLC25A21 NM_03063 1.1 14q11.2	ODC (oxoadipate carrier)		Oxoadipate, oxoglutarate	E/oxoadipate/oxoglutarate	Kidney, gall bladder, colon, liver, placenta, testis, lung, spleen, skeletal muscle, brain, heart/inner mit. Membrane. 2-oxoadipate acidaemia?
SLC25A22 AJ428202 11p15.5	GC1 (glutamate carrier 1)		Glutamate	C/glutamate plus H ⁺ , E/glutamate/OH ⁻	Pancreas, brain, liver, testis, spleen, kidney, heart, lung, small intestine/inner mitochondrial membrane
SLC25A23 AJ619961 1p13.3	APC1 (mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier protein)	APC2, MCSC2, MGC2615, SCaMC-3	ADP, ADP-Mg, ATP, ATP-Mg, AMP, Pi	ATP-Mg/Pi	Testis, small intestine, pancreas, kidney, spleen, liver, skeletal muscle, heart
SLC25A24 AJ619962 19p13.3	APC2 (mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter)	RP11-356N1.3, APC1, DKFZp586G0123, SCAMC-1	ADP, ADP-Mg, ATP, ATP-Mg, AMP, Pi	ATP-Mg/Pi	Kidney, lung, small intestine, pancreas, liver, heart, brain, skeletal muscle, spleen
SLC25A25 AJ619963 9p34.13	APC3 (mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier)	KIAA1896, MCSC, MGC105138, MGC119514, MGC119515, MGC119516, MGC119517, PCSC, RP11-395P17.4, SCAMC-2	Showed no activity under any of the experimental condition tested.	ATP-Mg/Pi ?	Brain, testis, lung, small intestine, pancreas, skeletal muscle, heart, kidney, spleen, liver

Continuazione Tabella I

SLC25: Caratteristiche principali della famiglia dei carrier mitocondriali umani ^[8]

Human gene name Accession number	Protein name	Aliases	Predominant substrates	Transport type/ coupling ions*	Tissue distribution, cellular/subcellular expression and Link to disease [#]
SLC25A26 AJ580932 3p14.3	SAMC (S-adenosylmethionine carr. protein)	DKFZp434E079, FLJ77340,	s-adenosylmethionine (SAM) s-adenosylhomocysteine (SAHC) s-adenosylcysteine (SAC) adenosylornithine	E/SAM/SAHC	Testis, liver, heart, kidney, lung, skeletal muscle, pancreas, small intestine, spleen
SLC25A27 NM_004277 6p12.3	UCP4 (uncoupling protein 4)	RP11-446F17.2, FLJ33552,	H ⁺ (?) homologous to UCP 1/2/3	Unknown	Brain/inner mitochondrial membrane
SLC25A28 AC007643 10q24	MRS3/4 (iron transporter 2)	DKFZp547C109, MFRN2, MRS4L, NPD016	ions	Unknown	Placenta, lung, kidney, pancreas, liver, brain, skeletal muscle, heart. adPEO, IOSCIA
SLC25A31 NM_031291 4q28.1	AAC4 (adenine nucleotide translocase 4)	ANT4, DKFZp434N1235, SFEC35kDa	ADP, ATP, dADP, dATP	E/ADP/ATP	Brain, liver, testis

* C cotransporter, E exchanger, F facilitated transporter

G genetic defect

Tabella II
Carrier mitocondriali di lievito a funzione nota, caratteristiche principali ^[25]

<i>Carrier</i>	<i>Gene</i>	<i>Principali substrati</i>	<i>Modalità di trasporto</i>
Dicardossilici (DIC1)	YLR348c	malato, succinato, malonato/ Pi, solfato, tiosolfato	Antiporto
Ossalacetato/solfato (OAC1)	YKL120w	Ossalacetato, solfato	Antiporto
Ossodicarbossilato (ODC1, ODC2)	YPL134c YOR222w	ossoadipato, ossoglutarato	Antiporto
Carnitina (CRC1)	YOR100c	carnitina, acetilcarnitina,	Antiporto
Aspartato/Glutammato (AGC1)	YPR021c	Aspartato, glutammato-H ⁺	Antiporto
Ornitina (ORT1 o ARG11)	YOR130c	Ornitina, H ⁺	Antiporto
Succinato-fumarato (SFC1 o ACR1)	YJR095w	Succinato, fumarato	Antiporto
S-adenosil metion. (PET8 o SAM5)	YNL003c	SAM, SAHC	Antiporto
Tiaminapirofosfato (TPC1)	YGR096w	dATP, ThPP, ThMP	Uniport
Adeninucleotide (ANT1)	YPR128c	ATP, ADP, AMP	Antiporto
Pirimidinenucleotide (ATG14 o CVT12 o APG14)	YBR128c	Pirimidinedeossinucleotide, pirimidinenucleosidefosfato, pirimidinenucleosidetrifosfato	Antiporto
GTP/GDP (GCL1 o YHM1)	YDL198c	GTP, GDP	Antiporto
Nicotinammidinucleotide (NDT1 o YIA6, NTD2 o YEA6)	YIL006w YEL006w	NAD ⁺ /AMP, GMP	Antiporto
ADP/ATP (AAC1, PET9 o AAC2, AAC3 o ANC3)	YMR056c YBL030c YBR085w	ADP/ATP	Antiporto
Fosfato (MIR1)	YJR077c	fosfato	OH Antiporto
Citrato (CTP1)	YBR291c	Citrato, malato, fosfoenolpiruvato	Antiporto
*Flavinucleotide (FLX1)	YIL134W	FAD	
*CoA (Leu5p)	YHR002w	CoA	
*ATP-Mg/Pi (SAL1)	YNL083w	ATP/Pi	
*Ferro (MRS3, MRS4)	YJL133w YKR052c	Ferro	
*Fosfato (PIC2)	YER053c	fosfato	OH Antiporto

Tabella III
Carrier mitocondriali a funzione nota di *Arabidopsis thaliana*^[29]

<i>Carrier</i>	<i>Locus genico</i>	<i>Principali substrati</i>	<i>Modalità di trasporto</i>
Dicardossilici, Tricarbossilici (DTC)	At5g19760	2-ossocetoglutarato/ di-tricarbossilici	Antiporto
Amminoacidi basici (BAC1,BAC2)	At2g3382 At1g79900	Arg, Lys, Orn, His	Antiporto
Proteina disaccoppiante (UCP1, UCP2)	At3g54110 At5g58970	H+	Uniporto
fosfato (PiC)	At5g14040	fosfato	OH/ Antiporto
Dicarbossilici (DIC1, DIC2, DIC3)	At2g22500 At4g24570 At5g09470	malato, succinato, malonato/ Pi, solfato, tiosolfato	Antiporto
Succinato-fumarato (SFC)	At1gO1340	succinato/fumarato	Antiporto
ADP/ATP (AAC1,AAC2)	At3g08580 At5g13490	ADP/ATP	Antiporto
S-adenosil metion. (SAMC1, SAMC2)	At4g39460 At1g34065	SAC, SAM, SAHC	Antiporto
Carnitina/acilcarnitina (CAC)	At5g46800	Carnitina, acilcarnitina	Antiporto
Adeninucleotidi (ADNT1)	At4g01100	ATP,AMP	Antiporto

1.3 Patologie correlate alle deficienze di *carrier* mitocondriali

Le informazioni funzionali ottenute dagli studi effettuati sui *carrier* mitocondriali hanno contribuito ad ottenere informazioni sul ruolo fisiologico dei *carrier* mitocondriali e, hanno inoltre permesso, di mettere in correlazione mutazioni in geni nucleari codificanti per i trasportatori mitocondriali con l'insorgenza di alcune patologie.

Tutte le malattie dovute a deficienza di *carrier* mitocondriali sono trasmesse con ereditarietà Mendeliana, con la sola eccezione della Oftalmologia Esterna Progressiva ereditata con modalità autosomica dominante (adPEO), le altre sindromi sono ereditate con modalità autosomica recessiva. Le malattie correlate ai *carrier* mitocondriali possono essere divise in due gruppi.

Al primo gruppo appartengono quelle patologie che presentano un difetto genico sui *carrier* mitocondriali la quale funzione è legata alla fosforilazione ossidativa, come ad esempio il *carrier* dell'ADP/ATP (AAC) e il *carrier* del fosfato (PiC). Al secondo gruppo appartengono quelle patologie dovute all'alterazione della funzione di quei *carrier* mitocondriali che non sono implicati nella fosforilazione ossidativa ma, che determinano una alterazione delle concentrazioni fisiologiche di importanti intermedi di alcune vie metaboliche. Le sintomatologie in questo caso dipendono dalla via metabolica e dal tipo di tessuto colpito (distribuzione tissutale del *carrier*)^[33].

1.4 Malattie, i cui difetti genici su *carrier* mitocondriali determinano una azione diretta sulla fosforilazione ossidativa.

Le patologie conosciute appartenenti a questo gruppo sono: deficienza dell'AAC1, sindrome di Sangers', deficienza del PiC e Oftalmologia Esterna Progressiva autosomica dominante (adPEO). La disfunzione a livello della fosforilazione ossidativa è dovuta al *carrier* dell'ADP/ATP e al *carrier* del Pi i quali vengono utilizzati dalla cellula per trasportare nella matrice mitocondriale i substrati ADP e Pi rispettivamente utilizzati dal complesso dell'ATP sintetasi per la produzione dell'ATP (Fig.3), e' pertanto evidente come, una disfunzione nel trasporto di uno dei due substrati, sia causa di grossi danni funzionali a carico della cellula e quindi dei tessuti.

Le sintomatologie delle patologie correlate a questo tipo di difetto genico sono causate da un'insufficiente produzione di energia, soprattutto in quei tessuti, dove tali *carrier*, sono fortemente espressi^[10;34] e dove è presente un'elevata attività di fosforilazione ossidativa. In questo gruppo di patologie viene inclusa anche la PEO, anche se, la mutazione eterozigote a carico dell'isoforma 1 del *carrier* dell'ADP/ATP non determina un'azione diretta sulla disfunzione energetica ma, come vedremo nei paragrafi successivi, contribuisce all'instabilità dell'mtDNA^[33].

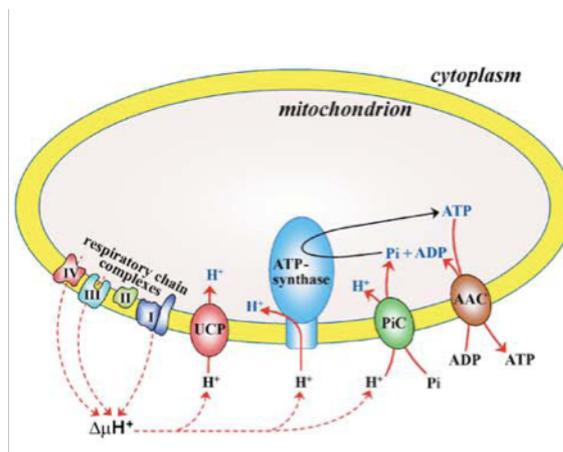


Fig.3 AAC, PiC implicazioni metaboliche: la fosforilazione ossidativa

1.4.1 Deficienza dell'isoforma 1 del carrier dell'ADP/ATP (AAC1)

Studi condotti sull'uomo hanno dimostrato, in alcuni pazienti affetti da determinate sintomatologie, la presenza di una mutazione sul gene codificante per l'isoforma 1 del *carrier* dell'ADP/ATP (AAC1) che determina il cambiamento di una alanina, altamente conservata in posizione 123 con acido aspartico. Studi condotti sulla proteina ricombinante in sistemi vescicolari artificiali hanno dimostrato che tale mutazione determina una diminuzione dell'attività di trasporto del *carrier*^[35].

Questa patologia prende il nome di AAC1 deficienza (OMIM103220) e i pazienti affetti manifestano intolleranza all'esercizio fisico, acidosi lattica, cardiomiopatia ipertrofica ma non sono in grado di sviluppare la Oftalmologia Esterna Progressiva^[33].

1.4.2 *Sindrome di Sengers'*

La sindrome di Sengers' (OMIM212350) e' una malattia, autosomica recessiva ampiamente conosciuta. I pazienti affetti, manifestano cataratta congenita, cardiomiopatia ipertrofica, miopatia mitocondriale, acidosi lattica ma non la PEO [33]. Studi condotti sui tali pazienti hanno dimostrato una diminuzione dell'attivita' di trasporto di AAC1 ma non hanno rilevato la presenza di alcuna mutazione a carico del gene SLC25A4. Ulteriori analisi condotte sui mitocondri di muscolo scheletrico in questi pazienti hanno evidenziato una drastica diminuzione del numero dei trasportatori, questo fa pensare che la causa della malattia possa essere dovuta ad un difetto della trascrizione o dei segnali che permettono la collocazione della proteina nei mitocondri.

1.4.3 *Deficienza del carrier mitocondriale del fosfato (PiC)*

Nel 2007 gli studi condotti su pazienti affetti da sintomatologie quali ipotonia muscolare, cardiomiopatia ipertrofica progressiva e acidosi lattica hanno dimostrato un difetto del gene SLC25A3 codificante per PiC. Delle due isoforme tessuto specifiche^[34] conosciute PiCA e PiCB, ottenute per splicing alternativo del gene SLC25A3^[12] sembrerebbe che la patologia (OMIM610773) sia dovuta ad una mutazione (c.215G→A) a carico dell'isoforma PiCA^[36]. I tessuti piu' colpiti sono, in effetti, il muscolo scheletrico e il cuore, dove questa isoforma, e' particolarmente espressa.

1.4.4 *Oftalmoplegia Esterna Progressiva autosomica dominante (adPEO)*

adPEO e' una patologia autosomica dominante caratterizzata sia dal punto di vista genetico che clinico da una molteplicita' di fattori. Essa e' in effetti causata da difetti di alcuni geni nucleari che causano come fine ultimo la delezione dell' mtDNA^[37-39]. Il DNA mitocondriale codifica per alcune proteine della catena respiratoria; e' pertanto evidente come una sua delezione comporti un difetto nella produzione di energia da parte dei mitocondri.

La patologia si manifesta fra i 20 e i 40 anni con sintomi come l' oftalmoplegia (paralisi della muscolatura estrinseca o intrinseca del bulbo oculare che impedisce i movimenti del bulbo) esterna dovuta alla debolezza dei muscoli del bulbo oculare, ptosi (abbassamento della palpebra superiore), leggera miopatia discendente. In alcuni casi possono manifestarsi

cataratta bilaterale, tremore, atassia, debolezza muscolare generalizzata, intolleranza all'esercizio, depressione, Parkinson e disfunzione endocrina.

Gli studi condotti sui tessuti di pazienti affetti dalla PEO hanno dimostrato una disfunzione a livello della catena respiratoria mitocondriale in particolari tessuti come, muscolo scheletrico, cuore e cervello. Questo è riconducibile alla distribuzione tissutale dell'isoforma AAC1 del *carrier* dell'ADP/ATP. In tali tessuti oltre alla presenza di *carrier* AAC1 mutati, è stata dimostrata la presenza di mtDNA eterogeneo presentante delezioni da 3 a 8.5 Kb. Oltre all' AAC1 deficienza (OMIM 609283) sembrerebbero coinvolti altri due geni nucleari responsabili delle delezioni: *Twinkle* ^[39] presente sul cromosoma 10q24 codificante per mtDNA elicase (OMIM 606075) e POLG1^[38] presente sul cromosoma 15q25 e codificante per la subunità catalitica mtDNA-polimerasi specifica γ (OMIM 157640).

Mentre è chiaro come questi due geni partecipino alla replicazione ed alla correzione dell' mtDNA, per quanto riguarda AAC1 si ipotizza che mutazioni a carico del gene SLC25A4 portino ad una alterazione delle proprietà di trasporto con conseguente diminuzione del contenuto di ADP all'interno della matrice che avrebbe come conseguenza una insufficiente sintesi, ad opera della ribonucleotide reductasi e nucleoside difosfochinase, di dATP. Questo comporterebbe una errata duplicazione dell' mtDNA ad opera della mtDNA-polimerasi ^[33].

1.5 Patologie da difetto nel funzionamento di carrier mitocondriali che evolvono in intermedi metabolici.

Le patologie conosciute appartenenti a questo gruppo sono: sindrome di Stanley, la sindrome HHH, deficienza AGC2, microcefalia di Amish^[33] e epilessia mioclonica neonatale^[40].

1.5.1 Sindrome di Stanley. deficienza del carrier mitocondriale carnitina/acilcarnitina (CAC).

La sindrome di Stanley dovuta alla deficienza del *carrier* della carnitina/acilcarnitina (CAC) (OMIM 212138) è stata la prima patologia associata ad un gene appartenente alla famiglia delle SLC25 (SLC25A20) ^[41-42]. Il gene codifica per un *carrier* mitocondriale che catalizza un trasporto elettroneutro tra una molecola di acilcarnitina e una di carnitina.

Prende parte a quello che viene definito il ciclo della carnitina che ha come fine ultimo quello di introdurre gruppi acilici, derivati dagli acidi grassi, nel mitocondrio dove verranno ossidati dal pathway della β -ossidazione[8] (Fig.4). Questa via catabolica rappresenta la principale fonte di energia del cuore e del muscolo scheletrico durante l'esercizio fisico soprattutto se prolungato e nei periodi di digiuno. E' pertanto evidente come una disfunzione di questo trasportatore determini l'impossibilita' della cellula a trasformare le catene di acidi grassi in energia.

Questa malattia e' stata descritta per la prima volta da Stanley e collaboratori [42]. E' una severa malattia autosomica recessiva che colpisce, cuore, fegato, cervello e muscolo scheletrico. Si manifesta con episodi di coma ipoglicemico a digiuno (essendo bloccata la β -ossidazione degli acidi grassi il fegato non riesce a sintetizzare corpi chetonici e i muscoli utilizzano come fonte di energia il solo glucosio), cardiomiopatia, aritmia cardiaca, stanchezza muscolare e cattivo funzionamento del fegato (accumulo di acidi grassi a lunga catena e acilcarnitina). Altri sintomi includono vomito, letargia, ipotonia, stanchezza, epatomegalia, insufficienza cardiaca, difficolta' respiratoria, ipochetosi, acidosi, iperammonemia (dovuta ad un possibile aumento dell' ossidazione degli aminoacidi) ecc. E' bene evidente come una tale disfunzione metabolica comprometta in modo severo molte funzioni dell'organismo.

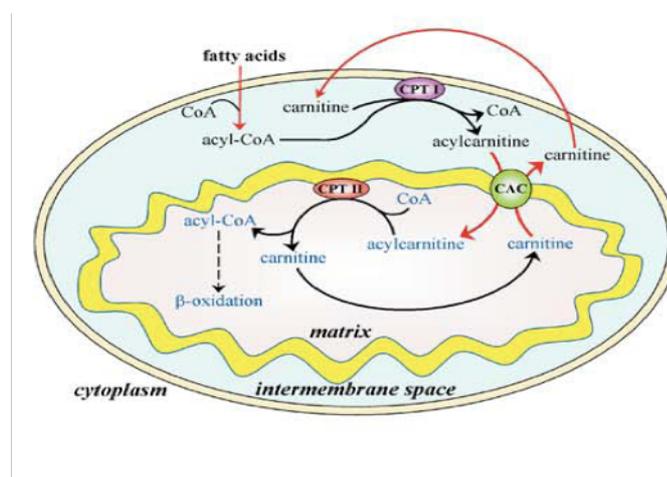


Fig.4 CAC ed implicazione metaboliche:la β -ossidazione degli acidigrassi

1.5.2 *Sindrome delle HHH (hyperammonemia, hyperornitinemia, homocitrullinuria).*

Sindrome delle HHH (OMIM238970) rappresenta un'altro esempio di patologia dettata da disfunzione metabolica. In questa patologia le mutazioni sono a carico del gene SLC25A15 codificante per il *carrier* mitocondriale ornitina/ citrullina (ORC1) importante nel ciclo dell'urea e nell'omeostasi di numerosi amminoacidi. Fino ad oggi sono state scoperte nell'uomo due isoforme di tale *carrier* ORC1 coinvolto in tale patologia ed il *carrier* ORC2 (SLC25A2) entrambe overesprese e caratterizzate funzionalmente in vescicole fosfolipidiche artificiali^[43].

Viene chiamata con il nome di sindrome HHH in quanto si manifesta con hyperammonemia, hyperornitinemia, homocitrullinuria. Un cattivo funzionamento del *carrier* ORC1 determina una disfunzione delle vie metaboliche alle quali prende parte mediante la sua normale attivita' di trasporto (Fig.5) . Nei mitocondri dei pazienti affetti da tale patologia si ha un mancato ingresso di ornitina nel mitocondrio che pertanto si accumula nel citoplasma (hyperornitinemia). La mancanza di ornitina nei mitocondri non consente la sintesi di citrullina nella reazione che ha come substrati, ornitina e carbamoil fosfato, nella reazione catalizzata dell'ornitina transcarbamilasi. La citrullina e' un importante substrato del ciclo dell'urea pertanto una mancata sintesi e traslocazione nel citoplasma determina un blocco del ciclo dell'urea (hyperammonemia). Come ulteriore conseguenza si ha accumulo di carbamoil fosfato che si condensa con la lisina a formare omocitrullina. Questa reazione secondaria determina un aumento delle concentrazioni di omocitrullina (homocitrullinuria).

La patologia si puo' manifestare in diverse fasi della vita, nel 10% dei pazienti si manifesta in eta' neonatale. La malattia si presenta con episodi di confusione, letargia e coma da iperammonemia, a volte si puo' manifestare con disordini di tipo neurologici come ritardo mentale e difficolta' nell'apprendimento e paraplegia spastica^[44].

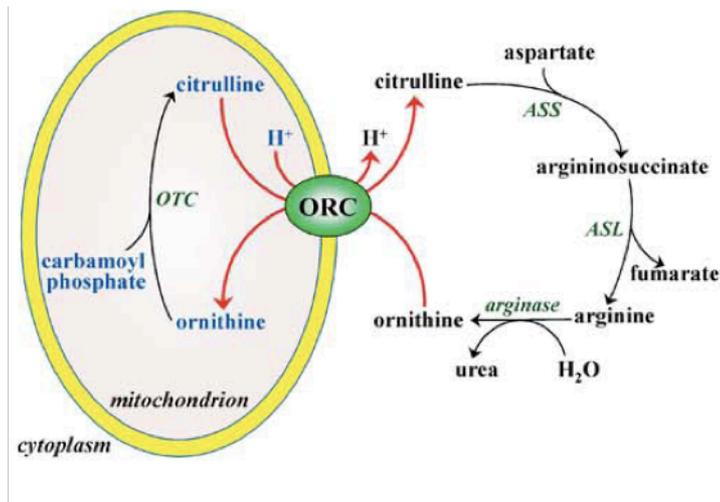


Fig.5 ORC, trasporto e implicazioni metaboliche: il ciclo dell'urea

1.5.3 Deficienza dell' isoforma 2 del carrier Aspartato /glutammato (AGC2 deficienza)

L' AGC2 deficienza e' una diffusa patologia autosomica recessiva dovuta ad un difetto sul gene SLC25A12 codificante per isoforma 2 del carrier Aspartato /Glutammato^[5].

Dagli studi effettuati AGC2 e' espressa in modo ubiquitario ma particolarmente nel fegato dove e' crocevia di numerose vie biochimiche. Prende parte al ciclo dell'urea convogliando aspartato nel citosol, il quale reagendo con la citrullina (argininosuccinato sintetasi) forma l'acido arginosuccinico. Oltre che per il ciclo dell'urea la presenza di aspartato nel citosol e' importante per la gluconeogenesi per le proteine e per la sintesi di purine e pirimidine. Inoltre AGC2 risulta di notevole importanza insieme al carrier del malato/ α -chetoglutarato^[3] per l'ossidazione del NADH a NAD⁺ (Fig.6).

Viste le notevoli implicazioni metaboliche del *carrier* AGC2 una sua alterazione funzionale risulta essere la causa di malattie molto gravi.

Mutazioni a carico di tale *carrier* comporta una mancata traslocazione dell'aspartato dai mitocondri al citosol con conseguente blocco del ciclo dell'urea (iperammonemia) e aumento della concentrazione plasmatica della citrullina (citrullinemia). Inoltre una mancata attivita' del carrier causa un accumulo nel citoplasma di NADH con conseguente blocco della degradazione dei carboidrati. Citrullinemia e iperammonemia sono le due uniche cause del dissesto. Si possono distinguere due fenotipi di malattie classificabili in funzione dell'eta' d'insorgenza: citrullinemia di tipo II, che si manifesta in eta' adulta tra i 20 e i 50 anni di eta' (CTLN2, OMIM 603471), e colestasi intraepatica neonatale (AGC2) deficienza (NICCD, OMIM 605814).

Nella citrullinemia di tipo II il mancato trasporto di aspartato nel citosol, dovuto al cattivo funzionamento del *carrier*, negli epatociti causa citrullinemia, ipoproteinemia e ricorrenti episodi iperammonemia responsabile di encefalopatie e sintomi psichiatrici (disorientamento, tremore, convulsione, coma)^[45].

Il fenotipo neonatale, NICCD, e' stato scoperto recentemente ^[80].

I neonati affetti dalla malattia presentano colestasi intraepatica, fegato grasso, epatomegalia, ritardo nella crescita, amminoacidemia, ipoproteinemia. Alcuni pazienti presentano epatiti, diminuzione dei fattori di coagulazione e anemia emolitica.

Il fenotipo neonatale dell'AGC2 deficienza e' generalmente benigno e i sintomi scompaiono dopo il primo anno di eta' in altri casi dove la malattia si presenta in modo piu' severo evolve nel fenotipo CTLN2.

Il passaggio dalla NICCD alla CTL2 e' dovuto al fatto che nel periodo di transizione il difetto metabolico porta ad una compromissione del sistema epatico.

In effetti per un determinato periodo l'organismo riesce a tamponare la mancanza di aspartato nel citoplasma in quanto in grado di sintetizzarlo mediante due vie alternative: dall'asparagina mediante l'azione dell'enzima asparaginasi e dall'ossalacetato mediante l'azione della dell'aspartato amminotransferasi citosolica. L'asparagina puo' essere sia sintetizzata nel citoplasma dall'asparagina sintetasi, che assorbita dalla dieta. L'ossalacetato invece puo' essere prodotto fumarato prodotto intermedio del ciclo dell'urea. Inoltre e' nota la presenza di un'altra via che consente l'ossidazione del NADH nel citosol che e' lo shuttle del glicerolo-3-fosfato che nell'uomo pero' ha una attivita' molto bassa.

Per evitare ritardo mentale nei pazienti affetti da NICCD viene raccomandata una dieta ricca in lipidi e proteine e scarsa in carboidrati cosi' da evitare iperammonemia.

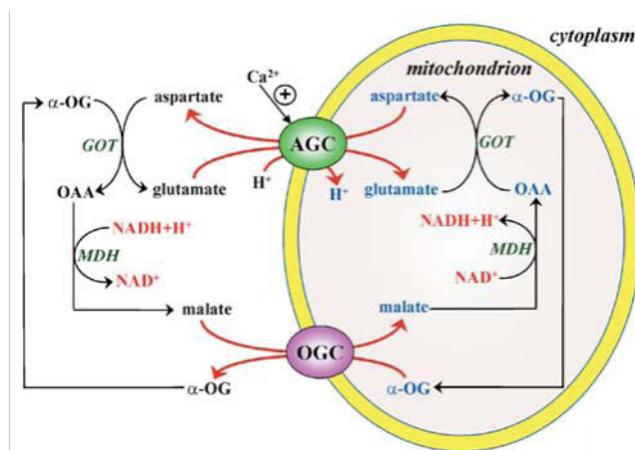


Fig.6 Implicazioni metaboliche di AGC

1.5.4 Microcefalia Amish.

La microcefalia Amish (MCPHA, OMIM 607196) e' una patologia a carattere metabolico che si manifesta con una severa microcefalia e α -ketoglutarato aciduria (sopravvivenza massima 14 mesi)^[47]. Tale microcefalia prende il nome dalla comunita' di Amish residente in Pensilvenia USA dove e' stata riscontrata con una incidenza di 1 su 500 individui. Questa patologia e' causata da un difetto sul gene SLC25A19 codificante per il trasportatore mitocondriale dei deossinucleotidi (DNC)^[11] successivamente identificato come il trasportatore della tiamina pirofosfato (TPC).

Il *carrier* e' stato ampiamente studiato: overespresso e caratterizzato dal punto di vista funzionale in vescicole fosfolipidiche. Catalizza il trasporto a cavallo della membrana mitocondriale di tiaminapirofosfato (ThPP), tiaminamonofosfato (ThMP), deossinucleotidi e nucleotidi anche se con minore efficienza^[48]. Sono stati inoltre condotti studi sul genoma dei pazienti affetti dalla patologia che hanno dimostrato la presenza di una mutazione (c530G→C) che porta alla sostituzione glicina-alanina in posizione 177. L'ipotesi che tale proteina fosse implicata nella patologia e' stata ampiamente dimostrata sia studiando in vescicole fosfolipidi la proteina ricombinante mutata (diminuzione dell'attivita' di trasporto fino al 70%) ma soprattutto dagli studi condotti su topi Knok-out SLC25A19^{-/-} (stesso fenotipo)^[49].

TPC catalizza il trasporto di ThPP prodotta nel citoplasma, all'interno dei mitocondri, in scambio con ThMP. La ThPP e' un importante coenzima e all'interno dei mitocondri consente la decarbossilazione ossidativa del piruvato e dell' α -ketoglutarato coadiuvando l'attivita' enzimatica della piruvato deidrogenasi (PDH) e della chetoglutarato deidrogenasi (KGDH), enzimi chiave del ciclo di Krebs. Il mancato ingresso della ThPP nei mitocondri determina pertanto un blocco del metabolismo ossidativo.

In questa patologia i principali effetti della mutazione del *carrier* si riflettono sul cervello in quanto il suo sviluppo e' notevolmente legato al metabolismo ossidativo.

1.5.5 Epilessia Neonatale Mioclonica

Mutazioni a carico del gene SLC25A22 codificante per l'isoforma 1 del *carrier* del glutammato (GC1)^[50] determina una forma prematura di epilessia mioclonica chiamata Epilessia Neonatale Mioclonica (EME), (OMIM 609304)^[51].

GC1 catalizza un simporto glutammato/H⁺ all'interno dei mitocondri sfruttando la forza proton motrice presente a cavallo della membrana interna mitocondriale. Il *carrier* puo'

anche operare un simporto in direzione contraria nel caso in cui il glutammato venga sintetizzato all'interno (ossidazione della prolina). Gli studi condotti su questa proteina hanno dimostrato una distribuzione tissutale ubiquitaria con una maggiore espressione nel fegato, pancreas e cervello. Nel genoma dei pazienti affetti da questa patologia sono state riscontrate alcune mutazioni a carico di GC1 ma ancora oggi non è molto chiara il ruolo di questo trasportatore nello sviluppo della malattia anche se sono state raccolte numerose informazioni a riguardo: i) durante lo sviluppo fetale GC1 è espressa prima nel cervello ed in particolar modo in quelle aree responsabili del controllo e della genesi degli attacchi mioclonici^[51]; ii) GC1 è espressa a livelli molto più alti negli astrociti rispetto ai neuroni^[52]; iii) i mitocondri degli astrociti non hanno il *carrier* dell'aspartato/glutammato^[53] e il glutammato entra solo attraverso GC1; iv) il glutammato è il maggiore neurotrasmettitore a carattere eccitatorio; e v) il glutammato rilasciato nelle sinapsi viene recuperato dagli astrociti può essere pertanto ipotizzabile che una mancanza di attività di trasporto di GC1 determini un conseguente incremento della concentrazione di glutammato nello spazio intersinaptico. La malattia si presenta con severi attacchi mioclonici, ipotonia, microcefalia progressiva, anomalie funzionali del nervo ottico e rapida evoluzione in encefalopatie. Non esistono cure e i bambini muoiono dopo 1 o 2 anni dalla nascita o sopravvivono in uno stato vegetativo.

1.5.6 Autismo: implicazione del carrier dell'aspartato/glutammato AGC1 [92]

Il Disturbo Autistico rientra tra i Disturbi Pervasivi dello Sviluppo ed è caratterizzato da alterazioni nell'ambito del linguaggio, della comunicazione e delle abilità sociali, nonché da comportamenti ripetitivi e stereotipati^[54]. Il sistema nervoso centrale dei soggetti autistici processa informazioni attivando reti neurali diverse da quelle utilizzate da individui non autistici, specialmente nell'elaborazione di stimoli socialmente rilevanti^[55]. Le cause della malattia sono tutt'oggi sconosciute ma, gli studi condotti negli ultimi anni hanno evidenziato una serie di disordini sia di carattere genico che ambientale. Questi disordini sono molteplici e di diversa natura^[56] in grado di generare una grande varietà di fenotipi che rendono la patologia difficile da studiare.

Sembrerebbe che, alla base della malattia vi sia un'alterazione della proliferazione, funzione e morte neuronale, che porterebbero ad una compromissione delle normali vie di comunicazione fra le diverse aree del cervello. Gli studi condotti su alcuni pazienti hanno evidenziato una massiccia attivazione trascrizionale di geni codificanti per citochine e

fattori coinvolti nei processi immunitari, nonché un possibile coinvolgimento di fattori esterni (virus), in grado di determinare una violenta risposta immunitaria a livello del sistema nervoso centrale. In altri pazienti si è osservata una riduzione di espressione di geni importanti nello sviluppo del sistema nervoso^[57].

L'implicazione del trasportatore mitocondriale aspartato/glutammato (AGC1)[5], codificato dal gene SLC25A12, in soggetti autistici nasce in seguito ad uno studio condotto su tessuto neocorticale post-mortem di pazienti affetti dalla patologia^[40]. In omogenati di tali tessuti è stata evidenziata una notevole attività di trasporto del carrier che sembrerebbe essere legata ad un alterato livello di calcio nel tessuto cerebrale. L'isoforma 1 dell'ACG è espressa ad alti livelli nel cervello ed in particolare nelle cellule gliali, il suo ruolo è quello di catalizzare il trasporto aspartato/glutammato a cavallo dalla membrana mitocondriale interna. All'N-terminale possiede un dominio EF-hand in grado di legare il calcio che ne regola l'attività. Il carrier gioca un ruolo importante nel metabolismo energetico regolando i livelli di NAD/NADH sia nel citoplasma che nella matrice mitocondriale interna. Un aumento della concentrazione citoplasmatica del calcio determina una attivazione dell'AGC1 che attraverso il complesso della catena respiratoria si traduce in un aumento della sintesi di ATP. Fattori genetici e/o virali possono interferire con la normale produzione di ATP che ha come conseguenza un aumento dello stress ossidativo con produzione di radicali liberi tossici per le cellule neuronali. La stretta correlazione fra autismo e disfunzione energetica a livello celebrale nei pazienti affetti da autismo è stata evidenziata dall'aumento plasmatico del lattato e in qualche caso da una notevole correlazione fra disordini della catena respiratoria ed autismo. Una possibile strategia farmacologica per evitare la progressione della malattia potrebbe essere quella di diminuire l'ingresso di calcio all'interno delle cellule ma l'importanza del calcio come messaggero intracellulare rende la terapia di difficile applicazione. La scoperta di farmaci in grado di regolare l'attività di trasporto dell'AGC1 potrebbe essere una nuova strategia per la cura della malattia^[40].

1.6 Altre patologie correlabili all'attività dei *carrier* mitocondriali.

Sembra inoltre che altri *carrier* siano corresponsabili di alcune patologie con meccanismi ancora da chiarire.

Il *carrier* del citrato (CIC), codificato nell'uomo dal gene SLC25A1[5], si sa essere implicato nella sindrome di DiGeorge (DGS) e nella sindrome velo-cardio-facciale (VCFS). Il gene umano del *carrier* del citrato è, infatti, localizzato sul cromosoma 22q11.21, in una regione implicata nella DGS, nella VCFS e in un sottotipo di schizofrenia. Inoltre, il *carrier* del citrato è eterozigote in circa tutti i pazienti DGS e VCFS e si pensa contribuisca alla demenza riscontrata nei soggetti affetti da tali patologie.

L'attività di trasporto del CIC, alta nel fegato e bassa nel cuore e nel cervello, è influenzata da fattori ormonali e nutrizionali. Questa è aumentata nell'ipertiroidismo e nel cancro, ed è significativamente ridotta durante il digiuno e il diabete di tipo I, tuttavia, in tal caso può essere corretta mediante la somministrazione esogena d'insulina.

Infine, sebbene i difetti molecolari responsabili della α -chetoadipato acidemia, non siano ancora ben caratterizzati, il ruolo fisiologico del *carrier* degli acidi cheto-dicarbossilici^[4] suggerisce un possibile coinvolgimento di quest'ultimo, in tale patologia. Questa è caratterizzata dall'accumulo e dall'escrezione nelle urine, di α -chetoadipato, α -amminoadipato e α -idrossiadipato e da sintomi clinici di ritardo mentale, ipotonia e atassia.

1.7. Il trasportatore degli acidi dicarbossilici

Il *carrier* degli acidi dicarbossilici (DIC) è una proteina codificata dal nucleo e localizzata nella membrana mitocondriale interna. Dagli anni 70, data in cui per la prima volta si ipotizzò l'esistenza di tale trasportatore, ad oggi, il *carrier* è stato caratterizzato dal punto di vista funzionale in diversi organismi^[4;30]. Esso catalizza un trasporto di acidi dicarbossilici come malato e succinato a cavallo della membrana in scambio con fosfati, solfati e tiosolfati. La sua funzione di trasporto di soluti attraverso la membrana mitocondriale interna è di notevole importanza in diversi cicli metabolici quali: la gluconeogenesi (Fig.7), la sintesi dell'urea (Fig.8) e il metabolismo dello zolfo^[8].

Il *carrier* segue un meccanismo di antiport simultaneo più complesso di altri antiport mitocondriali noti. Per ogni lato della membrana il *carrier* presenta due siti di legame: uno specifico per il fosfato (tiosolfato, arsenato e fenilfosfato) e l'altro specifico per i

dicarbossilati (malato, succinato butilmalonato). I siti di legame devono essere occupati simultaneamente per consentire la traslocazione dei substrati attraverso un meccanismo di tipo sequenziale. Questo vale sia per gli eteroscambi malato/fosfato, che per gli omoscambi malato/malato e fosfato/fosfato^[59].

Dal punto di vista biochimico il *carrier* degli acidi dicarbossilici è coinvolto in una serie di vie metaboliche quali la gluconeogenesi e l'ureogenesi.

Come mostrato nella figura 7, la traslocazione del malato dalla matrice mitocondriale al citosol in controtrasporto con fosfato consente di rifornire di fosfoenolpiruvato (PEP) la via gluconeogenica.

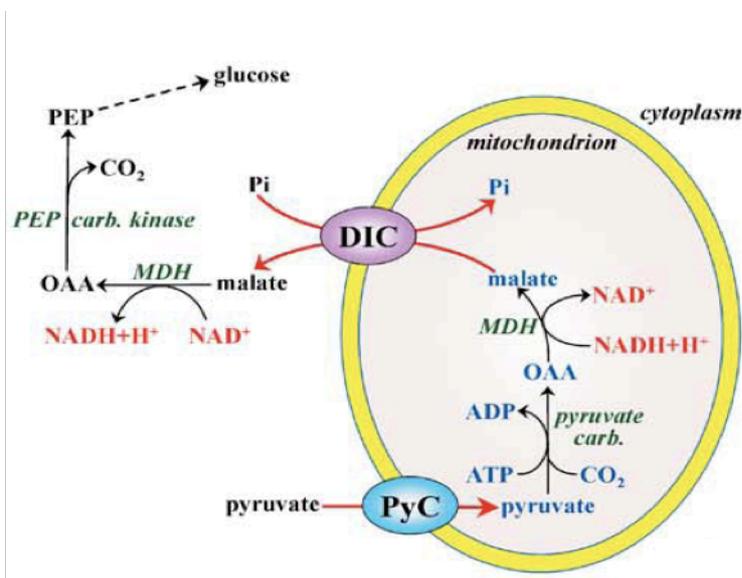


Fig.7 Ruolo del carrier mitocondriale DIC nella gluconeogenesi

DIC risulta inoltre di notevole importanza nell'ureogenesi in quanto il fumarato, creato dalla argininsuccinato liasi, viene trasformato in malato ad opera della fumarasi citosolica e trasportato nella matrice mitocondriale dal trasportatore DIC (Vedi figura 8).

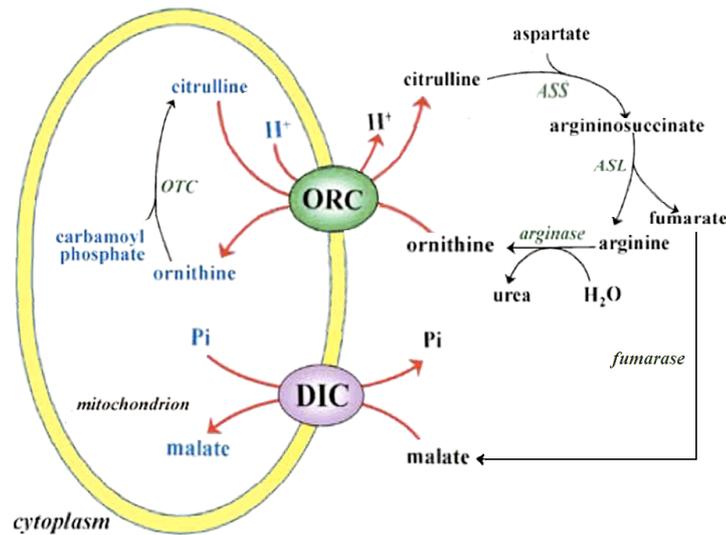


Fig.8. Ruolo metabolico di DIC nel ciclo dell'urea

DIC sembra essere inoltre coinvolto nel metabolismo dello zolfo. In particolare facilita il passaggio dei tiosolfati nel mitocondrio favorendone l'utilizzo da parte di enzimi come rodanasi e tiosolfato reductasi. Potrebbe inoltre avere anche una funzione anaplerotica rifornendo la matrice mitocondriale di intermedi del ciclo di Krebs^[8]

Nell'uomo, organismo di maggiore interesse, solo 30 anni dopo la prima ipotesi dell'esistenza di carrier degli acidi dicarbossilici il gene è stato individuato^[60]. Il gene mappato sul cromosoma 17q25.3 ha una lunghezza di 8,6 kb, presenta 11 esoni che codificano per una proteina di 287 aa. La proteina è espressa maggiormente in fegato e reni mentre bassi livelli di espressione sono stati riscontrati in polmoni, cervello, placenta e cuore, mentre bassissimi livelli sono stati osservati nel muscolo scheletrico^[60].

Il trasportatore mitocondriale degli acidi dicarbossilici nell'uomo non è stato caratterizzato dal punto di vista funzionale e cinetico, in quanto le tecniche tutt'oggi disponibili non hanno consentito l'espressione della proteina ricombinante, la sua funzione è stata pertanto ipotizzata per omologia di sequenza con i trasportatori degli acidi dicarbossilici caratterizzati negli altri organismi eucarioti superiori. Nelle tabelle IV sono riassunti le costanti cinetiche e la specificità di substrato della proteina caratterizzate nei diversi organismi.

Tabella IV

Costanti cinetiche del carrier degli acidi dicarbossilici in *Rattus norvegicus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana*.

Organismo	Km(mM)		Vmax (mmol/min/g proteina)
	Malato	Fosfato	
<i>Rattus norvegicus</i>	0.78 ± 0.14	1.77 ± 0.27	6.8 ± 0.9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.56 ± 0.09	1.65 ± 0.19	5.6 ± 0.7
<i>Caenorhabditis elegans</i>	0.54 ± 0.10	1.52 ± 0.36	22.6 ± 2.8
<i>Arabidopsis</i> DIC1	0.40 ± 0.09	0.47 ± 0.06	Malato 0.29 ± 0.06 Fosfato 0.22 ± 0.05
<i>Arabidopsis</i> DIC2	0.51 ± 0.07	0.66 ± 0.07	Malato 1.01 ± 0.11 Fosfato 0.81 ± 0.15
<i>Arabidopsis</i> DIC3	0.79 ± 0.05	0.69 ± 0.04	Malato 2.21 ± 0.31 Fosfato 1.78 ± 0.16

Nonostante la proteina sia stata ampiamente caratterizzata, in letteratura non vi sono informazioni circa questo *carrier* in *Drosophila melanogaster*, sebbene l'alto livello di similarità di sequenza con il genoma umano e la facile ed economica manipolazione lo rendano un buon organismo modello.

1.8. *D. melanogaster*: organismo modello dal quale partire per scoprire i segreti del trasporto mitocondriale.

Drosophila melanogaster, il comune moscerino della frutta, è un insetto dell'ordine *Diptera*, della lunghezza di 3 mm. Il ciclo vitale è piuttosto breve, si conclude nell'arco di 2 settimane a 25°C. Le femmine possono deporre fino a 400 uova che si schiudono dopo 24 ore (embrione). Prima di giungere allo stadio di adulto e, quindi, alla maturità sessuale, le larve devono passare attraverso 3 stadi fino al momento in cui si impupano. Le pupe per circa cinque giorni restano nella fase di metamorfosi e si nutrono del cibo accumulato. Trascorso tale periodo emerge l'insetto adulto (Fig.9).

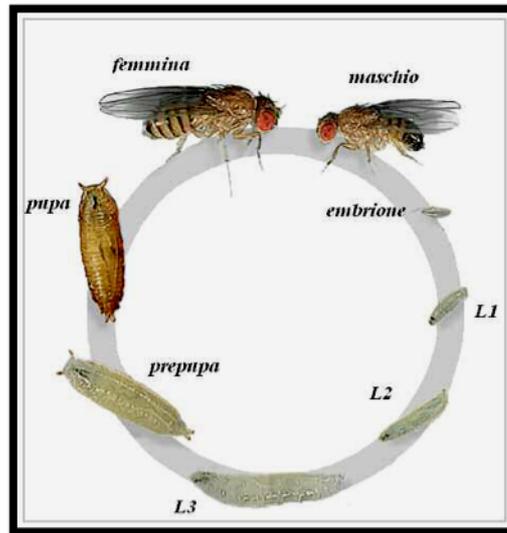
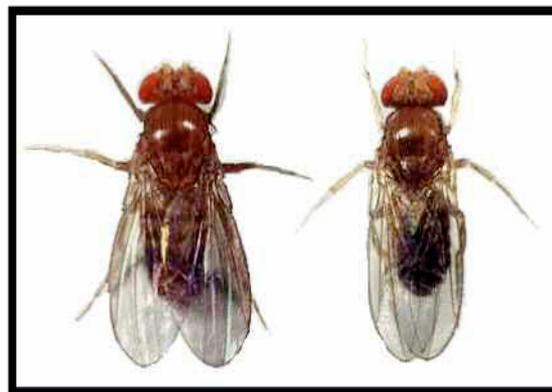


Fig. 9: ciclo vitale di *D. melanogaster*. L1, L2, L3 (primo, secondo e terzo stadio larvale), prepupa (pupa bianca), pupa (pupa nera)

Esistono due forme sessuali, facilmente distinguibili allo stereoscopio: il maschio (XY) e la femmina (XX). Il primo è più piccolo ed ha la parte terminale del corpo più scuro con un ciuffo di peli che circondano i genitali e l'ano (Fig. 10) ^[61].



**Fig. 10: *Drosophila melanogaster*.
A sinistra una femmina, a destra
un maschio.**

D. melanogaster è uno dei più importanti organismi modello per la biologia in particolare nelle ricerche genetiche e nello studio dello sviluppo cellulare. Circa il 60% dei geni coinvolti in malattie umane si possono ritrovare nel patrimonio genetico del moscerino e circa il 50% delle proteine della *D. melanogaster* hanno un ortologo nei mammiferi ^[62],

pertanto la caratterizzazione di proteine a funzione sconosciuta in questo organismo è utile per la successiva caratterizzazione degli orologi umani.

Come riportato nel paragrafo precedente, ad oggi, è stato possibile associare solo ad alcuni *carrier* di mammifero, uno specifico trasporto mediante ricostituzione delle proteine in sistemi vescicolari isolati. Di tali *carrier* è nota la sequenza nucleotidica, la struttura proteica, la specificità di substrato, il ruolo fisiologico, nonché, in taluni casi, l'implicazione in patologie umane.

Esistono tuttavia, numerosi possibili *carrier* mitocondriali le cui sequenze nucleotidiche sono disponibili in banca dati, ma che non sono stati, a tutto oggi, associati ad uno specifico trasporto mediante ricostituzione delle proteine in sistemi vescicolari isolati.

E' noto, inoltre, da studi condotti su mitocondri intatti e/o su specifiche proteine purificate dai mitocondri, che esistono *carrier* mitocondriali di mammifero, che mediano specifici trasporti attivi a cavallo della membrana mitocondriale interna, la cui sequenza amminoacidica non è ancora conosciuta.

Tra questi *carrier* "smarriti", vi sono specifiche proteine non ancora caratterizzate, che effettuano trasporti importanti, come: il simporto piruvato- H^+ nonché il trasporto di nucleotidi necessari per la sintesi del DNA mitocondriale.

Sono stati osservati trasporti intra-mitocondriali di dCTP, di adenosina, di guanina e degli adenin-nucleotidi, ma questi non sono ancora stati associati ad una specifica proteina. Alcuni sono stati osservati in mitocondri estratti da tessuti umani, come il trasporto di dCTP^[63] e di guanina^[64], altri in mitocondri estratti da tessuti di ratto, come il trasporto di adenosina^[65] e degli adenin-nucleotidi^[66]. Di tali proteine, la cui presenza nella membrana mitocondriale di mammifero è stata dimostrata, non è nota né la struttura proteica primaria, né la sequenza nucleotidica.

Si conoscono, inoltre, *carrier* mitocondriali di nucleotidi di eucarioti inferiori, come il trasportatore di GTP/GDP^[67] identificato in *Saccharomyces cerevisiae*, i cui orologi umani non sono ancora noti.

Gli studi effettuati sui *carrier* mitocondriali sono volti, spesso, ad associare i trasporti osservati nei mitocondri intatti o quelli effettuati da proteine isolate dai mitocondri, a delle specifiche sequenze nucleotidiche e amminoacidiche. Visto l'alto livello di similarità di sequenza con il genoma umano e la facile ed economica manipolazione la *D. melanogaster* può rappresentare l'organismo di svolta nella comprensione dei meccanismi di trasporto a cavallo della membrana mitocondriale interna. Tale organismo può risultare di notevole importanza per la comprensione di numerose patologie a carattere mitocondriale. In

letteratura sono riportati pochi studi sui *carrier* mitocondriali in *D. melanogaster*; gli unici ad essere caratterizzati funzionalmente, sono: l'isoforma 5 della proteina disaccoppiante (*DmUCP5*), codificata dal gene CG7314^[68] il *carrier* dell'ADP/ATP codificata dal gene CG16944^[69] e il *carrier* del citrato (*DmCIC*) codificato dal gene CG6782^[14].

In questo lavoro pertanto la nostra attenzione è rivolta alla identificazione dei possibili geni che in *D. melanogaster* codificano per *carrier* mitocondriali ed in particolare all'identificazione di geni codificanti per *carrier* trasportatori di acidi dicarbossilici.

Studi preliminari eseguiti mediante l'utilizzo di banche dati e particolari programmi informatici ci hanno consentito di individuare 4 geni: CG18363, CG11196, CG8790 e CG4323 tutti possibili ortologhi del gene umano SLC25A10 codificante per il *carrier* degli acidi dicarbossilici umano (*hDIC*).

La nostra curiosità si è accesa in seguito alla considerazione che in questo organismo sembrano presenti quattro differenti isoforme. La caratterizzazione cinetica e funzionale di questa sottofamiglia di *carrier* mitocondriali, in *D. melanogaster* potrebbe aprire la strada per la scoperta di nuovi membri umani della MCF nonché alla comprensione di quei lati "oscuri" del trasporto di soluti attraverso la membrana mitocondriale interna.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Reverse Trascrittase PCR (RT-PCR).

La *Reverse Transcriptase-PCR* è una metodica rapida e versatile che consente di amplificare, in modo specifico e selettivo, frammenti di DNA partendo da un *pool* di RNA di un determinato tipo cellulare. Consente inoltre l'analisi semiquantitativa dei livelli di espressione di un gene in un tessuto. È costituita da due tappe:

- ✓ retrotrascrizione dell'RNA (RT);
- ✓ amplificazione del cDNA ottenuto (PCR).

Incubando l'RNA totale (2 µg) estratto da vari stadi di *D.melanogaster* (*Triazol kit*, *Invitrogen*), l'enzima *trascrittasi inversa*, precursori deossiribonucleotiditri-fosfato (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), PCR *buffer* e ioni bivalenti Mg⁺⁺ in un volume totale di 40 µl è stato possibile, mediante il *GeneAmp RNA PCR Core kit* (*Applied Biosystem*), in presenza di *random primer* dare il via alla formazione del cDNA (*DNA copia*).

I *random primer* non sono altro che degli esameri con sequenze apposite che si legano casualmente in diverse regioni dell'RNA e forniscono un 3'-OH che la *trascrittasi inversa* usa per allungare la catena, generando brevi tratti di cDNA, utilizzando come stampo il trascritto. La reazione ha previsto:

- ✓ RNA totale 2.0 µg
- ✓ 5X RTase Buffer 6.0 µl
- ✓ RNAase inhibitor 0.5 µl
- ✓ 0.1 mM DTT 1.5 µl
- ✓ Ex random 1.0 µl
- ✓ H₂O 12.0 µl

La mix e' stata incubata a 72° C per 5' e poi a temperatura ambiente per 15'.

Successivamente alla mix sono state aggiunte:

- ✓ 5X RTase Buffer 4.0 µl
- ✓ 0.1 mM DTT 1.0 µl
- ✓ RNAase inhibitor 0.5 µl
- ✓ 5 mM dNTPs 5.0 µl
- ✓ RTase 1.0 µl

Sintetizzato il cDNA e allontanata la *trascrittasi inversa* è stato aggiunto alla provetta l'innesco specifico e complementare all'estremità 3' del gene da amplificare e la *Taq polimerasi*, *DNA polimerasi* termostabile, che sintetizza il filamento complementare.

2.2 Reazione di PCR^[70].

Il DNA a doppia elica ottenuto è stato quindi sottoposto a tre step caratteristici della Reazione di Polimerizzazione a Catena (PCR) che segnano l'inizio di un'altra fase di replicazione condotta questa volta per entrambi i filamenti:

- 1. denaturazione:** il DNA viene separato, al calore, nei due filamenti complementari;
- 2. appaiamento:** i *primer* oligonucleotidici (*forward e reverse*), complementari ad entrambe le estremità 3' della sequenza che si vuole amplificare, ibridano con i due filamenti denaturati ad una temperatura che è orientativamente 5°C più bassa della T_m (*Temperatura di Melting*) $[4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)]$ dei *primer* stessi. La loro sequenza è orientata in modo da poter guidare la polimerizzazione del DNA nel tratto compreso tra le due regioni a cui essi si legano e vengono utilizzati in eccesso per favorire la loro associazione al filamento stampo rispetto a quella tra i due filamenti complementari;
- 3. estensione:** i *primer*, in presenza dei quattro dNTP e della *Taq polimerasi*, vengono estesi ognuno in direzione dell'altro ma su due diverse catene complementari portando alla sintesi di due molecole di DNA a doppia elica, copie della regione bersaglio delimitata dagli inneschi.

L'insieme di questi tre passaggi costituisce un ciclo di reazione. Cicli successivi di denaturazione, appaiamento ed estensione hanno portato all'amplificazione in maniera esponenziale (2^n , dove n = numero di cicli) del segmento di DNA di interesse, in quanto ogni ciclo raddoppia la quantità di DNA che verrà, nel ciclo successivo, utilizzata come stampo.

2.3 Costruzione dei primer.

I primer necessari per l'analisi semiquantitativa dell'espressione dei geni delle quattro isoforme di *DmDIC* nei quattro stadi del ciclo vitale della *D.melanogaster* sono stati disegnati in modo da discriminare nel cDNA totale, ottenuto dalla retrotrascrizione degli RNA totali, le quattro isoforme presenti.

Con l'ausilio della banca dati FlyBase sono state individuate le regioni discriminanti a cavallo di introni in modo da evitare l'eventuale interferenza del DNA genomico.

I primer forward individuati sono stati i seguenti:

DIC1-RA CG8790-RA RT For CACCGGCATGACATAACACAGCC

DIC1-RB CG8790-RB RT For CACCCGGAAAACCAGAGGCAG

DIC2 CG4323 RT For CGAATCGATCAGCTTAGTTGAGACAGGTA

DIC3 CG11196 RT For CTTTGTAGATGCGGAAAAGGCCG

DIC4 CG18363 RT For ATGCCGGTTTTTGATGACCACTTC

I primer revers sono stati costruiti copiando una regione al 3' rispetto al forward e dopo complementazione ed inversione il risultato e' stato il seguente:

DIC1 CG8790 RT Rev GCTTGAATCCCTCCTGGCGGTAG

DIC2 CG4323 RT Rev AATACGCCGCTGGTTGTAGGACATC

DIC3 CG11196 Rev RT CTTTGTAGATGCGGAAAAGGCCG

DIC4 CG18363 Rev RT GAAGTGGTCATCAAAAACCGGCAT

Per le due isoforme di DIC2 e' necessaria una sola coppia di primer in quanto in grado di discriminare le due isoforme con due amplificati a differenti paia di basi.

Inoltre sono stati disegnati due primer:

rp49 CG7939 RT For ATGACCATCCGCCAGCATAACA

rp49 CG7939 RT Rev TTGGTGAGGCGGACCGACAG

Questa coppia di primer amplifica un frammento di 368 bp della proteina ribosomiale di *D.melanogaster* 49 (rp49), gene ubiquitario da usare nella RT-PCR come sistema di normalizzazione dell'espressione dei vari geni nei vari stadi del ciclo vitale della *D.melanogaster*. e di controllo dell'integrita' di retro trascritti.

Per la stesura dei primer utilizzati per l'amplificazione dei cDNA da clonare nei vettori di espressione si e' reso necessario l'utilizzo del programma informatico DNA Strider al fine di individuare i siti di restrizione assenti nel cDNA delle 4 isoforme di *DmDIC*.

Per la costruzione del primer Forward , *DmDIC1*(CG8790) For, è stata copiata una breve sequenza nucleotidica all'estremità 5' del corrispettivo modulo di lettura aperto (open

reading frame o ORF), a partire dall'ATG iniziale, codificante per la proteina *DmDIC1* da clonare nel vettore di espressione pET-21b/V5-His:

ATGCCCCACCAAGAGAGAAAAT

Sfruttando la presenza dell'ATG, a monte di questa tripletta è stato costruito il sito di restrizione Nde I (CATATG). Inoltre a monte del sito Nde I sono state aggiunte tre "extrabasi" (TAG), necessarie per migliorare l'efficienza di taglio degli enzimi di restrizione. La sequenza del primer forward *DmDIC1* For, così ottenuta, è la seguente:

5' TAGCATATGCCCCACCAAGAGAGAAAAT 3'

Per la costruzione del primer reverse, *DmDIC1* Rev, per il clonaggio nel vettore pET-21b/V5-His è stata copiata una breve sequenza nucleotidica all'estremità 3' del corrispondente ORF non includendo in tale sequenza lo stop codon TAG. L'eliminazione dello stop codon dalla sequenza consente la traduzione dell'epitopo V5-His presente sul plasmide.

La sequenza così ottenuta è stata complementata ed invertita:

ATTCAAGGTGCCAAACTTGAGACG.

Al primer *DmDIC1* Rev sono state aggiunte a partire dal suo 5' le tre "extrabasi" (CGA) seguite dalla sequenza riconosciuta dalla endonucleasi di restrizione Hind III (AAGCTT). La sequenza del primer *DmDIC* Rev è la seguente:

5'CGAAAGCTTATTCAAGGTGCCAAACTTGAGACG 3'

Allo stesso modo si è operato per la costruzione dei primer per *DmDIC2*, *DmDIC3* e *DmDIC4* con il seguente risultato:

DmDIC2 For 5' TAGCATATGTCGCTCAGAAGGGGTGG

DmDIC2 Rev 5'CGAAAGCTTGTTCATCGACATCATCATATCGATAAAATGC

DmDIC3 For 5' TAGCATATGGGAGAAGACAGTTTCGAGGC

DmDIC3 Rev 5'CGAAAGCTTCTTGTCAGGTGGCAGATATCCAA

DmDIC4 For 5' TAGCATATGCCGGTTTTTGATGACCACTT

DmDIC4 Rev 5'**CGAAAGCTT**ATTGTA**CTTCTCC**CTCCCAGGG

2.4 Elettroforesi su gel d'agarosio ^[71].

I prodotti amplificati con le reazioni di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%, che consente di separare i frammenti di DNA in base al loro peso molecolare.

Per la preparazione del gel e come tampone per la corsa elettroforetica è stata impiegata una soluzione 1X TAE buffer (40 mM Tris HCl/ 1 mM EDTA portato a pH 7,7 con acido acetico).

A questo tampone è stato aggiunto etidio bromuro alla concentrazione finale di 0,5µg/ml per evidenziare le molecole di DNA. L'etidio bromuro, infatti, si inserisce tra le coppie di basi del DNA rendendolo visibile, sotto l'azione della luce ultravioletta.

Sul gel di agarosio è stato caricato anche un marker (1 Kb Ladder) costituito da una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto in modo tale che, confrontando la loro corsa elettroforetica con quella dei frammenti prodotti mediante PCR, è possibile conoscere la grandezza di questi ultimi.

2.5 Purificazione dei frammenti di DNA.

Le bande di DNA visibili sul gel d'agarosio all'1%, utilizzando un transilluminatore UV, sono state tagliate e si è proceduto all'estrazione del DNA dal gel utilizzando il kit di estrazione GENE CLEAN. La banda contenente il DNA si solubilizza con NaI, aggiunto fino a totale copertura della banda. Si pone la miscela a 55°C per 10 minuti o, comunque, finchè la striscia di agarosio si sia completamente sciolta. A questo punto si aggiungono 5 µl di resina silicea in sospensione acquosa; la silice permetterà l'adsorbimento del DNA. Dopo aver tenuto la miscela in ghiaccio per 5 minuti, si centrifuga al massimo della velocità per 1 minuto. Si allontana il sovrantante e si procede ad una serie di lavaggi utilizzando la soluzione NEW WASH (un tampone a base di Tris-HCl/etanolo). Si ripete il lavaggio con NEW WASH per tre volte, dopo di che si ottiene un pellet, costituito dalla resina silicea e dal DNA adsorbito, che viene risospeso aggiungendo 40 µl di acqua sterile e passando al vortex. A questo punto si pone la miscela a 55°C per 5 minuti così da avere il

distacco del DNA dalla resina. Dopo aver centrifugato per 5 minuti a 12.000 rpm, si preleva il sovrantante, che conterrà il DNA da utilizzare, previa digestione enzimatica, per il clonaggio.

2.6 Digestione del frammento di DNA.

Per poter clonare il frammento di DNA è necessario inserirlo in un vettore, in questo caso un plasmide, e utilizzare il plasmide ricombinante ottenuto, per la trasformazione. Prima di poter fare questo, si deve effettuare la digestione sia dell'inserto che del plasmide utilizzando le stesse endonucleasi di restrizione. Per la digestione delle tre isoforme di *DmDIC* (*DmDIC2* nelle condizioni sperimentali da noi utilizzate non sembra essere presente) da clonare in pET-21b/V5-His sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione Nde I e Hind III, in un volume finale di 100 μ l.

Per le digestione del frammento sono stati aggiunti i seguenti volumi:

- ✓ 25 μ l di DNA (2 μ g)
- ✓ 10 μ l di buffer di digestione
- ✓ 65 μ l di acqua sterile
- ✓ 1 μ l di Nde I e 1 μ l di Hind III

Il buffer utilizzato per la digestione varia a seconda degli enzimi di restrizione. Dopo aver aggiunto i componenti della miscela di reazione si dà un colpo di vortex, si centrifuga e si mette in incubazione a 37°C per 1 ora in un bagno termostato in modo da fare avvenire la digestione.

2.7. Digestione del plasmide.

La digestione del plasmide da usare per il clonaggio avviene in maniera analoga alla digestione del frammento di DNA. L'unica differenza è che, dopo digestione, si effettua una reazione di defosforilazione con l'enzima fosfatasi alcalina per diminuire la probabilità che il plasmide possa rilegarsi su sé stesso impedendo, quindi, l'ingresso dell'inserto. Si aggiunge 1 μ l di fosfatasi alcalina e si pone a 37°C, in un bagno termostato, per 10 minuti al massimo.

2.8. Vettore di clonaggio per l'espressione delle proteine chimeriche *DmDIC1*/pET-21b/ V5-His, *DmDIC3*/pET-21b/ V5-His e *DmDIC4*/pET-21b/ V5-His.

La sequenze codificanti per i carrier mitocondriale di *Drosophila melanogaster* sono state clonata nel vettore plasmidico di espressione pET-21b/V5-His ^[14] in frame con l'epitopo V5 -His ed i costrutti risultanti sono stati usati per trasformare cellule di *E. Coli*. Il plasmide pET-21b/V5-His (Fig. 11) contiene: le sequenze riconosciute dalle endonucleasi di restrizione Nde I e Hind III nel sito multiplo di clonaggio (MCS) ed utilizzate per il clonaggio dei frammenti, il promotore della T7 polimerasi, l'operone del lattosio che è indotto dall' isopropil-β-D-tiogalattopiranoside (IPTG) e presenta inoltre il gene per la resistenza all'ampicillina, importante per la selezione in *E. Coli*. Inoltre il nostro vettore presenta una sequenza che codifica per l'epitopo V5 (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) legato al C-terminale che permette la rivelazione della proteina ricombinante mediante un anticorpo monoclonale anti-V5 e la sequenza codificante una coda di 6 istidine (His-tail) utile per la purificazione della proteina ricombinante tramite cromatografia di affini

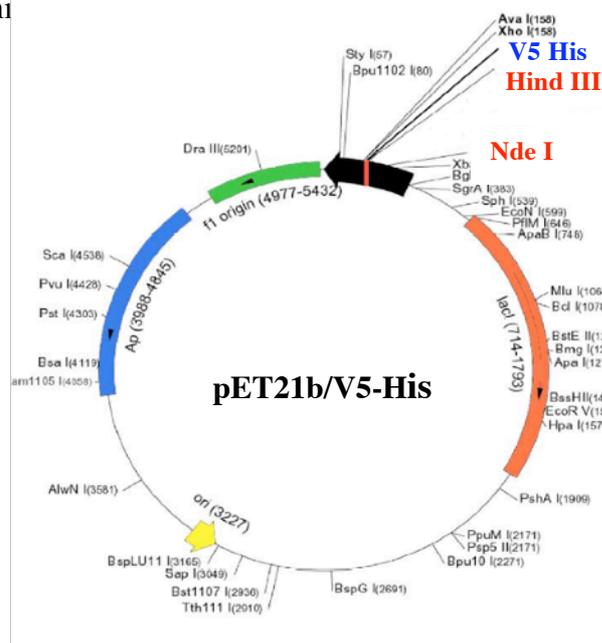


Fig.11. Vettore di espressione pET21b/V5-His. Il plasmide contiene:

- ✓ Un poli-linker (MCS evidenziato in nero) contenente al suo interno la sequenza che codifica per l'epitopo V5-His, in rosso sono evidenziati i siti Nde I e Hind III adoperati.
- ✓ il promotore della T7 polimerasi.
- ✓ l'operone del lattosio che è indotto dall' IPTG (arancione).
- ✓ il gene per la resistenza all'ampicillina (blu).
- ✓ l'origine della replicazione (giallo)
- ✓ origine della replicazione del fago F1 (verde).

2.9 Purificazione del DNA digerito.

Dopo aver digerito il DNA bisogna allontanare gli enzimi di restrizione e questo è realizzabile sia tramite elettroforesi su un gel d'agarosio e successiva estrazione dalla banda (par. 2.4), sia tramite il REMOVAL KIT. In quest'ultimo caso si aggiungono 10 volumi di buffer PN rispetto al volume di digestione, in modo tale da bloccare l'attività degli enzimi, e si miscela. Si versa nelle apposite colonnine del kit e si centrifuga a 6000 rpm per 2-3 minuti o, comunque, finché tutto il liquido sia passato nella provetta sottostante la colonnina. Si allontana l'eluato e si aggiungono 500 µl di buffer PE, che è un buffer di lavaggio, si centrifuga per 2-3 minuti a 6000 rpm e si allontana l'eluato. Quest'ultimo lavaggio si ripete per due volte. A questo punto si carica su colonna un opportuno volume di Buffer TE sterile (Tris 10 mM, EDTA 1mM; pH=8) e si centrifuga per 2 minuti, alla velocità massima consentita.

In questo modo si recupera il DNA, in soluzione acquosa, che verrà utilizzato per la reazione di ligazione.

2.10 Reazione di ligazione.

Dopo aver digerito plasmide ed inserto si può realizzare una reazione di ligazione, per ottenere il plasmide ricombinante da utilizzare per la trasformazione. Affinché la reazione avvenga nelle condizioni migliori possibili, il vettore e l'inserto devono essere presenti nella miscela di ligazione, rispettando determinati rapporti molecolari. In questo caso è stato rispettato un rapporto di 1: 3 a favore dell'inserto. Il volume finale della reazione di ligazione è di 10 µl a cui si arriva aggiungendo opportuni volumi di:

- ✓ DNA dell'inserto
- ✓ DNA plasmidico
- ✓ Buffer di ligazione 1 X
- ✓ H₂O (per arrivare a volume)
- ✓ Enzima T4 DNA ligasi.

Nella reazione di ligazione si effettuano anche i controlli del plasmide, rilegato e non rilegato, per valutare l'efficienza di taglio degli enzimi di restrizione utilizzati. Nel caso del

controllo del rilegato, nella miscela di reazione non si aggiunge il DNA dell'inserto; questo controllo serve per verificare se il plasmide si sia rilegato su sé stesso per la presenza di estremità coesive e se, quindi, uno dei due enzimi non abbia tagliato. Nel controllo del non rilegato non si aggiunge né il DNA dell'inserto, né l'enzima T4 ligasi; in questo modo si andrà a verificare se nessuno dei due enzimi di restrizione utilizzati ha tagliato.

L'enzima T4 ligasi viene diluito con acqua (diluizione 1:1) prima di essere utilizzato per la reazione. Dopo aver aggiunto tutti i componenti si lascia andare la reazione per 2-3 ore minimo a temperatura ambiente. Alla fine questa miscela di ligazione verrà utilizzata per la trasformazione delle cellule di *E. Coli*, TG1 rese in precedenza ad alta efficienza di trasformazione.

2.11 Preparazione di cellule di *E. Coli* ad alta efficienza di trasformazione.

La preparazione di cellule ad alta efficienza di trasformazione, permette sia di ottenere migliori risultati in termini di colonie che hanno ricevuto il plasmide ricombinante, sia di poter utilizzare le cellule anche dopo molto tempo (opportunamente conservate ad una temperatura di -80°C) qualora ve ne sia la necessità. Non tutti i ceppi di *E. Coli* possono essere trattati secondo questo metodo. Quelli utilizzati sono stati ceppi di *E. Coli* TG1. Un volume di 0,5 ml di cellule di *E. Coli*, provenienti da una coltura satura "over night", viene aggiunto a 50 ml di brodo di coltura; questo si incuba a 37°C , sotto costante agitazione, finché si raggiunge una densità ottica, stimata ad una lunghezza d'onda di 600 nm, compresa tra 0,5 e 0,6. Si centrifuga la sospensione (3500 rpm, 4°C , 10 minuti) e si allontana il sovrnatante. Il pellet viene risospeso con 30 ml di soluzione TFB 1 (RbCl 100 mM; MnCl_2 50 mM; CH_3COOK 30 mM; CaCl_2 10 mM; glicerolo 15 %; pH = 8, sterile per filtrazione) per ogni 100 ml di brodo di coltura e la sospensione cellulare è incubata a 4°C per 90 minuti. Si centrifuga (3500 rpm, 4°C , 10 minuti), si allontana il sovrnatante e il pellet viene risospeso con 4 ml di soluzione TFB 2 (MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl_2 75 mM; glicerolo 15 %; pH = 8, sterile) per ogni 100 ml di brodo di coltura iniziale. Le cellule rese competenti con questo metodo possono essere utilizzate subito, oppure conservate ad una temperatura di -80°C ed utilizzate in seguito.

2.12 Trasformazione di cellule di *E. Coli*.

Ad un volume di 100 μ l di cellule si aggiungono 10 μ l di miscela di ligazione e si tengono in incubazione a 4°C per 30 minuti. A questo punto, si aggiungono 100 μ l di brodo di coltura liquido (LB) e si incubano a 37°C per 30-40 minuti, agitando lievemente se si nota che le cellule si stanno depositando. Trascorso il periodo di incubazione si piastrano su terreni solidi contenenti ampicillina, in modo tale da selezionare solo le cellule che hanno assunto il plasmide e che, quindi, hanno acquisito la resistenza all'antibiotico. Le piastre vengono messe a 37°C per 12-16 ore.

BRODO LIQUIDO (LB): Triptone 10 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 5 g, pH = 7,4 (quantità per 1 Litro di LB).

TERRENI PER PIASTRE: LB addizionato di agar (1,5 %).

2.13 Estrazione “veloce” del DNA dai batteri.

Questo tipo di estrazione è detta “veloce” poiché permette, in breve tempo, di ottenere il DNA e verificare che il clonaggio abbia avuto successo. Si prelevano singole colonie dalla piastra di clonaggio e si seminano in diversi tubi batteriologici contenenti 3 ml di LB addizionati di ampicillina (100 μ g/ml) e si incubano a 37°C, sotto agitazione, per almeno 4 ore. Da queste colture si prelevano 1 mL e si centrifugano a 12.000 rpm per 2 minuti. La restante parte viene opportunamente conservata per essere messa a crescere ed effettuare, successivamente, l'estrazione tramite il QIA prep® Spin Miniprep KIT.

Dopo aver allontanato il sovrantante, il pellet viene risospeso aggiungendo 100 μ l di soluzione P1 (TRIS 50 mM pH = 7,5 con HCl; EDTA 10 mM; Rnasi 100 μ g/ml). Si aggiungono successivamente 100 μ l di soluzione P2 (NaOH 0,2 M; SDS 1%), miscelando finché la sospensione diventa limpida (ciò significa che si è avuta la lisi cellulare). Si aggiungono 100 μ l di soluzione P3 (CH₃COOK 3 M pH 4,6-4,8 con acido acetico glaciale), si agita e si osserva la formazione di una poltiglia bianca (costituita da vari componenti cellulari come fosfolipidi, proteine, etc.). Dopo aver centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti, si recupera il sovrantante, che contiene il DNA, e si aggiungono 250 μ l di

isopropanolo. Si miscela lievemente e si centrifuga a 12.000 rpm per 10 minuti, in modo tale che il DNA precipiti. Si allontana il sovrnatante e il DNA precipitato si riprende in 20 μ l di H₂O sterile. Il DNA ottenuto viene caricato su un gel d'agarosio all' 1 % per valutare la presenza di eventuali cloni positivi.

2.14 Estrazione del DNA dai batteri con il QIA prep[®] Spin MINIPREP KIT.

Dopo aver valutato la presenza di cloni positivi, dalle aliquote di coltura conservate si prelevano 10 μ l, si seminano in tubi batteriologici contenenti 10 ml di LB + ampicillina (100 μ g/ml) e si incubano a 37 °C "over night", sotto agitazione. Si centrifuga (3500 rpm, 4°C, 10 minuti) e si allontana il sovrnatante; il pellet ottenuto viene risospeso in 250 μ l di buffer P1 del kit di estrazione. Si aggiungono 250 μ l di buffer P2 e si miscela lievemente finché la sospensione diventa limpida perché le cellule sono state lisate. Si aggiungono 350 μ l di buffer N3 e, dopo aver agitato lievemente, si forma una poltiglia biancastra; si centrifuga a 12.000 rpm per 10 minuti. Si preleva il sovrnatante, si carica sull'apposita colonnina fornita nel kit e si centrifuga per 30-60 secondi a 12.000 rpm. L'eluato si butta e si lava la colonnina con 500 μ l di buffer PB, centrifugando nuovamente per 30-60 secondi. Si allontana l'eluato e si caricano 750 μ l di buffer PE (etanolo in miscela) centrifugando per 30 secondi a 12.000 rpm. Dopo che la colonnina è andata a secco si centrifuga per 1 minuto a 12.000 rpm. A questo punto si posiziona la colonnina su una provetta eppendorf pulita e sterile e si caricano 30 μ l di acqua sterile. Si aspetta 1 minuto e si centrifuga a 12.000 rpm per 1 minuto. Si caricano altri 30 μ l di acqua sterile e si ricentrifuga. Si ottiene così il DNA che servirà per la successiva trasformazione di ceppi di *E. Coli* adatti per l'over-espressione, previo sequenziamento per verificare l'assenza di mutazioni nella sequenza nucleotidica.

2.15 Preparazione delle cellule di *E. Coli* competenti in CaCl₂.

Per l'espressione delle proteine chimeriche *DmDIC1-3-4/V5-His* sono stati utilizzati ceppi di *E. Coli* BL21 λ (DE3). Le cellule di *E. Coli*, provenienti da una coltura satura "over-night", vengono aggiunte in quantità di 0,5 ml a 50 ml di terreno di coltura liquido LB ed

incubate a 37°C, sotto agitazione costante, fino a quando l'assorbanza, misurata a 600 nm, raggiunge valori compresi tra 0,5 e 0,6. A tal punto le cellule vengono raccolte per centrifugazione (3500 rpm; 4°C; 10 minuti). Dopo aver allontanato il sovrnatante, le cellule vengono risospese in 50 ml di una soluzione di CaCl₂, 50 mM, sterile. La sospensione è incubata a 4°C per 30 minuti e quindi centrifugata (3500 rpm; 4°C; 10 minuti). Dopo aver allontanato il sovrnatante, le cellule vengono nuovamente risospese in 2-3 ml di CaCl₂. Le cellule così ottenute possono essere utilizzate dopo almeno quattro ore di permanenza in ghiaccio.

2.16 Espressione delle proteine *DmDIC1-3-4/V5-His* in cellule di *E. Coli* BL21λ(DE3).

Per ottenere l'espressione delle proteine *DmDIC1-3-4/V5-His* sono state utilizzate cellule di *E. Coli* del ceppo BL21λ(DE3) (150 µl), rese competenti con CaCl₂ e trasformate con 2 µl dei plasmidi ricombinanti. I plasmidi pET21b/*DmDIC1-3-4/V5-His* (Fig. 26 cap.3) contiene il promotore della T7 RNA polimerasi la cui trascrizione può essere indotta mediante l'utilizzo dell'IPTG. Le cellule trasformate si piastrano su terreni solidi contenenti ampicillina (100 µg/ml) e si lasciano crescere "over night". Le colonie cresciute vengono prelevate tramite un'ansa, seminate in 400 ml di LB + ampicillina (100 µg/ml) e messe ad incubare a 37°C, sotto costante agitazione, finchè la densità ottica, letta ad una lunghezza d'onda di 600 nm, raggiunge un valore di 0,8-0,9. A questo punto si induce l'espressione aggiungendo IPTG ad una concentrazione finale 0,7 mM.

L'IPTG è un induttore sintetico analogo del lattosio che, però, non viene scisso dalla β-galattosidasi e che permette, legandosi al repressore e inattivandolo, di promuovere la trascrizione del gene che codifica per la T7 polimerasi consentendo la trascrizione dei geni dell'operone che stanno a valle del promotore. Dopo induzione la crescita viene continuata per altre 4 ore; a questo punto si centrifuga per 20 minuti a 7000 rpm a 4°C.

2.17 Estrazione dei corpi di inclusione mediante gradiente di Saccarosio.

Dopo aver centrifugato le cellule indotte (7.000 rpm, 20 minuti, 4°C), il pellet ottenuto si risospende in 20 ml di TRIS (10 mM, 4°C, pH = 7,5). Si sonica a freddo per 10 minuti a 70 watt con pulse di 3 secondi o, comunque, finchè la sospensione diventa limpida.

Si centrifuga a 13.000 rpm per 10 minuti e il pellet si risospende in 2 ml di Tris (10mM, 4°C, pH = 7,5). Si deve, inoltre, preparare il gradiente di saccarosio costituito da 3 soluzioni di saccarosio alle seguenti concentrazioni: 72% (5 ml), 53% (15 ml), 40% (15 ml). Stratificando le soluzioni di saccarosio, partendo dalla più concentrata alla più diluita, si ottiene un gradiente discontinuo di saccarosio. Si stratificano i 2 ml di pellet solubilizzato in Tris sul gradiente e si centrifuga (4,5 ore, 24.500 rpm, 4 °C) utilizzando un rotore a bracci oscillanti. I corpi di inclusione si fermeranno a livello dell'interfaccia tra le soluzioni di saccarosio al 72% e al 53 %; questi dovranno essere prelevati e aggiunti a 30 ml di una soluzione di tris 10mM, pH = 7,5a 4°C. Dopo aver agitato e centrifugato (17.000 rpm, 4°C, 20 minuti), il pellet ottenuto si risospende in un opportuno volume di Tris 10mM, pH = 7,5a 4°C (300, 500 o 1000 µl a seconda dei casi).

2.18 Delipidificazione e/o desalificazione delle proteine.

Per delipidificare e/o desalificare le proteine si aggiunge alle stesse metanolo e cloroformio nel rapporto di 4:4:1. Si centrifuga (12000 rpm, 10 minuti, temperatura ambiente), si aspira la fase superiore fino a 5 mm dall'ostia bianca, si aggiungono 300 µl di metanolo e, dopo aver rotto l'ostia passando al vortex , si ricentrifuga nuovamente (12000 rpm, 10 minuti, temperatura ambiente). Si allontana il sovrantante e si asciuga il pellet mediante l'uso della Speed-Vac. Il pellet viene risospeso in 30 µl di Sample Buffer e si carica il campione su un gel di poliacrilammide (par.2.18).

2.19 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS.

La purezza delle preparazioni di proteina è stata controllata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS, in accordo con la procedura di Laemmli^[72]. È stato usato un sistema di mini gel le cui dimensioni sono 8x10 cm e spessore di 1,5 mm. La soluzione per la preparazione del gel di separazione è costituita da:

- ✓ 4,93 ml di acrilammide/bisacrilammide (30% acrilammide e 0,8% bisacrilammide)
- ✓ 1,803 ml di Tris (Triidrossiamminometano) /HCl 1,876 M a pH8,8
- ✓ 1,803 ml di acqua
- ✓ 83,33 μ l di SDS al 10%
- ✓ 66 μ l di APS al 10%
- ✓ 7 μ l di TEMED

La soluzione per la preparazione del gel di concentrazione è costituita da:

- ✓ 500 μ l di acrilammide/bisacrilammide (30% acrilammide e 0,8% bisacrilammide)
- ✓ 300 μ l di Tris/HCl 1,876 M ha pH 6,8
- ✓ 2,16 ml di acqua
- ✓ 30 μ l di SDS al 10%
- ✓ 15 μ l di APS 10%
- ✓ 7 μ l di TEMED

I campioni proteici sono stati solubilizzati con un tampone contenente Tris/HCl (pH 6,8) 225 mM, SDS al 7% (w/v), glicerolo al 45% (v/v), β -mercaptoetanolo o 1,4-ditrioteritriolo 50 mM e blu di bromofenolo allo 0,01% a pH 6,8 (Sample Buffer).

Il tampone di corsa contiene Tris 25 mM, glicina 1,4%, SDS allo 0,1% pH 8,3.

La colorazione dei gel di poliacrilammide è stata effettuata con il metodo Blue di Comassie.

2.20 Colorazione con Comassie Brilliant Blue.

Il gel, dopo la corsa elettroforetica, è stato colorato per 15-30 minuti con una soluzione di Comassie Brilliant Blue R 250 0,25% in metanolo al 40% ed acido acetico al 10% per poi essere decolorati per circa un'ora in metanolo al 40% ed acido acetico al 10% (Destaining Solution).

2.21 Immunoblot su nitrocellulosa (Western-blot).

La tecnica del Western-blot permette di ottenere un'analisi più approfondita delle proteine separate su gel di poliacrilammide. Il protocollo da seguire consta di più fasi:

1. Elettrotrasferimento su nitrocellulosa.

Il gel, dopo migrazione, viene equilibrato per 10 minuti nel tampone di trasferimento (Tris 20 mM, Glicina 150 mM, SDS 0,5% e metanolo al 20%). Il metanolo facilita il trasferimento su nitrocellulosa, ma provoca contrazione del gel; è, quindi, necessario un pre-equilibrio, per evitare una distorsione delle bande durante il trasferimento. La qualità del trasferimento può essere verificata attraverso la colorazione del gel dopo l'elettrotrasferimento, oppure attraverso la colorazione reversibile della nitrocellulosa con il Rosso Ponceau.

2. Colorazione con il Rosso Ponceau.

La nitrocellulosa viene incubata per 10 minuti in una soluzione all'1% (p/v) di Rosso Ponceau in acido acetico al 5%. Le bande rosse scompaiono dopo un breve lavaggio con acqua distillata.

Dopo l'elettrotrasferimento delle proteine sulla nitrocellulosa a 250 mA per 1h in tampone di trasferimento, si procede all'immunorivelazione. La membrana è stata trattata per 1h con tampone costituito da Tris 50 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 allo 0,5% e contenente l'anticorpo antiV5-His diluito 1:100000. Dopo tre lavaggi con Tris 50 mM e NaCl 150 mM, la nitrocellulosa è stata incubata per 1 h con il secondo anticorpo (ImmunoPure, Goat Anti-Rabbit IgG, peroxidase conjugated, Pierce) diluito 1:2000.

Lo sviluppo del colore è stato ottenuto con 20 ml di Tris 50 mM pH 7,5, contenente 20 µl di H₂O₂ al 30% e 10-20 mg di tetracloruro di 3,3'-diamminobenzidina (DAB). Tutte le operazioni descritte sono state effettuate a temperatura ambiente.

2.22 Ricostituzione dei *DmDIC*: formazione dei proteoliposomi liposomi.

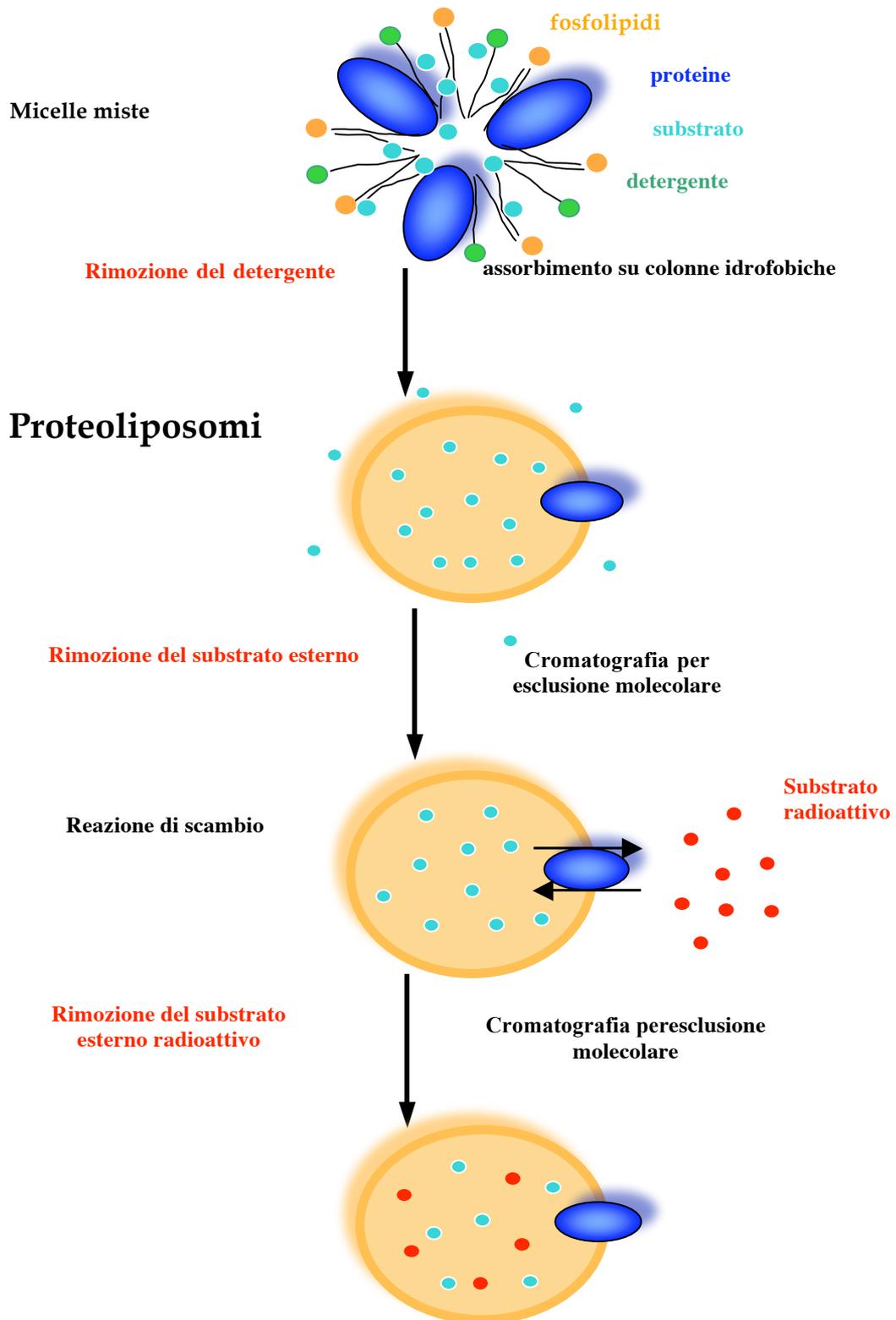
Un'aliquota di 20 µl di corpi di inclusione (I.B.) pari a circa 500 µg di proteina è stata diluita con 10 µl di Pipes/Hepes 5mM, 4°C a pH=7. Successivamente è stata solubilizzata con 10 µl di N-dodecanoilsarcosina (sarkosyl) al 10% p/v e tenuta a 0°C in ghiaccio 10 minuti. Questa soluzione è stata diluita mediante 4 aggiunte da 150 ml di buffer (Hepes 5 mM a pH=7). La soluzione è stata poi centrifugata a 4°C, a 12000 rpm per 10 minuti. Le

proteine solubilizzate in sarkosyl sono state ricostituite in liposomi in presenza del substrato a temperatura ambiente. La miscela di ricostituzione è composta da:

- ✓ 150 μ l di proteina solubilizzata (10 mg/ml).
- ✓ 90 μ l di Triton X-114 al 10%.
- ✓ 40 μ l DPG 20 mg/ml.
- ✓ 90 μ l di fosfolipidi al 10% sotto forma di liposomi sonicati.
- ✓ 70 μ l di Hepes 200 mM a pH=7.
- ✓ 70 μ l di substrato 200 mM a pH=7.
- ✓ Acqua fino ad un volume finale di 700 μ l.

La soluzione viene miscelata e sottoposta a 13 passaggi su colonne idrofobiche di amberlite (3,2 cm x 0,5 cm), che consentono l'allontanamento del detergente e favoriscono la formazione dei proteoliposomi. Il substrato esterno viene allontanato dai proteoliposomi attraverso il passaggio su una colonna per cromatografia di esclusione molecolare Sephadex G-75. Queste colonne vengono preequilibrate con un tampone contenente NaCl 50 mM e Hepes 10 mM. Lo stesso tampone viene utilizzato per l'eluizione. Dalle colonne si raccolgono circa 600 μ l di eluato più torbido, che è quello che contiene i proteoliposomi formati (Fig.12). Dalle colonne si raccolgono circa 600 μ l di eluato più torbido, che è quello che contiene i proteoliposomi formati. Su questi proteoliposomi il trasporto a 25°C viene iniziato con l'aggiunta di [¹⁴C]malato o ³³Pi nell'opportuna concentrazione e bloccati dopo vari ed opportuni intervalli di tempo aggiungendo piridossal 5-fosfato/Batofenantrolina (PLP/BATO) rispettivamente 40 mM e 15 mM, secondo il metodo dello stop-inhibitor^[73]. Generalmente ogni scambio è costituito da due prove e dal cosiddetto bianco, che funge da controllo, e nel quale l'inibitore viene aggiunto insieme al substrato marcato all'inizio dell'intervallo di tempo. Il substrato radioattivo esterno viene rimosso mediante una successiva cromatografia ad esclusione molecolare su colonne Pierce, riempita con la resina Sephadex G-75 e precedentemente equilibrate con un tampone contenente NaCl 50 mM. I proteoliposomi, eluiti col medesimo tampone, vengono raccolti nelle apposite vials, aggiunti 3 ml di miscela scintillante, agitati ed inseriti in uno scintillatore in fase liquida. La radioattività viene misurata in colpi per minuto (cpm). L'attività di trasporto viene poi calcolata sottraendo dai valori sperimentali dei campioni il valore del rispettivo controllo.

Fig.12 Formazione dei proteoliposomi e misurazione dell'attività di trasporto.



2.23 Preparazione dei liposomi ^[73].

Per la preparazione dei liposomi si solubilizza 1 g di fosfolipidi, parzialmente purificati dal tuorlo dell'uovo di pollo e contenenti il 60% di fosfatidilcolina, in 10 ml di acqua. La sospensione ottenuta viene sonicata con un sonicatore Branson 250 per 5 minuti a 40 watt a 0°C, ad intervalli di 1 secondo di sonicazione e 2 secondi di pausa. Attraverso la sonicazione si favorisce la formazione di vescicole sferiche monolamellari di fosfolipidi molto simili alle membrane biologiche. Infatti i liposomi sono costituiti da un bilayer fosfolipidico in cui le teste idrofile dei fosfolipidi sono a contatto con l'ambiente acquoso e le code idrofobiche interagiscono tra di loro. Le dimensioni sono variabili ed hanno, in media, un diametro di 50 nm.

2.24 Preparazione delle colonne di amberlite.

L'amberlite è una resina idrofobica che viene impaccata in piccole colonne cromatografiche di circa 0,5 cm di diametro e 3,2 cm di altezza. Prima di essere impaccata viene lavata per 4 volte con un volume di metanolo pari a 5 volte il suo volume e, in seguito, risciacquata con acqua fino a scomparsa di metanolo. L'amberlite deve essere conservata a 4°C.

2.25 Preparazione delle colonne di Sephadex G-75.

La resina Sephadex G-75 viene utilizzata nella cromatografia per gel filtrazione. Prima di venire impaccata nelle apposite colonne deve essere trattata. Si mette a bagnomaria, per circa un'ora, una soluzione di 1 g di resina in acqua, si fa raffreddare e si degassa. A questo punto si impacca la resina in colonne cromatografiche (0,7 cm di diametro per 15 cm di altezza), si lascia sedimentare e si lava con acqua. Le colonne così ottenute vengono utilizzate per separare per cromatografia le miscele di proteoliposomi ricostituiti.

2.26 Preparazione delle colonne Pierce.

Le colonne Pierce, utilizzate per rimuovere il substrato radioattivo esterno, sono state riempite con resina Sephadex G-75 preparata come descritto precedentemente (par. 2.11). L'eluizione del substrato è stata ottenuta utilizzando come tampone NaCl 50 mM.

2.27 Determinazione della radioattività entrata nei liposomi e calcolo dell'attività di trasporto.

La miscela scintillante è composta da sostanze in grado di trasformare le radiazioni del ^{14}C in fluorescenza, rilevata dai fotomoltiplicatori dello scintillatore che la esprime come "colpi per minuto" (cpm). I dati ottenuti sono così elaborati: ogni prova è effettuata in doppio; i cpm relativi ai campioni vengono mediati e dal valore ottenuto si sottrae quello dei campioni di riferimento (bianchi), per ottenere il valore del trasporto reale. Per risalire dalla radioattività letta alla quantità di nanomoli di substrato scambiato è stata calcolata l'attività specifica (A.S.) con la seguente formula:

$$\text{A.S.} = \frac{\text{cpm}}{\text{nanomoli di substrato radioattivo}}$$

Per questa ragione, di ogni soluzione di substrato marcato usato nel corso degli esperimenti, sono stati contati i cpm nelle stesse condizioni in cui si misura la radioattività delle singole prove.

Dalla conoscenza dell'attività specifica della soluzione di substrato radioattivo usato e dalla radioattività (cpm) di un determinato campione, si è risaliti alle nanomoli di substrato per grammo di proteina trasportato nel tempo d'incubazione, ossia all'attività di trasporto, attraverso la seguente formula:

$$\text{Attività} = \frac{\text{cpm}}{\text{A. S.} \times \text{gr}}$$

3. RISULTATI E DISCUSSIONI

Il trasporto di soluti a cavallo della membrana mitocondriale interna e' catalizzato da proteine intrinseche di membrana appartenenti alla famiglia dei *carrier* mitocondriali (MCF). Le proteine di questa famiglia di trasportatori sono caratterizzate dalla presenza di una struttura tripartita di sequenze ripetute ogni circa cento amminoacidi, all'interno di ogni dominio e' presente una sequenza consenso o firma (P-h-D/E-X-h-K/R-X-K/R-(20-30 aa)-D/E-G-(4 aa)-a-K/R-G) che designa una proteina come appartenente all' MCF [33]. Gli studi condotti utilizzando le sequenze proteiche dei *carrier* mitocondriali noti sui genomi di alcuni organismi superiori hanno messo in evidenza la presenza di numerosi geni codificanti per tali proteine, in particolare: 50 nell'uomo^[8], 58 nell'*Arabidopsis thaliana*^[29] e 35 nel lievito^[25]. Molti di questi *carrier* sono stati caratterizzati cinematicamente ed e' noto il ruolo fisiologico che rivestono all'interno della cellula. Per alcuni di questi non e' ancora noto ne' il trasporto che catalizzano, ne' il ruolo metabolico che rivestono nella cellula, numerosi sono i soluti in grado di attraversare la membrana mitocondriale interna ai quali non e' stato assegnato un trasportatore.

La *D. melanogaster* potrebbe rappresentare l'organismo dal quale partire per aumentare le conoscenze sui trasporti a cavallo della membrana mitocondriale interna; essa rappresenta uno dei più importanti organismi modello per la biologia. Inoltre, lo screening del suo genoma da noi condotto ha rilevato la presenza di 46 geni appartenenti alla famiglia dei *carrier* mitocondriali. L'analisi filogenetica da noi effettuata (Vedi par. 3.1) ha rilevato la presenza di una sottofamiglia proteica costituita da quattro proteine possibili ortologhe del *carrier* mitocondriale umano degli acidi dicarbossilici SLC25A10-hDIC (*hDIC*). Gli studi condotti in altri organismi sul *carrier* degli acidi dicarbossilici hanno evidenziato la capacita' della proteina di trasportare succinato e malato in scambio con fosfato, solfato e tiosolfato. Nell'uomo il *carrier* svolge un ruolo importante in diversi processi metabolici essenziali quali la gluconeogenesi, la sintesi dell'urea e il metabolismo dello zolfo soprattutto nel fegato. Nel lievito il *carrier* contribuisce nel rifornire di intermedi il ciclo di Krebs (funzione anaplerotica). Nelle piante il *carrier* degli acidi dicarbossilici si suppone sia implicato nella sintesi di amminoacidi e nel metabolismo degli acidi grassi, gluconeogenesi e sintesi degli isoprenoidi^[74]. Pertanto e' ben evidente come questa proteina svolga un ruolo essenziale in molte vie metaboliche. Lo studio di queste proteine in *D. melanogaster* risulta di notevole importanza per la comprensione del ruolo

metabolico che assume nell'insetto durante tutto l'arco della vita, soprattutto alla luce della presenza di quattro isoforme codificate dai geni CG8790, CG4323, CG11196 e CG18363. Inoltre vista la presenza nell'uomo di un solo trasportatore degli acidi dicarbossilici, tenendo presente le numerose funzioni che questa proteina deve svolgere in momenti metabolici differenti è plausibile ipotizzare, che le differenti funzioni metaboliche siano svolte da omologhi non ancora individuati. Lo studio della sottofamiglia da noi presa in considerazione potrebbe fornire informazioni utili a riguardo.

3.1 Identificazione di geni ortologi dell' SLC25A10-*hDIC* ed analisi filogenetica.

Il primo approccio per il nostro studio, e' stato quello di individuare i possibili geni che in *D. melanogaster* potessero codificare per proteine ortologhe dei *carrier* mitocondriali umani. La ricerca è stata effettuata utilizzando il programma blastp e la banca dati del National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponibile in rete all'indirizzo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Il programma blastp ricerca nei database di proteine tutte le sequenze omologhe a una sequenza proteica (query) fornita dall'utente. Nella nostra analisi sono state utilizzate come query tutte le sequenze proteiche umane codificanti per ipotetici *carrier* mitocondriali mentre la ricerca è stata ristretta alla sola analisi del genoma della *D. melanogaster*. Fra tutte le proteine individuate dal programma blastp sono state selezionate e annoverate come possibili *carrier* mitocondriali tutte le proteine che oltre a presentare una certa omologia contengono al loro interno la caratteristica sequenza consenso dei *carrier* mitocondriali.

Per ciascuna delle proteine da noi individuate è stato successivamente associato il gene che la codifica. L'analisi ha consentito in tal modo di individuare 46 geni codificanti per ipotetici *carrier* mitocondriali da questa classificazione sono stati esclusi i geni CG10920 e CG6851 poiché in essi è possibile individuare un solo motivo consenso non del tutto conservato. Per ciascuna dei geni da noi individuati come codificanti per possibili *carrier* mitocondriali, tramite consultazione della banca dati FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), sono state ricercate le informazioni circa l'esistenza di più trascritti generati da possibili splicing alternativi e le relative sequenze proteiche. La nostra indagine ha mostrato (Tabella V) che mediante varianti di splicing in *D. melanogaster* i geni CG8026, CG12201, CG18324, CG18340 e CG14208 producono 2 trascritti che

codificano per 2 proteine; i geni CG4241, CG4995 e CG16944 producono 3 trascritti che codificano per 2 proteine; i geni CG32103 e CG2139 producono 3 trascritti che codificano per 3 proteine. Il risultato finale di quest'indagine mostra che in *D. melanogaster* sono presenti 46 geni che codificano per un totale di 58 possibili proteine appartenenti alla Famiglia dei Carrier Mitocondriali.

Tabella V

GENE	TRASCRIPTI	PROTEINE
CG8026	CG8026-RA CG8026-RB	CG8026-PA CG8026-PB
CG12201	CG12201-RA CG12201-RB	CG12201-PA CG12201-PB
CG18324	CG18324-RA CG18324-RB	CG18324-PA CG18324-PB
CG18340	CG18340-RA CG18340-RB	CG18340-PA CG18340-PB
CG14208 (Tyler)	Tyler-RA Tyler-RB	Tyler-PA Tyler-PB
CG4995	CG4995-RA CG4995-RB CG4995-RC	CG4995-PA/PB CG4995-PC
CG4241 (att-ORFA)	att-ORFA-RA att-ORFA-RB att-ORFA-RC	att-ORFA-PA/PC att-ORFA-PB
CG16944 (sesB)	sesB-RA sesB-RB sesB-RC sesB-RD	sesB-PA/PB sesB-PC/PD
CG32103	CG32103-RA CG32103-RB CG32103-RC	CG32103-PA CG32103-PB CG32103-PC
CG2139	CG2139-RA CG2139-RB CG2139-RC CG2139-RD	CG2139-PA/PD CG2139-PB CG2139-PC

Tabella I. La tabella mostra i geni che codificano per più proteine. I trascritti sono indicati con il nome del gene seguito dalla lettera R (indicante il trascritto) e dalla lettera A,B,C,o D (indicante le varianti di splicing) mentre le proteine sono indicate con il nome del gene seguito dalla lettera P (indicante la proteina) e dalla lettera A,B,C,o D(indicante le varianti di splicing). La doppia desinenza, presente in alcune proteine, indica i trascritti che per variante di splicing codificano per quella stessa proteina.

L'analisi delle regioni genomiche ha messo in evidenza la presenza di geni bicistronici ovvero geni il cui mRNA codifica contemporaneamente per due differenti proteine. Questi geni inoltre, mediante splicing alternativi, danno origine a 2 trascritti bicistronici ed un trascritto singolo. Un esempio e' costituito dai geni CG14208 (Tyler) e CG 14209 (Shawn)

che coprono lo stesso locus genico (Fig. 13); in banca dati sono attribuiti al gene CG14208 (Tyler) i trascritti Tyler-RA e Tyler-RB mentre al gene CG 14209 (Shawn) sono attribuiti i trascritti Shawn-RA Shawn-RB e Shawn-RC. E' da notare che i trascritti Tyler-RA e Shawn-RC sono trascritti bicistronici in quanto hanno la stessa sequenza nucleotidica (3050 pb) e codificano contemporaneamente per le proteine Tyler-PA di 335 amminoacidi (sequenza codificante dal nucleotide 232 al nucleotide 1239) e Shawn-PC di 387 amminoacidi (sequenza codificante dal nucleotide 1689 al nucleotide 2852). Anche i trascritti Tyler-RB e Shawn-RB di 2961 pb sono bicistronici e codificano per le proteine Tyler-PB di 441 (sequenza codificante dal nucleotide 232 al nucleotide 1557) e Shawn-PB di 387 (sequenza codificante dal nucleotide 1600 al nucleotide 2763). Il trascritto Shawn-RD di 1600 pb (sequenza codificante dal nucleotide 239 al nucleotide 1402) codifica per la sola proteina Shawn-PD di 387 residui amminoacidici. E' da notare che le proteine Tyler-PA e Tyler-PB sono diverse mentre le tre proteine Shawn-PB, Shawn-PC e Shawn-PD sono di fatto la stessa proteina (Fig. 13).

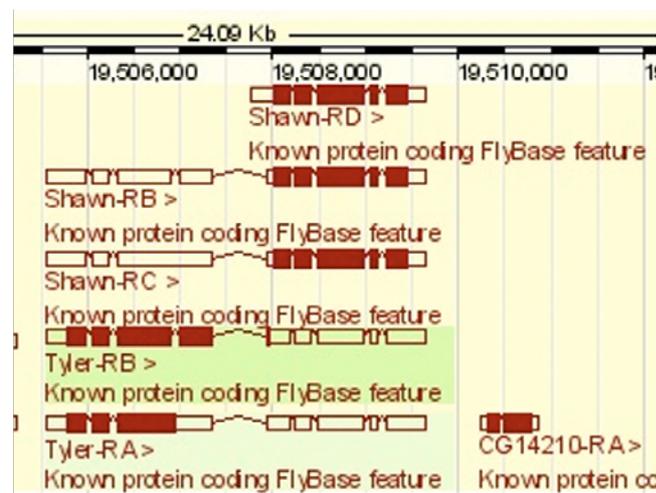


Fig. 13. In figura sono mostrati i trascritti e prodotti genici dei geni CG14208 (Tyler) e CG14209 (Shawn). I rettangoli rappresentano gli esoni mentre le linee sottili rappresentano gli introni. I rettangoli pieni rappresentano le regioni codificanti dei trascritti mentre quelli vuoti le regioni non tradotte.

La figura è disponibile all'indirizzo

http://www.ensembl.org/Drosophila_melanogaster/Gene/Summary?g=FBgn0031038

Mediante l'utilizzo del programma ClustalW contenuto nel pacchetto software MacVector, le sole sequenze proteiche dei *carrier* mitocondriali umani a funzione nota e le sequenze dei *carrier* della *D. melanogaster* sono state sottoposte ad allineamento multiplo ed utilizzate per la successiva costruzione dell'albero filogenetico (Fig. 14).

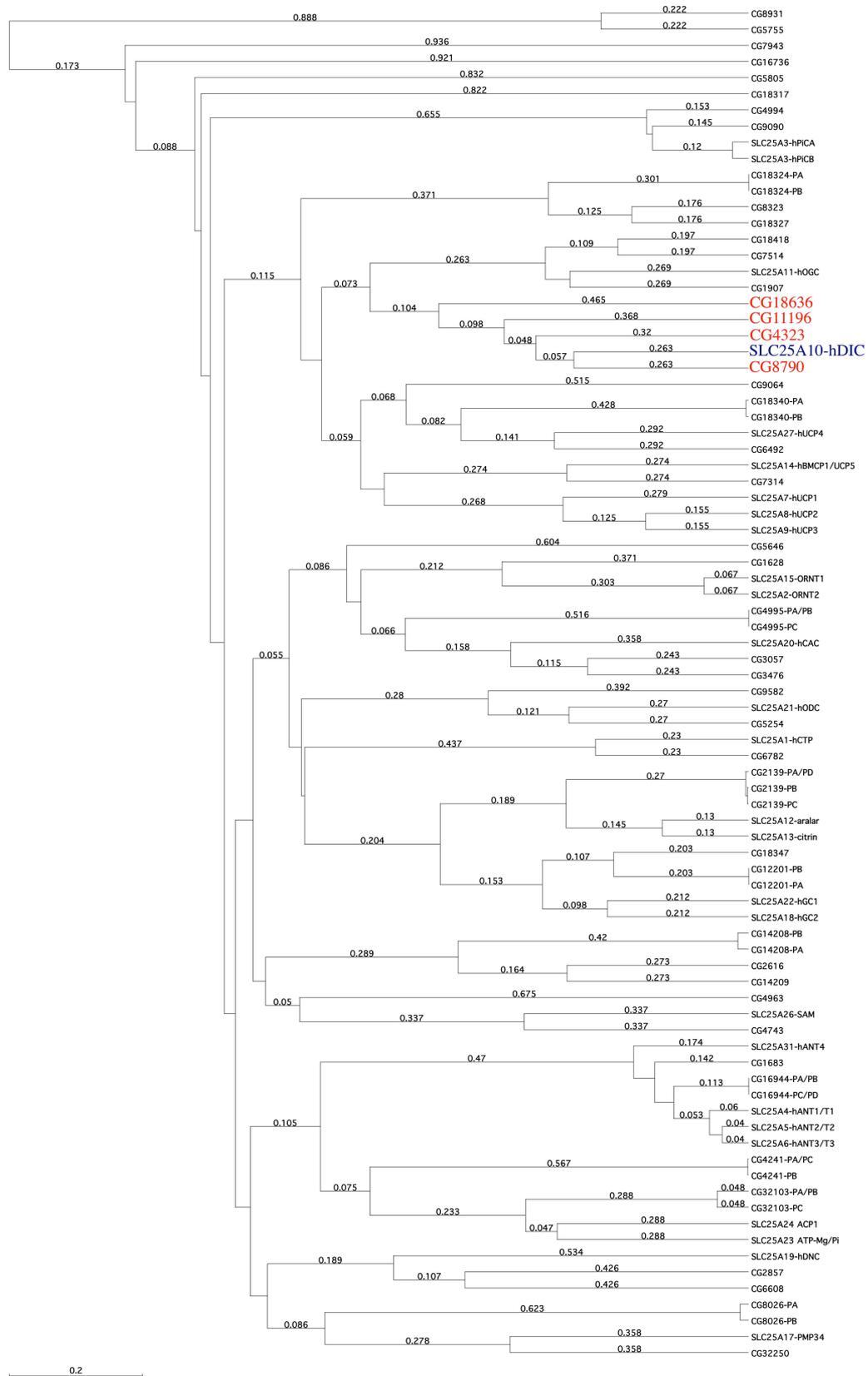


Fig.14 Albero filogenetico.

Albero filogenetico costruito con i geni SLC25 a funzione nota e i putativi geni di *D. melanogaster* codificanti per carrier mitocondriali. In blu è evidenziato il trasportatore degli acidi dicarbossilici umano (*hDIC*). In rosso è evidenziata la sottofamiglia dei trasportatori degli acidi dicarbossilici di *D. melanogaster*.

L'albero filogenetico evidenzia l'esistenza di numerose sottofamiglie proteiche. La presenza all'interno delle sottofamiglie di proteine a funzione nota, ci fa ipotizzare che quel gruppo di proteine trasportino gli stessi soluti o soluti con struttura chimica analoga. In questo lavoro di tesi, tra le numerose sottofamiglie presenti, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su quelle sequenze proteiche, che l'analisi filogenetica ha correlato con il *carrier* umano dei dicarbossilici (*hDIC*). In base alla percentuale d'omologia e alle relazioni distanza/vicinanza dell'albero filogenetico (Fig. 14) con *hDIC*, le sequenze proteiche codificate dai geni CG8790, CG4323, CG11196 e CG18363 sono state chiamate: *DmDIC1*, *DmDIC2*, *DmDIC3* e *DmDIC4* (Tabella VI par. 3.2) .

3.2 Analisi dei geni e dei prodotti genici della sottofamiglia del *carrier* mitocondriale degli acidi dicarbossilici

Le quattro sequenze di *Drosophila melanogaster* che l'analisi filogenetica ha individuato come corrispondenti alla sottofamiglia del *carrier* degli acidi dicarbossilici umano, sono state sottoposte ad una analisi accurata dei geni e dei prodotti genici.

Il gene CG8790 (Fig. 15) codificante per *DmDIC1* e' localizzato sul braccio destro del cromosoma 3 e copre una regione di circa 4 Kb. Esso trascrive per 2 mRNA, indicati con le sigle CG8790-RA e CG8790-RB, ottenuti per splicing alternativo della regione non tradotta al 5', rispettivamente della lunghezza di 1397 e 1556 bp. Entrambi i trascritti codificano per la stessa proteina di 281 aa.

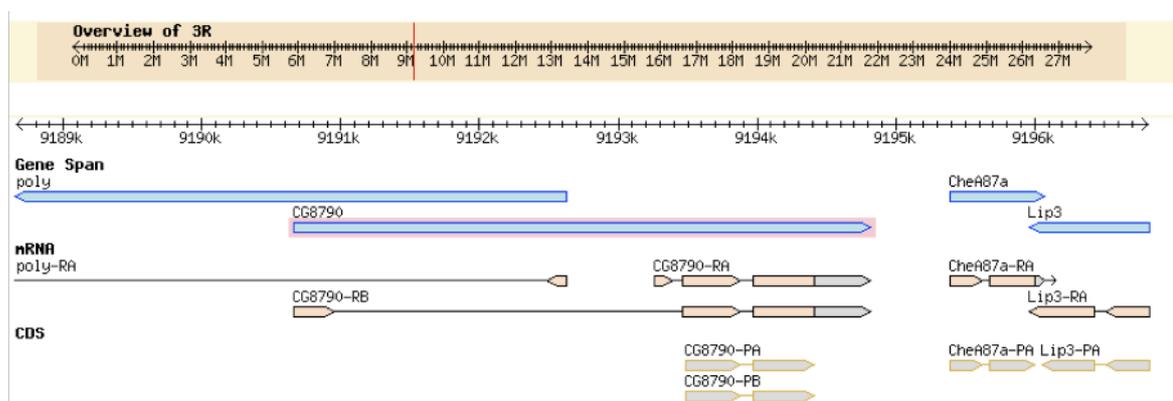


Fig. 15. Struttura del gene e dei prodotti genici di CG8790.

Le linee spesse dei segmenti CG8790-RA e CG8790-RB rappresentano gli mRNA ottenuti per splicing alternativo del gene CG8790 (segmento evidenziato in viola). Le linee spesse dei segmenti CG8790-PA e CG8790-PB rappresentano le sequenze codificanti (CDS) per le proteine. Come si può osservare dalla figura entrambi gli mRNA hanno le stesse CDS e codificano per la stessa proteina (*DmDIC1*).

Il gene CG4323 (Fig. 16), codificante per *DmDIC2* e' localizzato sul braccio destro del cromosoma 3 e copre una regione di circa 1,8 Kb. Esso trascrive per 2 mRNA, indicati con le sigle CG4323-RA e CG4323-RB, ottenuti per splicing alternativo della regione non tradotta al 5', rispettivamente della lunghezza di 1460 e 1393 bp. Entrambi i trascritti codificano per la stessa proteina di 305 aa.

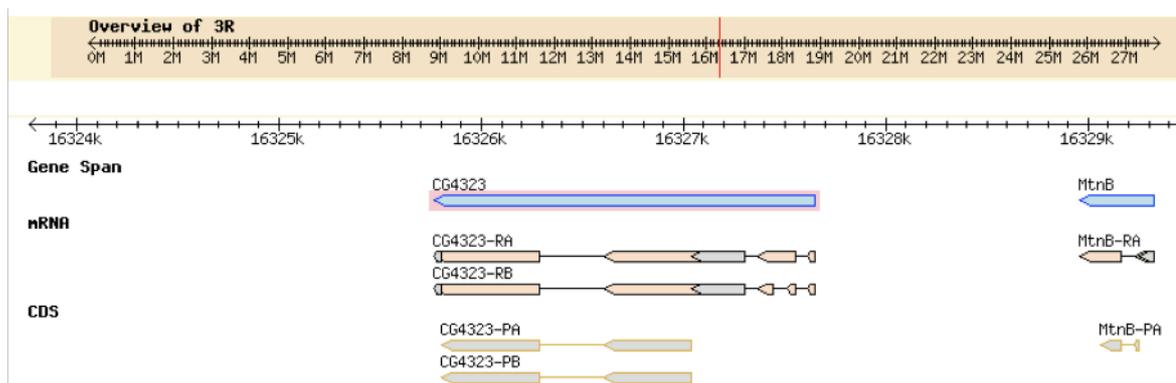


Fig. 16. Struttura del gene e dei prodotti genici di CG4323 codificante per *DmDIC2*.

Le linee spesse dei segmenti CG4323-RA e CG4323-RB rappresentano gli mRNA ottenuti per splicing alternativo del gene CG4323 (segmento evidenziato in viola). Le linee spesse dei segmenti CG4323-PA e CG4323-PB rappresentano le sequenze codificanti (CDS) per le proteine. Come si può osservare dalla figura entrambi gli mRNA hanno le stesse CDS e codificano quindi per la stessa proteina (*DmDIC2*).

Il gene CG11196 (Fig. 17), codificante per la proteina *DmDIC3* e' localizzato sul braccio destro del cromosoma 2 e copre una regione di circa 1,2 Kb. Il gene trascrive per un mRNA, indicato con la sigla CG11196-RA, della lunghezza di 1009 bp. Il trascritto codifica per una proteina di 288 aa.

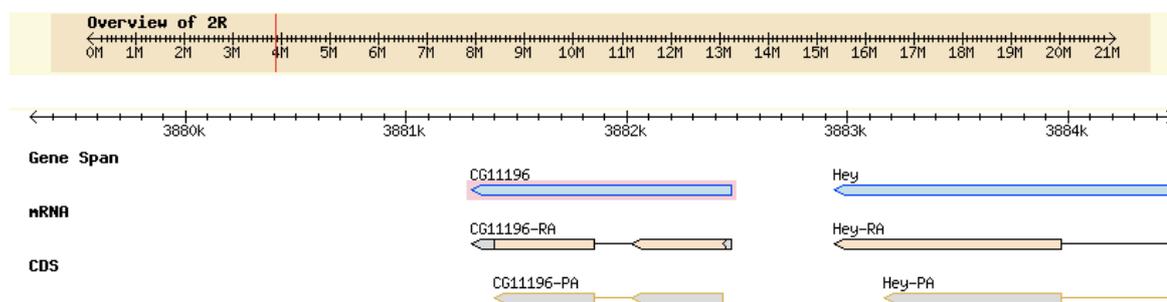


Fig. 17. Struttura del gene e dei prodotti genici di CG11196 codificante per *DmDIC3*.

La linea spessa del segmento CG11196-RA rappresenta l' mRNA del gene CG11196 (segmento evidenziato in viola). La linea spessa del segmento CG11196-PA rappresenta la sequenze codificante (CDS) per le proteine *DmDIC3*.

Il gene CG18363 (Fig. 18) codificante per la proteina *DmDIC4* e' localizzato sul braccio sinistro del cromosoma 3 e copre una regione di circa 1,4 Kb. Il gene trascrive per un mRNA indicato con la sigla CG18363-RA, della lunghezza di 1146 bp. Il trascritto codifica per una proteina di 303 aa.

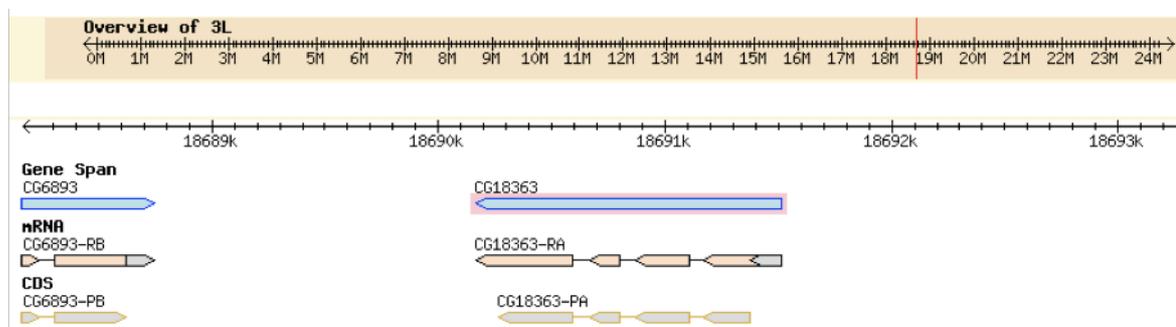


Fig. 18. Struttura del gene e dei prodotti genici di CG11196 codificante per *DmDIC3*.

La linea spessa del segmento CG18363-RA rappresenta l' mRNA del gene CG18363 (segmento evidenziato in viola). La linea spessa del segmento CG18363-PA rappresenta la sequenze codificanti (CDS) per le proteine *DmDIC3*.

In Tabella VI sono state riportate le informazioni relative al cromosoma, lunghezza del gene, degli esoni ed introni, dell'mRNA, delle regioni codificanti (CDS) e del peso molecolare espresso in Dalton delle quattro isoforme dei trasportatori degli acidi dicarbossilici in *D. melanogaster*.

Tabella VI: Caratteristiche principali delle quattro isoforme di DIC in *Drosophila melanogaster*

Gene <i>D.melanogaster</i>	Cromosoma	Gene (bp)	Esoni(bp) 5' → 3'	Introni (bp) 5' → 3'	mRNA (bp)	CDS (bp)	Proteina aa, (Dalton)
CG8790 (<i>DmDIC1</i>)	3R	4154	RA: 131 423 843 RB: 290 423 843	RA: 70 90 RB: 2509 90	RA:1397 RB:1556	PA: 843 PB: 843	PA:281aa PB:281aa (30700)
CG4323 (<i>DmDIC2</i>)	3R	1884	RA: 41 194 699 526 RB: 41 44 83 699	RA: 53 55 317 RB: 53 67 55	RA:1460 RB:1393	PA: 915 PB: 915	PA:305aa PB:305aa (33600)
CG11196 (<i>DmDIC3</i>)	2R	1178	RA: 454 555	170	RA:1009	PA:864	PA:288aa (31285)
CG18363 (<i>DmDIC4</i>)	3L	1345	RA: 343 244 133 426	61 64 74	RA:1146	PA:909	PA:303aa (34000)

3.3 Analisi delle sequenze proteiche correlate all' *hDIC* in *D. melanogaster*.

L'allineamento delle sequenze proteiche, effettuato con l'ausilio del software clustalW, di ognuna delle quattro proteine di *Drosophila melanogaster* (*DmDIC1*, *DmDIC2*, *DmDIC3* e *DmDIC4*) con *hDIC*, ha mostrato che tali proteine conservano una omologia con il *carrier* umano degli acidi dicarbossilici molto elevata.

In particolare, l'allineamento dei 280 amminoacidi della sequenza proteica di *DmDIC1*, con la sequenza di *hDIC* ha mostrato la presenza di 165 identici, pari al 57% di omologia. L'allineamento ha inoltre mostrato la presenza di 40 amminoacidi aventi caratteristiche chimico fisiche simili, pari al 13% di similarita' (Fig. 19).

Fig. 19. *hDIC* vs. *DmDIC1*

Identita' = 165 (57%) Similarita' = 40 (13%)

```

hDIC   1 MAAEARVSRWYFGGLASCGAACCTHPLDLLKVHLOTQOQEVKLRMTGMALRVVRTDGILAL   60
DmDIC  1 MPHQERKSMWFFGGLASVGAAMVTHPLDLIKVTLQTOQG-HLSVAQLIPKLAREQGVLVF   59
      * . * * * .***** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
hDIC   61 YSGLSASLCROMTYSLTRFAIYETVRDRVAKGSQGPLPFHEKVLLGSVSGLAGGFVGTGA   120
DmDIC  60 YNGLSASVLRQLTYSTARFGVYEAGKKYVNTDS-----FGGKVALAGASGLVGGIVGTPA  114
      * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * * ** ** ** ** ** **
hDIC   121 DLVNVRM QNDVKLPQGQRRNYAHALDGLYRVAREEGLRRLFSGATMASSRGALVTVGQLS   180
DmDIC  115 DMVNVRM QNDVKLPPQRRNYNNAFDGLVRVYRQEGFKRLFSGATAATARGILMTIGQIA  174
      * .***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * * ** **
hDIC   181 CYDQAKQLVLSTGYLSDNIFTHFVASF IAGGCATFLCQPLDVLKTRLMNSK-GEYQGVFH  239
DmDIC  175 FYDQTKIYLLATPYFQDNLVTHFTASLVAGTIATTLTQPLDVLKTRSMNAKPGEFNGLWD  234
      *** * . * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
hDIC   240 CAVETAKLGPLAFYKGLVPAGIRLIPHTVLTFFVFLEQLRKNFGIKVPS   287
DmDIC  235 IVKHTAKLGPLGFFKGYVPAFVRLGPHTIITFFVFLEQLRLKFGTLN--  280
      ***** * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig.19. Allineamento della sequenza *DmDIC1* con *hDIC*.

Gli asterischi evidenziano gli amminoacidi identici mentre i punti neri gli amminoacidi aventi caratteristiche chimico fisiche analoghe.

L'allineamento dei 304 amminoacidi della sequenza proteica di *DmDIC2*, con la sequenza di *hDIC*, ha mostrato la presenza di 142 amminoacidi identici, pari al 46% di omologia. L'allineamento ha inoltre mostrato la presenza di 55 amminoacidi aventi caratteristiche chimico fisiche simili, pari al 18% di similarita' (Fig. 20).

Fig.20. *hDIC* vs. *DmDIC2*

```

Identita' = 142 (46%)   Similarita' = 55 (18%)
hDIC   1  -----MAAEAR-VSRWYFGGLASCGAACCTHPLDLLKVHLQTOQEVKLRMTGMALRV  51
DmDIC  1  MSLRRGGLMSYNQRRIRARWYFGGLASSMAAMVTHPIDLIKVLIQTOAE-KLSVFTTRKI  59
      * . * ..*****. ** ***.***.***.*** * * * . . .
hDIC   52 VRTDGILALYSGLSASLCRQMTYSLTRFAIYETVRDRVAKGSQGPLPFHEKVLLGSVSGL  111
DmDIC  60 VKEQGPLAMYNGISASMLRQYTYTLARFGIYSVSGAMDTST-----MAGKTCLAAIAGG  114
      * . * **.* *.***. ** **.* ** * . . * * ...*
hDIC   112 AGGFVGTADLVNVRMNDVKLPQGQRRNYAHALDGLYRVAREEGLRRLFSGATMASSRG  171
DmDIC  115 IGGFVGAPADLINVRLQNDVKLPPEKRRNYKHAIDGLVRITREEGWKNLFGSSMIALRG  174
      *****.***.***.***** .**** **.* ** *..*** . ** *..* **
hDIC   172 ALVTVGQLSCYDQAKQLVSTGYLSDNIFTHFVASFIAGGCATFLCQPLDVLKTRLMNSK  231
DmDIC  175 AFMTVQGQIAFYEQSKSQMIKLG-MPDYMGTYILASMISSVVATTLTQPIDVVKTRRMNAA  233
      * .****. . *.* * .. * . * . * .** * . ** *..***.*** ** .
hDIC   232 -GEYQGVFHCAVETAKLGPLAFYKGLVPAGIRLIPHTVLTFFVLEQLRKNFGIKVPS---  287
DmDIC  234 PGEYSGLDGVFVKTSKEGPLAFFKGYVPSLSRLLPHTVLLFLGLEYLRTHFGLPEPKQT  293
      *** * . * * * *****.***. **.* **.* * . ** * * . **
hDIC   288 ----- 287
DmDIC  294 GAFYRYDDVDD 304

```

Fig. 20. Allineamento della sequenza *DmDIC2* con *hDIC*.

Gli asterischi evidenziano gli amminoacidi identici mentre i punti neri gli amminoacidi simili.

L'allineamento dei 287 amminoacidi della sequenza proteica di *DmDIC3* con la sequenza di *hDIC* ha mostrato la presenza di 130 residui amminoacidici identici, pari al 45% di omologia. L'allineamento ha inoltre mostrato la presenza di 60 amminoacidi aventi caratteristiche chimico fisiche simili, pari al 20% di similarita' (Fig. 21).

Fig.21. *hDIC* vs. *DmDIC3*

```

Identita' = 130 (45%)   Similarita' = 60 (20%)
hDIC   1  -MAAEAR-VSRWYFGGLASCGAACCTHPLDLLKVHLQTOQEVKLRMTGMALRVVRTD-GI  57
DmDIC  1  MGEDSSRRLPRWFFGGVCAAIAVTGTHPIDLIKVQLQTOQSDRKTVEILKGIHERSGI  60
      * . * ** ***.***. * .***.***.***.***. . . * * . . **
hDIC   58 LALYSGLSASLCRQMTYSLTRFAIYETVRDRVAKGSQGPLPFHEKVLLGSVSGLAGGFV  117
DmDIC  61 LGFYNGISASWFRQLTYTTTRFALYEAGKDYVDTQK-----VSSKMALATFAGIVGGIV  115
      * * *.* **.* **.* **.* **.* * * . . * . * . ** **
hDIC   118 TPADLVNVRMNDVKLPQGQRRNYAHALDGLYRVAREEGLRRLFSGATMASSRGALVTVG  177
DmDIC  116 VPGDVVTVRLQNDVKLPPEKRRNYKHVFDGLFRIYKEEGVSSLFRTVPAVSRAVLLTIG  175
      * *.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **
hDIC   178 QLSCYDQAKQLVSTGYLSDNIFTHFVASFIAGGCATFLCQPLDVLKTRLMNSK-GEYQG  236
DmDIC  176 TNAAYDQVKQMLKIATGAGEGVPLHFATSTIAGCIAVVITQPLDVIKTTFMNAQPGEFSG  235
      ..*** **.. . . . . ** . * ** * * ..*****.*** **.. ** . *
hDIC   237 VFHCAVETAKLGPLAFYKGLVPAGIRLIPHTVLTFFVLEQLRKNFGIKVPS-  287
DmDIC  236 IGGAFLLSTAKQGPLAFYKGFIPALIRVSPNTIITFVLYEQARMRFGLPPDK  287
      . . . *** ***** .** ** . *..*** ** * * *

```

Fig. 21. Allineamento della sequenza *DmDIC3* con *hDIC*.

Gli asterischi evidenziano gli amminoacidi identici mentre i punti neri gli amminoacidi simili.

L'allineamento dei 302 amminoacidi della sequenza di *DmDIC3* con la sequenza di *hDIC* ha mostrato la presenza di 107 amminoacidi identici, pari al 35% di omologia. L'allineamento ha inoltre mostrato la presenza di 67 amminoacidi aventi caratteristiche chimico fisiche simili, pari al 22% di similarita' (Fig. 22).

Fig.22. *hDIC* vs. *DmDIC4*

Identities = 107 (35%) Similarities = 67 (22%)

```

hDIC      1 -----MAAEAR-VSRWYFGGLASCGAACCTHPLDLLKVHLOTQOEVKLRMTGM 47
DmDIC     1 MPVFDDHFLGDCHDEPEGLLPRWVFGGFASMCVAFVAVAPIDIVKTHMQIQRO-KRSILGT 59
          . ** *** ** * . * . * . * . * . * . * . *
hDIC     48 ALRVVRTDGILALYSGLSASLCROMTYSLTRFAIYETVR--DRVAKSGOGLPFHEKVLL 105
DmDIC     60 VKRIHSLKGYLGFYDGFSAAILRQMTSTNIHFIVYDTGKKMEYVDRDS-----YLGKIIIL 114
          * . * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
hDIC     106 GSVSGLAGGFVGTADLVNVRMNDVKLPQOQRRNYAHALDGLYRVAREEGLRRLFSGAT 165
DmDIC     115 GCVAGACGSAGFIPTDLINVRMQTDMKEPPYKRRNYKHVFDGLIRIPKEEGWKALYKGG 174
          * . * . * . * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
hDIC     166 MASSRGALVTVGQLSCYDQAKQLVLSTGYLSDNIFTHFVASFIAGGCATFLCQPLDVLKT 225
DmDIC     175 VAVFKSSLSTCSQIAFYDIKTEVRKNISVNDGLPLHFLTSLGTSIISSAITHPLDVVRT 234
          * . * * * * . * . * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . *
hDIC     226 RLMNSK-GEYQGVFHCAVETAKLGPLAFYKGLVPAGIRLIPHTVLTFFVLEQLRKNFGIK 284
DmDIC     235 IMMNSRPGEFRTVFQASVHMMRFVGMGPYRGFVPTIVRKAPATLLFVLYEQLRLHFGIC 294
          . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
hDIC     285 VPS----- 287
DmDIC     295 SLGGEKYN 302
    
```

Fig. 22. Allineamento delle sequenze *DmDIC4* con *hDIC*.
 Gli asterischi evidenziano gli amminoacidi identici mentre i punti neri gli amminoacidi simili.

In Tabella VII sono riportate le percentuali di omologia che ognuna delle quattro isoforme di *DmDIC* possiedono con *hDIC* (in rosso) e con le altre sequenze.

Tabella VII
 Relazioni di omologia esistenti fra le sequenze proteiche delle quattro isoforme di *DmDIC* e *hDIC*.

	<i>hDIC</i>	<i>DmDIC1</i>	<i>DmDIC2</i>	<i>DmDIC3</i>	<i>DmDIC4</i>
<i>hDIC</i>	100.0	57.3	45.7	44.5	34.7
<i>DmDIC1</i>		100.0	50.2	50.2	37.4
<i>DmDIC2</i>			100.0	43.0	36.3
<i>DmDIC3</i>				100.0	38.5
<i>DmDIC4</i>					100.0
% di identita' amminoacidica					

Una omologia di sequenza così elevata delle quattro proteine di *D.melanogaster* con *hDIC* è un importante indice della possibile ortologia fra i due gruppi di proteine. Dall'analisi delle sequenze proteiche, emerge inoltre, l'appartenenza di tali proteine alla famiglia dei *carrier* mitocondriali (MCF). In esse sono presenti i caratteristici motivi altamente conservati P-h-D/XhK/R(20-30aa)-D/E-G(4aa)-a-K/R-G ripetuti per tre volte ogni circa 100 amminoacidi, presenti in tutte le sequenze amminoacidiche dei *carrier* appartenenti a questa famiglia (*Introduzione par.1.2*) e l'analisi del profilo idropatico (Fig. 23) mostra la presenza delle 6 regioni idrofobiche caratteristica dei *carrier* mitocondriali.

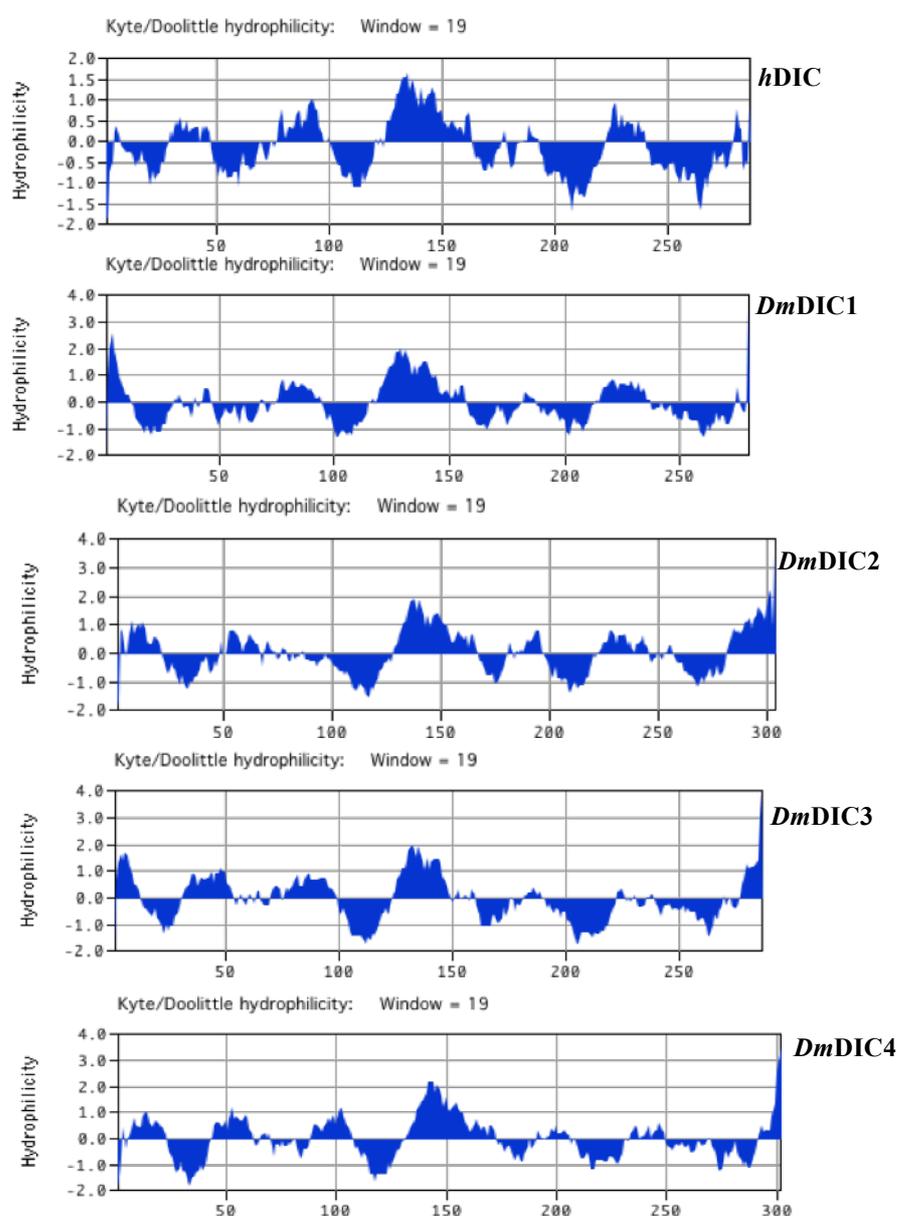


Fig. 23. Profilo idropatico secondo Kyte Doolittle delle 4 isoforme *DmDIC* e dell' *hDIC*.

3.4 Analisi dei trascritti mediante Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR).

L'RT-PCR è una tecnica che consente l'analisi semiquantitativa dei livelli di espressione di un gene in un tessuto o in un particolare stadio di sviluppo di un organismo. Gli RNA totali estratti dalla *D. melanogaster* negli stadi di embrione, larva, pupa e adulto sono stati sottoposti a retrotrascrizione (*Materiali e Metodi par. 2.1-2.2*). La scelta dei primer da utilizzare per l'amplificazione dei segmenti degli relativi alle varie isoforme della sottofamiglia *DmDIC* nella RT-PCR è stata effettuata utilizzando il programma informatico Primer Express (Applied Biosistem). I primer sono stati scelti in regioni esoniche a cavallo di regioni introniche in modo da minimizzare le possibili interferenze del DNA genomico (*Materiali e Metodi par. 2.3*). I sei trascritti indicati in banca dati con le sigle CG8790-RA, CG8790-RB, CG4323-RA, CG4323-RB, CG11196-RA e CG18363-RA saranno da ora indicati, per una migliore comprensione, rispettivamente con le sigle *DmDIC1RA*, *DmDIC1RB*, *DmDIC2RA*, *DmDIC2RB*, *DmDIC3RA* e *DmDIC4RA*. L'analisi dei retrotrascritti ha mostrato che *DmDIC1RA* è espresso in embrione, larva e pupa, mentre, la seconda isoforma *DmDIC1RB* è espressa in modo ubiquitario, anche se in maggiore quantità negli stadi embrionale e larva (Fig. 24). L'isoforma *DmDIC2RA* e *DmDIC2RB* nelle condizioni sperimentali da noi adottate non mostrano nessun livello di espressione. Le isoforme *DmDIC3RA* e *DmDIC4RA* sono espresse soltanto nello stadio di pupa (Fig. 24).

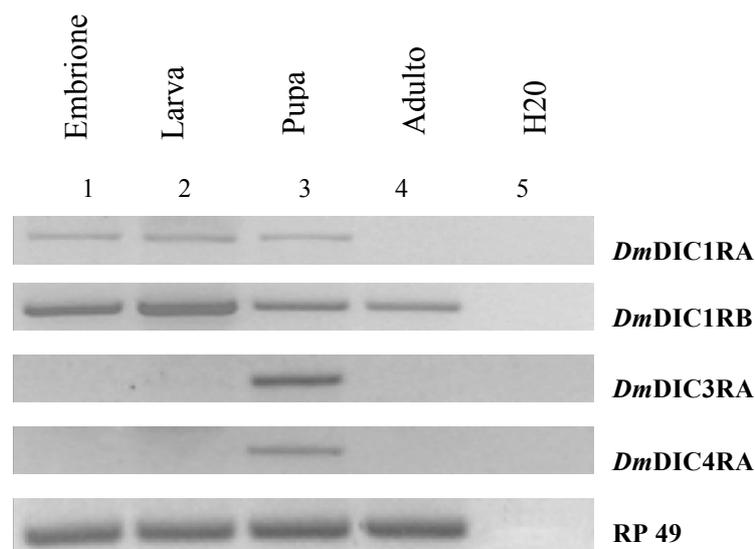


Fig. 24. Analisi dei livelli di espressione delle 4 isoforme di *DmDIC* in differenti stadi del ciclo vitale.

La figura dimostra i livelli di espressione delle varie isoforme nei veri stadi del ciclo vitale delle *D.melanogaster*. L'espressione di RP49 è stata usata come sistema di riferimento per la normalizzazione dei livelli di espressione e dell'integrità dei retrotrascritti.

L'analisi dei trascritti mette in evidenza la capacità dell'insetto di esprimere le isoforme in momenti differenti del ciclo vitale in funzione delle necessità metaboliche. L'isoforma 1 sembra rivestire un ruolo costitutivo nel metabolismo di *D. melanogaster*, essendo presente durante tutto l'arco della vita dell'insetto. Mentre le isoforme *DmDIC3RA* e *DmDIC4RA* espresse esclusivamente negli stadi pupali, ovvero quando l'insetto si prepara ad affrontare notevoli cambiamenti morfologici, potrebbero avere un ruolo specifico per questo particolare stadio di sviluppo.

3.5 Amplificazione delle sequenze codificanti per *DmDIC1*, *DmDIC3* e *DmDIC4*.

Le sequenze codificanti per le tre isoforme *DmDIC1*, *DmDIC3* e *DmDIC4*, per le quali l'analisi dell'RT-PCR ha mostrato la presenza di trascritti, sono state amplificate mediante reazione di PCR (*Materiali e metodi par. 2.2*) condotte sull'ibrido DNA-RNA, ottenuto dalla retrotrascrizione degli RNA totali. I retrotrascritti di partenza sono stati scelti in accordo con i livelli di espressione rilevati dall'RT-PCR (*DmDIC1* larva, *DmDIC3* e *DmDIC4* pupa).

I primer, forward e reverse, utilizzati per l'amplificazione del cDNA sono stati disegnati (*Materiali e Metodi par. 2.3*) sulla base della sequenza codificanti disponibili in banca dati. Per verificare l'avvenuta amplificazione dei frammenti codificanti per i cDNA delle tre isoforme di *DmDIC*, un'aliquota dei prodotti di PCR è stata sottoposta a corsa elettroforetica su gel di agarosio (*Materiali e Metodi par. 2.4*) (Fig. 25). La presenza di bande di amplificazione per *DmDIC1*, *DmDIC3* e *DmDIC4* rispettivamente all'altezza di circa 840 bp, 860 bp e 910 hanno confermato l'avvenuta amplificazione dei cDNA.

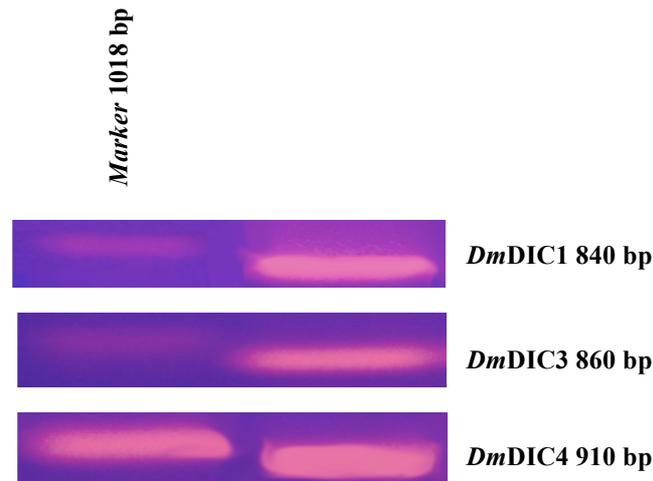


Fig. 25. Elettroforesi su gel di agarosio all'1% degli amplificati di PCR.

Le bande di amplificazione a 840, 860 e 910 bp dedotte dal confronto con il marker 1 kb hanno confermato l'avvenuta amplificazione rispettivamente dei cDNA di *DmDIC1*, *DmDIC3* e *DmDIC4*.

3.6 Costruzione dei plasmidi ricombinanti *DmDIC(1, 3, 4)/pET-21b/V5-His*.

I frammenti di DNA ottenuti dalle reazioni di amplificazione, sono stati estratti dal gel e digeriti con gli enzimi di restrizione Nde I ed Hind III (*Materiali e Metodi par. 2.5-2.6*) e sottoposti a reazione di ligazione (*Materiali e Metodi par. 2.9-2.10.*) con il vettore di espressione pET-21b/V5-His (*Materiali e Metodi par.2.8.*) precedentemente digerito con le stesse endonucleasi (*Materiali e Metodi par.2.7*). Le reazioni di ligazione sono state utilizzate per trasformare ceppi di *E.coli* TG1 (*Materiali e Metodi par.2.11-2.12*). Allo scopo di valutare la presenza dei plasmidi ricombinanti, al loro interno e' stata eseguita una estrazione "veloce" del DNA plasmidico (*Materiali e Metodi par.2.13*). I vari campioni di DNA ottenuti, sono stati caricati su un gel di agarosio all'1% in diversi pozzetti ed e' stata caricata anche una aliquota di DNA del plasmide pET-21b/V5-His da utilizzare come riferimento. Dal paragone tra le altezze delle bande dei campioni e quella del plasmide pET-21b/V5-His non contenente inserti, sono stati valutati positivi, cioè plasmidi contenenti realmente l'inserto, quelli la cui altezza risultava superiore rispetto all' altezza della banda del plasmide senza l'inserto. Infatti, i plasmidi ricombinanti migrano meno velocemente rispetto al plasmide senza l'inserto. Da tutte le colonie stimate positive è stato estratto il DNA plasmidico (*Materiali e Metodi par.2.14*) e sottoposto ad analisi di sequenza, mediante sequenziatore automatico, per verificare la presenza di eventuali mutazioni introdotte durante la reazione di PCR.

I tre plasmidi ricombinanti (*DmDIC1/pET-21b/V5-His*, *DmDIC3/pET-21b/V5-His* e *DmDIC4/pET-21b/V5-His*) (Fig. 26) così ottenuti, sono stati utilizzati per trasformare le cellule di *E. coli* del ceppo BL21λ(DE3) (*Materiali e Metodi par. 2.15-2.16*).

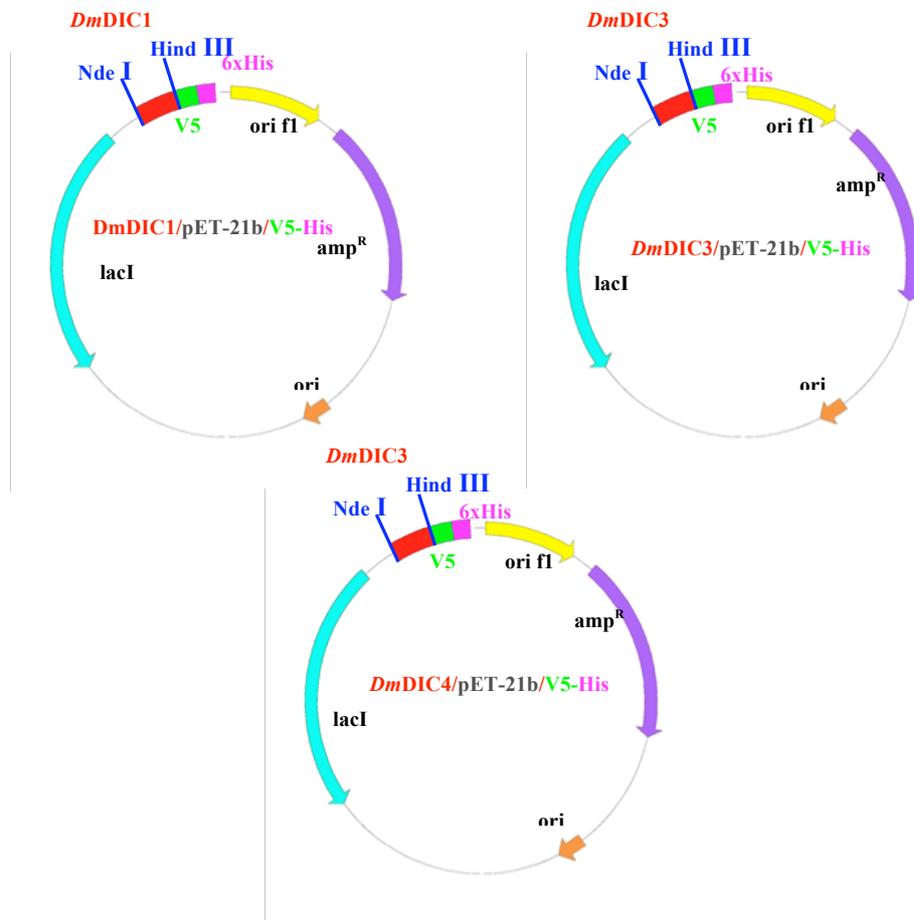


Fig. 26. Plasmidi ricombinanti *DmDIC1/pET-21b/V5-His*, *DmDIC3/pET-21b/V5-His* e *DmDIC4/pET-21b/V5-His*

I cDNA di *DmDIC1-3-4* digeriti *Nde I* e *Hind III* sono stati clonati nel vettore di espressione pET21b/V5-His.

3.7 Espressione dei trasportatori *DmDIC(1,3,4)/V5-His* in cellule di *E. coli* del ceppo BL21λ(DE3).

I plasmidi ricombinanti *DmDIC1/pET-21b/V5-His*, *DmDIC3/pET-21b/V5-His* e *DmDIC4/pET-21b/V5-His* e il solo plasmide pET21b/V5-His, sono stati utilizzati per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo BL21λ(DE3). L'induzione con IPTG 1 mM dei plasmidi ricombinanti, ha determinato nelle cellule di *E. coli* la formazione di aggregati che precipitando danno origine ai corpi di inclusione o *Inclusion Bodies* (I.B.). Le I.B.

delle tre isoforme di *DmDIC-V5-His* sono state successivamente estratte e purificate mediante una centrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio (*Materiali e Metodi, par. 2.17*). Per valutare l'over-espressione della proteina, le I.B. ottenute da cellule batteriche trasformate con il vettore di espressione senza inserto [Fig. 27 (A-B-C), linee 2 e 3] e da cellule batteriche trasformate con il plasmide ricombinante [Fig. 27 (A-B-C), linee 4 e 5] sono state analizzate su SDS-PAGE. Le bande proteiche sono state colorate con Comassie Brilliant Blue (*Materiali e Metodi, par. 2.18-2.20*).

L'avvenuta over-espressione delle proteine ricombinanti *DmDIC1-V5-His*, *DmDIC3-V5-His* e *DmDIC4-V5-His* e' dimostrata dalla presenza di una banda proteica nei singoli gel rispettivamente di peso molecolare di circa 33 (Fig. 27 A linea 5), 34 (Fig. 27 B linea 5), 37 (Fig. 27 C linea 5) KDa, nella linea 5 corrispondenti alle cellule batteriche trasformate con i plasmidi ricombinanti, dopo quattro ore di induzione con IPTG assente nelle prove di controllo (linee 2, 3 e 4). Il peso molecolare delle proteine ricombinanti e' maggiore di 3 KDa rispetto alla proteine native per la presenza nella porzione C-terminale dell'epitopo V5-His.

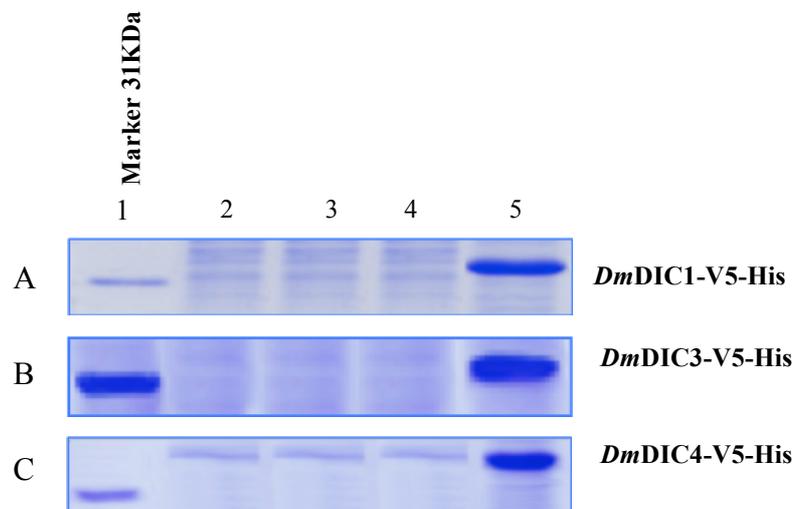


Fig. 27: Espressione in cellule di *E.coli* BL21λ (DE3) delle proteine ricombinanti *DmDIC1-V5-His*, *DmDIC3-V5-His* e *DmDIC4-V5-His*. Nei gel di poliaccrilammide sono stati caricati le I.B. estratte dalle cellule di *E.coli* BL21λ (DE3) trasformate con: Linea 2 vettore pET21b/V5-His, linea 3 vettore pET21b/V5-His indotto per 4 ore con IPTG (1mM), linea 4 plasmidi ricombinanti non indotti, linea 5 plasmidi ricombinanti indotti per 4 ore con IPTG (1mM).

Per confermare l'avvenuta espressione, sugli estratti proteici del precedente esperimento è stata eseguita un'analisi di Western-Blot (*Materiali e Metodi par. 2.21*) utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo V5, sequenza eterologa di 14 amminoacidi fusa alla regione carbossi-terminale del plasmide ricombinante. I risultati ottenuti, mostrati in figura 28 A, 28 B e 28 C non evidenziano alcuna banda di immunodecorazione in corrispondenza delle prove di controllo (linea 2, 3 e 4), che sono invece presenti nella linea 5 corrispondenti alle cellule batteriche trasformate con i plasmide ricombinanti, dopo quattro ore di induzione con IPTG.

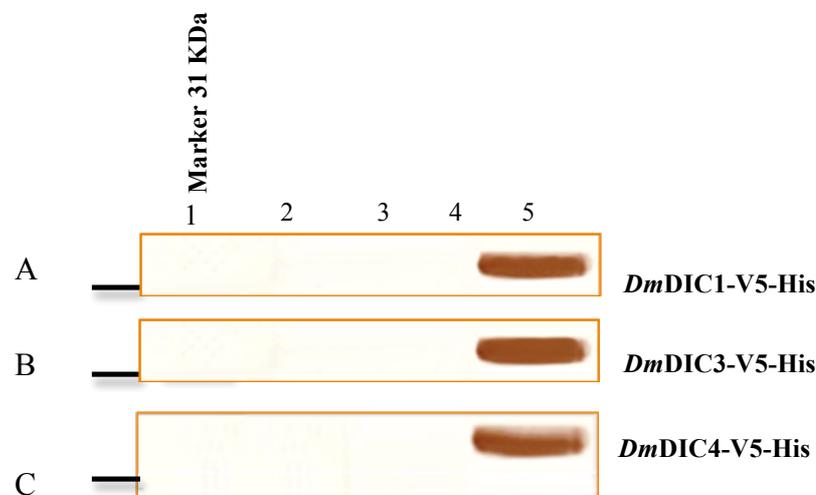


Fig. 28. Western-Blot analisi eseguito sulle IB caricate e separate con SDS-PAGE. I gel sono stati trasferiti su membrana di nitrocellulosa e immunodecorati con l'anticorpo monoclonale di topo AntiV5. I gel sono stati caricati come in Fig. 27. La linea del Marker e' stata dedotta dalla membrana di nitrocellulosa dopo colorazione con Rosso Ponceau.

3.8 Ottimizzazione dell'attività di trasporto di *DmDIC1-V5-His*, *DmDIC3-V5-His* e *DmDIC4-V5-His*.

Per studiare le proprietà cinetiche di un *carrier* mitocondriale, la proteina ricombinante deve essere estratta dai corpi d'inclusione (*Materiali e Metodi par. 2.17*), opportunamente solubilizzata, ed inserita in un sistema artificiale di membrane secondo uno schema generale di ricostituzione (*Materiali e Metodi par. 2.22-2.27*). Tale schema, prevede la preparazione di una miscela di ricostituzione costituita da fosfolipidi, detergente, substrato e proteina solubilizzata al fine di formare delle micelle (proteoliposomi) sulle quali poter misurare la capacità di trasporto della proteina.

Nel nostro caso, i dati riportati in letteratura riguardanti i trasportatori degli acidi dicarbossilici in altri organismi^[4;30], hanno consentito di scegliere come substrati radioattivi per l'analisi cinetica il ^[14C]malato e il ³³fosfato (³³Pi).

Partendo dai dati presenti in letteratura su questo tipo di trasportatore^[4;30] e dallo schema classico di ricostituzione, sono state effettuate prove iniziali di ottimizzazione della ricostituzione al fine di migliorare l'attività di trasporto dei *carrier* da noi studiati (dati non mostrati). Il protocollo finale utilizzato per la caratterizzazione cinetica delle proteine *DmDIC1-V5-His*, *DmDIC3-V5-His* e *DmDIC4-V5-His* prevede:

- ✓ 125 µg di proteina solubilizzata
- ✓ 1,3 % di triton X114
- ✓ 1.15 µg di DPG
- ✓ 20 mM Hepes pH=7

Quando la prova sperimentale lo richiede a questa miscela e' aggiunto un substrato interno ad una concentrazione saturante di 20 mM. La miscela di ricostituzione e' preparata in un volume finale di 700 µl, la formazione dei proteoliposomi si ottiene mediante 13 passaggi della miscela su colonna di amberlite (*Materiali e metodi par. 2.23*).

Gli studi preliminari hanno dimostrato che le proteine *DmDIC1-V5-His* e *DmDIC4-V5-His* sono in grado di catalizzare sia gli omoscambi malato/^[14C]malato e Pi/³³Pi, che gli eteroscambi malato/³³Pi e Pi/^[14C]malato.

DmDIC3-V5-His invece, e' in grado di catalizzare il solo scambio di fosfato. In queste prove preliminari e' stato inoltre individuata, come inibitore istantaneo del trasporto dei *carrier* da utilizzare negli esperimenti di caratterizzazione cinetica, la miscela Piridossalfosfato 40mM/Batofenantrolina 15 mM.

Nessuna attivita' di trasporto e' stata osservata dalla ricostituzione delle proteine solubilizzate con sarkosyl (*Materiali e Metodi par. 2.21*) ottenute sia da cellule contenenti il solo plasmide senza inserto, sia da quelle dove non era stata indotta l'espressione. Questo ha consentito di dimostrare che l'attivita' di trasporto misurata e' da attribuire alle sole proteine ricombinanti *DmDIC1-V5-His*, *DmDIC3-V5-His* e *DmDIC4-V5-His* espresse nelle cellule di *E.coli*.

3.9 Caratterizzazione funzionale di DmDIC1-V5-His, DmDIC3-V5-His e DmDIC4-V5-His.

Dopo aver ottimizzato gli elementi fondamentali per la ricostituzione, sulle tre isoforme di *DmDIC-V5-His*, sono stati effettuati specifici studi finalizzati alla caratterizzazione funzionale dei trasportatori.

Le tre proteine ricombinanti sono state sottoposte a studi di cinetica nel tempo mediante time-course. A questo scopo le proteine ricombinanti *DmDIC*(1, 3, 4)-V5-His sono state ricostituite in liposomi, le loro attività di trasporto sono state studiate misurando l'ingresso di [¹⁴C] malato o [³³Pi] esterni in proteoliposomi riempiti con malato o fosfato durante l'incorporazione della proteina.

Il time-course (Fig. 29) effettuato sull'omoscambio malato/^[14C]malato, ha mostrato che ***DmDIC1-V5-His*** catalizza uno scambio di [¹⁴C]malato esterno contro 20mM di malato interno secondo una cinetica di primo ordine con una *k* di 0,59 min⁻¹ e un valore massimo di quantità di substrato entrato all'equilibrio e a tempo infinito pari a 43,046 μmol/mg proteina (Fig. 29 grafico nero). La velocità iniziale (misurata come prodotto della *k* per la quantità massima di substrato entrato all'equilibrio) di ingresso di malato per la reazione di scambio è di 25,48 μmol/min/mg proteina. In assenza di substrato interno nei proteoliposomi non è stata osservata nessuna reazione di scambio (Fig. 29 grafico blu), dimostrando che la proteina non catalizza un trasporto unidirezionale ma può catalizzare esclusivamente uno scambio di substrati. Inoltre, nessuna reazione di scambio è stata osservata quando nei liposomi è stata incorporata proteina precedentemente inattivata con il calore dimostrando che l'ingresso di substrato radioattivo, da noi misurato nella reazione di scambio, non è dovuto ad un artefatto (dati non mostrati).

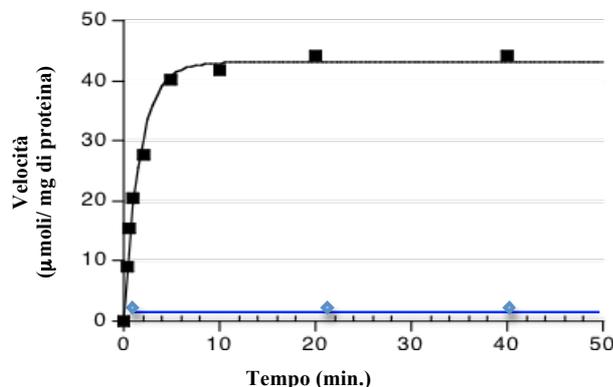


Fig. 29. Time-course malato/¹⁴Cmalato DmDIC1-V5-His.

Cinetica dell'ingresso di ¹⁴C malato in proteoliposomi ricostituiti con DmDIC1-V5-His. 0,5 mM ¹⁴C malato sono stati aggiunti a proteoliposomi contenenti malato ad una concentrazione di 20 mM (scambio ■) o NaCl ad una concentrazione di 20 mM (scambio ◆). Stessi risultati sono stati ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

Il time-course (Fig. 30) effettuato sull'omoscambio Pi/³³Pi ha mostrato che **DmDIC3-V5-His** catalizza uno scambio di ³³Pi esterno contro 20mM di Pi interno secondo una cinetica di primo ordine con una k di 0,38 min⁻¹ e un valore massimo di quantità di substrato entrato all'equilibrio e a tempo infinito pari a 164,51 μmol/mg proteina (Fig. 30 grafico nero). La velocità iniziale (misurata come prodotto della k per la quantità massima di substrato entrato all'equilibrio) di ingresso di fosfato per la reazione di scambio è di 62,51 μmol/min/mg proteina. In assenza di substrato interno nei proteoliposomi non è stata osservata nessuna reazione di scambio (Fig. 30 grafico blu). Inoltre, nessuna reazione di scambio è stata osservata quando nei liposomi è stata incorporata proteina precedentemente inattivata con il calore, dimostrando che l'ingresso di substrato radioattivo, da noi misurato nella reazione di scambio, non è dovuto ad un artefatto (dati non mostrati).

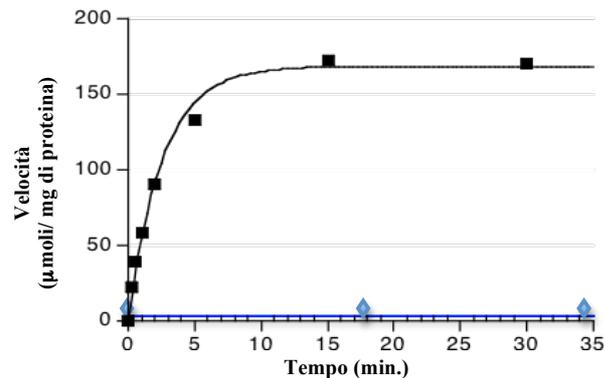


Fig. 30. Time-course Pi/³³Pi *DmDIC3-V5-His*.

Cinetica dell'ingresso di [³³Pi]fosfato in proteoliposomi ricostituiti con *DmDIC1-V5-His* 2 mM sono stati aggiunti a proteoliposomi contenenti Pi ad una concentrazione di 20 mM (scambio ■) o NaCl ad una concentrazione di 20 mM (scambio ◆). Stessi risultati sono stati ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

Gli studi di caratterizzazione cinetica sulla proteina ricombinante *DmDIC4-V5-His* sono in uno stadio preliminare. Non esistono tutt'oggi dati definitivi sulle costanti cinetiche, sulla specificità di substrato e sull'effetto degli inibitori su questa isoforma. Il primo dato parziale da noi ottenuto è il time-course effettuato sull'omoscambio malato/^[14C]malato che ha mostrato che *DmDIC4-V5-His* catalizza uno scambio di ^[14C]malato esterno contro 20mM di malato interno secondo una cinetica di primo ordine. L'equilibrio di scambio viene raggiunto in 10 minuti (Fig. 31 grafico nero), nessuna attività di trasporto è stata osservata nell'esperimento condotto in parallelo in assenza di substrato interno (Fig. 31 grafico blu) dimostrando che la proteina non catalizza un trasporto unidirezionale ma può catalizzare esclusivamente uno scambio di substrati. Inoltre, nessuna reazione di scambio è stata osservata quando nei liposomi è stata incorporata proteina precedentemente inattivata con il calore, dimostrando che l'ingresso di substrato radioattivo, da noi misurato nella reazione di scambio, non è dovuto ad un artefatto (dati non mostrati). La mancanza del dato riguardante la quantità di proteina incorporata non ci ha consentito di calcolare la velocità di ingresso del ^[14C]malato pertanto il grafico in Figura 31 riporta i Δ c.p.m. in funzione del tempo.

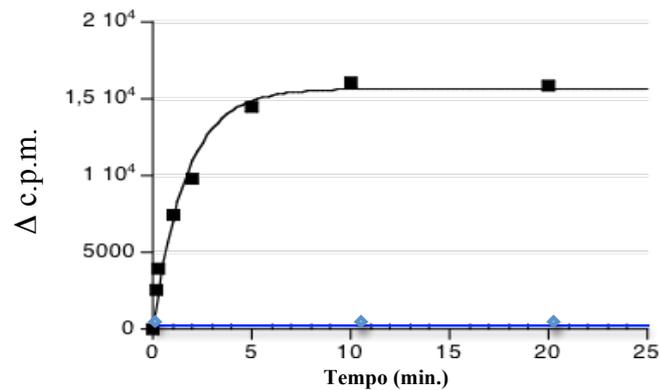


Fig. 31. Time-course mal./^[14C]mal DmDIC4-V5-His.

Cinetica del trasporto di ^[14C]malato in proteoliposomi ricostituiti con DmDIC4-V5-His. 0,5 mM ^[14C]malato sono stati aggiunti a proteoliposomi contenenti malato ad una concentrazione di 20 mM (scambio -■-) o NaCl ad una concentrazione di 20 mM (scambio -◆-). Stessi risultati sono stati ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

3.10 Costanti cinetiche di DmDIC1-V5-His e DmDIC3-V5-His.

Il processo di trasporto di un substrato può essere descritto in modo analogo a una reazione enzimatica. Quando la velocità di ingresso del substrato, viene misurata in funzione della concentrazione esterna di substrato, la curva che si ottiene ha un andamento iperbolico; a concentrazioni di substrato esterne elevate, la velocità di ingresso tende al valore di Vmax. Il trasporto può essere quindi descritto dall'equazione:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]_{\text{est}}}{K_m + [S]_{\text{est}}}$$

Per una determinazione accurata dei valori di K_m e V_{\max} , analogamente alle reazioni enzimatiche, si considera il grafico dei doppi reciproci: $1/V_0$ in funzione di $1/[S]_{\text{est}}$, si ottiene una retta la cui intercetta con l'asse delle ordinate, determina il valore di V_{\max} ($1/V_{\max}$), mentre l'intercetta con l'asse delle ascisse, determina il valore di K_m ($-1/K_m$). Per DmDIC1-V5-His sono state misurate le K_m sia per l'omoscambio malato/^[14C]malato che per l'eteroscambio malato/³³Pi i tempi utilizzati negli esperimenti di cinetica

rispettivamente di 40 e 60 secondi ricadono nella fase lineare del trasporto. Il valore della K_m , si ottiene successivamente per estrapolazione matematica. I grafici in Figura 20 e 21 mostrano la linearizzazione secondo Lineweaver-Burk dell'equazione di Michaelis e Menten. Sui grafici è riportato: sulle ascisse $1/[S]$ e sulle ordinate $1/V_0$. La K_m , per il malato e per il fosfato sono rispettivamente di $0,817 \pm 0,12$ mM e di $2,352 \pm 0,2$ mM, media ottenuta da quattro esperimenti indipendenti. Il valore della V_{max} per il malato e il fosfato è di $64 \pm 0,113$ $\mu\text{moli malato min}^{-1}$ mg prot^{-1} (Fig. 32 e 33). Questi dati sono in linea con i risultati presenti in letteratura per i *carrier* mitocondriali dei dicarbossilici negli organismi eucariotici superiori (Introduzione paragrafo 1.7).

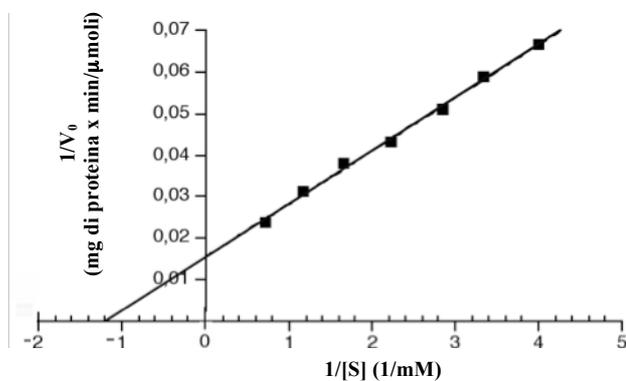


Fig. 32. Grafico secondo Lineweaver-Burk della K_m di $DmDIC1-V5His$ per il malato.

Il substrato radiattivo è stato utilizzato in un range di concentrazione tra 0.25 e 1.4 mM. Sull'asse delle ordinate è riportato l'inverso della velocità di reazione [$1/(\mu\text{moli di malato/ mg di proteina per 1 minuto})$]. Sull'asse delle ascisse è riportata l'inverso della concentrazione di substrato ($1/ \text{mM}$). Dall'intercetta sull'asse delle x ($-1/K_m$) si ricava il valore della K_m , mentre dall'intercetta sull'asse delle y ($1/V_{max}$) si ricava il valore di V_{max} .

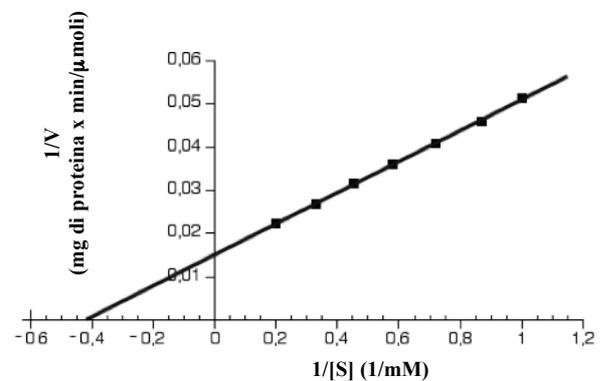


Fig. 33. Grafico secondo Lineweaver-Burk della K_m di $DmDIC1-V5His$ per il fosfato.

Il substrato radiattivo è stato utilizzato in un range di concentrazione di tra 1 e 5 mM. Sull'asse delle ordinate è riportato l'inverso della velocità di reazione [$1/(\mu\text{moli di fosfato/ mg di proteina per 1 minuto})$]. Sull'asse delle ascisse è riportata l'inverso della concentrazione di substrato ($1/ \text{mM}$). Dall'intercetta sull'asse delle x ($-1/K_m$) si ricava il valore della K_m , mentre dall'intercetta sull'asse delle y ($1/V_{max}$) si ricava il valore di V_{max} .

Per $DmDIC3-V5-His$ è stata misurata la K_m per l'omoscambio $Pi^{33}Pi$ (Fig. 34). Il tempo di scambio è stato di 30 secondi $Pi^{33}Pi$, valore che nel time-course, ricade nella fase lineare del trasporto. La K_m per il fosfato è di $3,2 \pm 0,3$ mM. Il valore della V_{max} per il fosfato è di $253 \pm 0,124$ $\mu\text{moli fosfato min}^{-1}$ mg prot^{-1} .

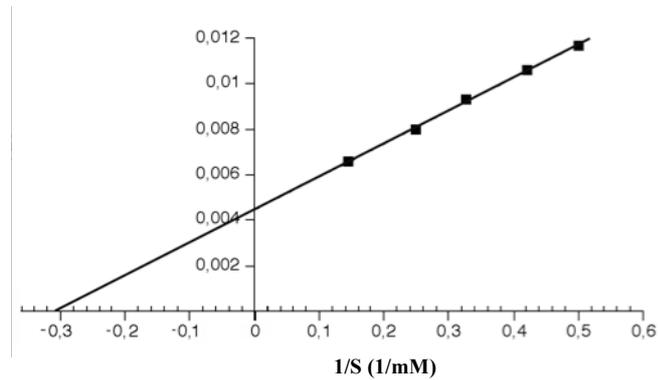


Fig. 34. Grafico secondo Lineweaver-Burk della Km di *DmDIC3-V5HIS* per il fosfato.

Il substrato radiattivo è stato utilizzato in un range concentrazione tra 2 e 6 mM. Sull'asse delle ordinate è riportato l'inverso della velocità di reazione [$1/(\mu\text{moli di malato/ mg di proteina per 1 minuto})$]. Sull'asse delle ascisse è riportata l'inverso della concentrazione di substrato ($1/\text{mM}$). Dall'intercetta sull'asse delle x ($-1/K_m$) si ricava il valore della K_m , mentre dall'intercetta sull'asse delle y ($1/V_{\text{max}}$) si ricava il valore di V_{max} .

In Tabella VIII sono riassunte le costanti cinetiche delle tre isoforme del *carrier* mitocondriale degli acidi dicarbossilici in *D. melanogaster*.

Tabella VIII

Costanti cinetiche delle isoforme *DmDIC1-V5-His* e *DmDIC3-V5-His* in *D. melanogaster*

Isoforma <i>DmDIC</i>	<i>K_m</i> (mM)		<i>V_{max}</i> (mmol/min/g proteina)
	Malato	Fosfato	
<i>DmDIC1-V5-His</i>	0,817 ± 0,12	2,352 ± 0,2	64 ± 0,133
<i>DmDIC3-V5-His</i>		3,2 ± 0,3	253 ± 0,124

3.11 Specificità di substrato di *DmDIC1-V5-His* e *DmDIC3-V5-His*.

Perché una proteina di membrana possa essere definita “proteina di trasporto di substrati” deve rispondere a precise caratteristiche:

- ✓ specificità di substrato,
- ✓ sensibilità agli inibitori.

Specificità di substrato vuol dire che ogni proteina *carrier* è in grado di catalizzare il trasporto di un solo specifico substrato o di un suo isomero strutturale. Lo studio della specificità di substrato della proteina ricombinante *DmDIC1-V5-His* (Tabella IX) è stato condotto misurando l'ingresso di ^{14}C malato (1mM) e ^{33}Pi (2mM) in proteoliposomi che erano stati precedentemente riempiti con vari substrati a concentrazione saturante, gli scambi sono stati effettuati a 40 e 60 secondi, rispettivamente. Lo studio della specificità di substrato della proteina ricombinante *DmDIC3-V5-His* (Tabella IX) è stato condotto misurando l'ingresso di ^{33}Pi (3mM) in proteoliposomi che erano stati precedentemente riempiti con vari substrati a concentrazione saturante, il tempo di scambio è stato di 60 secondi.

Lo studio della specificità di substrato della proteina ricombinante *DmDIC4-V5-His* è tutt'ora oggetto di indagine.

L'attività di trasporto dei vari substrati, mostrata in Tabella IX, è stata espressa in %, assumendo come valore di riferimento l'attività di scambio ottenuta quando all'interno dei proteoliposomi è presente lo stesso substrato dell'esterno (omoscambio). In assenza di substrato interno per entrambe le proteine ricombinanti non è stato osservato nessuno ingresso di substrato.

I dati da noi ottenuti per *DmDIC1-V5-His* sono in accordo con i precedenti studi effettuati negli organismi eucariotici superiori^[4;30]. Dei substrati da noi presi in considerazione *DmDIC1* è in grado di trasportare con alta efficienza : malato, fosfato e malonato, e con minore efficienza solfato, succinato, acido maleico, ossalacetato e tiosolfato (Tab.IX). Nessun trasporto è stato osservato con i substrati: fenilsuccinato, aspartato, citrato, α -chetoglutarato, fumarato, aspartato, glutammato, piruvato, carnitina e ornitina (Tab.IX). Risultati simili sono stati ottenuti in tre differenti esperimenti.

I dati da noi ottenuti per *DmDIC3-V5-His* mostrano che è in grado di trasportare ad alta efficienza fosfato e solfato mentre con minore efficienza tiosolfato. Nessun ingresso significativo di substrato è stato osservato con le altre molecole da noi analizzate. I risultati ottenuti per l'isoforma *DmDIC1-V5-His* ci fanno pensare che questa isoforma

abbia un ruolo nella gluconeogenesi o nella sintesi degli amminoacidi. L'isoforma *DmDIC3-V5-His* abbia un ruolo anaplerotico ovvero sia utilizzata dall'insetto per introdurre fosfato all'interno dei mitocondri, utile per la sintesi dell'ATP; questa tesi è avvalorata dall'analisi dei livelli di espressione durante il ciclo vitale, che colloca la proteina nella fase di pupa, stadio nel quale la *D. melanogaster* si prepara ad un profondo cambiamento morfologico (adulto) (*Introduzione par.1.8*) non senza un grosso dispendio energetico. Risultati simili sono stati ottenuti in tre differenti esperimenti.

Tabella IX

Trasporto di substrati interni in proteoliposomi contenenti le proteine ricombinanti *DmDIC1-V5-His* e *DmDIC3-V5-His*.

Substrati interni	% trasporto <i>DmDIC1-V5-His</i>		% trasporto <i>DmDIC3-V5-His</i>
	[¹⁴ C]Malato	³³ Pi	³³ Pi
Assente	1,2	1,3	1,19
Malato	100	105,43	4,43
Fosfato	64,48	100	100
Malonato	86,2	129,08	3,9
Solfato	30,33	50,49	146,89
Acido Maleico	57,93	62,11	4,23
Ossalacetato	27,1	31,88	11,4
Tiosolfato	48,2	63,44	57,7
Fenilsuccinato	1,5	1,45	2,7
Aspartato	1,6	1,55	1,8
Citrato	1,4	1,3	2,44
α-Chetoglutarato	1,25	1,22	14,1
Glutatione-ossid.	1,33	1,25	1,27
Glutatione-rid.	1,47	1,37	1,34
Fumarato	1,25	1,34	1,22
Glutammato	1,22	1,31	1,29
Piruvato	1,27	1,45	1,27
Carnitina	1,31	1,33	1,22
Ornitina	1,29	1,32	1,31

3.12 Sensibilità di *DmDIC1-V5-His* e *DmDIC3-V5-His* agli inibitori.

Gli inibitori sono molecole che interferiscono con l'attività di trasporto di una proteina *carrier* rallentando o bloccando completamente la reazione di scambio.

Per saggiare la sensibilità agli inibitori sulla reazione di scambio dei *carrier* degli acidi dicarbossilici di *Drosophila melanogaster* (*DmDIC1-V5-His* e *DmDIC3-V5-His*), sono stati utilizzati reagenti specifici per amminoacidi, in grado di inibire l'attività di trasporto legandosi alle catene laterali degli stessi, qualora questi svolgano un ruolo fondamentale durante la catalisi. Amminoacidi che possono essere determinanti o per il mantenimento della corretta conformazione della proteina durante l'evento catalitico o per la loro partecipazione diretta alla costituzione del sito di legame. In Tabella X sono riassunte le percentuali residue di trasporto osservate in presenza degli inibitori classici dei *carrier* mitocondriali.

Gli esperimenti di scambio sono stati condotti come descritto per lo studio della specificità di substrato (par. 3.10). Lo studio della sensibilità agli inibitori della proteina ricombinante *DmDIC4-V5-His* e' tutt'ora oggetto di indagine.

Nell'esperimento i reagenti dei gruppi tiolici sono stati preincubati per 2 minuti mentre gli altri inibitori sono stati testati introducendoli nella miscela di ricostituzione in contemporanea con il substrato radioattivo. Tutti gli inibitori sono stati utilizzati ad una concentrazione di 10 mM, il Mersalyl, la carbossiatratriloside e l' N-etilmaleimide sono stati utilizzati ad una concentrazione 0.1 mM. La miscela PLP/BATO e' stata utilizzata ad una concentrazione rispettivamente di 40mM e 15mM. Con le sole eccezioni della Carbossiatratriloside e l'Nmetilmaleimide un'apprezzabile riduzione dell'attività di trasporto e' stata osservata. Il migliore inibitore per i *carrier DmDIC1-V5-His* e *DmDIC3-V5-His* e' stato la miscela PLP (40mM)/Batofenantrolina (15mM) con una attività residua di trasporto di circa il 2% (Tabella X). Risultati simili sono stati ottenuti in tre differenti esperimenti.

Tabella X

Effetto degli inibitori, sullo scambio malato/^[14C]malato di *DmDIC1-V5-His* e $\text{Pi}/^{33}\text{Pi}$ per *DmDIC3-V5-His*

INIBITORI	% TRASPORTO ^[14C] MALATO <i>DmDIC1-V5-His</i>	% TRASPORTO ³³ Pi <i>DmDIC3-V5-His</i>
Nessuno	100	100
Mersalyl	23,3	3,32
N-etilmaleimide	77,5	87,3
Butilmalonato	11,65	16,1
Piridossal-5-fosfato (PLP)	9,2	7,3
Batofenantrolina (BATO)	8,6	6,8
Carbossiattrattiloside	86,3	84,7
Benzilmalonato	16,6	15,2
PLP(40mM)/BATO(15mM)	2,0	2,4

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati studiati i quattro ortologi del trasportatore mitocondriale degli acidi dicarbossilici in *Drosophila melanogaster*, mediante:

- ✓ individuazione dei geni omologhi al DIC umano;
- ✓ analisi dei trascritti mediante RT-PCR nei quattro stadi del ciclo vitale dell'insetto;
- ✓ clonaggio in vettori di espressione dei corrispondenti cDNA;
- ✓ over-espressione della proteina in *E. coli*;
- ✓ misurazione delle costanti cinetiche;
- ✓ analisi della specificità di substrato e della sensibilità agli inibitori;

Il primo passo è stato quello di identificare i possibili geni di *D. melanogaster* in grado di trascrivere per ipotetici *carrier* mitocondriali. La ricerca è stata effettuata utilizzando il programma blastp e la banca dati del National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponibile in rete all'indirizzo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Nella nostra analisi sono state utilizzate come query tutte le sequenze proteiche umane codificanti per ipotetici *carrier* mitocondriali mentre la ricerca è stata ristretta alla sola analisi del genoma della *D. melanogaster*. Per ciascuna delle proteine da noi individuate è stato successivamente associato il gene che la codifica. Il risultato finale di quest'indagine ha mostrato che in *D. melanogaster* sono presenti 46 geni che codificano per un totale di 58 possibili proteine appartenenti alla MCF. Mediante l'utilizzo del programma ClustalW le sequenze proteiche dei *carrier* mitocondriali dell'uomo a funzione nota e quelle di *D. melanogaster* sono state sottoposte ad allineamento multiplo. I dati raccolti dall'allineamento multiplo sono stati da noi utilizzati per la costruzione dell'albero filogenetico, il quale ci ha consentito di raggruppare in varie sottofamiglie le sequenze proteiche di *D. melanogaster* a funzione ignota con le sequenze proteiche dei *carrier* mitocondriali umani a funzione nota, in base alla loro omologia di sequenza. Tra le varie sottofamiglie presenti, abbiamo deciso di investigare in modo più approfondito i quattro trascritti di *D. melanogaster* recanti nella loro sottofamiglia il trasportatore mitocondriale umano degli acidi dicarbossilici *hDIC*, codificato dal gene SLC25A10 (Fig. 14). Le quattro proteine di *D. melanogaster* codificate dai geni CG8790, CG4323, CG11196 e CG18363 presentano nei confronti di *hDIC* una omologia di

sequenza molto elevata, rispettivamente del 57.3%, 47.3%, 44.5% e 34.7% (Fig. 19-22) e, in funzione di tale omologia sono state da noi chiamate *DmDIC1*, *DmDIC2*, *DmDIC3* e *DmDIC4*. Un'analisi più accurata, condotta mediante l'utilizzo della banca dati FlyBase sui geni da noi presi in considerazione ha mostrato che il gene CG8790 trascrive per 2 mRNA indicati con la sigla *DmDIC1RA* e *DmDIC1RB*, codificanti per la stessa proteina *DmDIC1*. Il gene CG4323 per due mRNA indicati con le sigle *DmDIC2RA* e *DmDIC2RB*. Il gene CG11196 trascrive per un solo mRNA indicato con la sigla *DmDIC3RA* codificante per la proteina *DmDIC3*. Il gene CG18363 trascrive per un solo mRNA indicato con la sigla *DmDIC4RA* codificante per la proteina *DmDIC4* (Fig. 15-18).

L'espressione dei sei trascritti durante i quattro stadi larvali pupa insetto e adulto sono stati indagati, mediante RT-PCR. Da questa analisi è emerso che, *DmDIC1RA* è espresso in embrione, larva e pupa, mentre la seconda isoforma *DmDIC1RB* è espressa in modo ubiquitario, anche se in maggiore quantità negli stadi embrionale e larva. L'isoforma *DmDIC2RA* e *DmDIC2RB*, nelle condizioni sperimentali da noi adottate, non mostrano nessun livello di espressione. Le isoforme *DmDIC3RA* e *DmDIC4RA* sono espresse soltanto nello stadio di pupa (Fig. 24).

Le sequenze codificanti per le tre isoforme *DmDIC1*, *DmDIC3* e *DmDIC4*, per le quali l'analisi dell'RT-PCR ha mostrato la presenza di trascritti, sono state amplificate mediante reazione di PCR, inserite nel vettore di espressione pET-21b/V5-His recante a valle del sito multiplo di clonaggio la sequenza nucleotidica codificante per l'epitopo V5-His. I plasmidi ricombinanti *DmDIC1/pET-21b/V5-His*, *DmDIC3/pET-21b/V5-His* e *DmDIC4/pET-21b/V5-His* (Fig.26) sono stati, quindi utilizzati, per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo BL21λ(DE3), dopo induzione con IPTG dalle cellule trasformate sono state estratte le I.B. sono state analizzate mediante SDS-PAGE e colorato con Comassie Brilliant Blue. La colorazione, ha messo in evidenza l'avvenuta over-espressione delle proteine ricombinanti *DmDIC1-V5-His*, *DmDIC3-V5-His* e *DmDIC4-V5-His* con una banda proteica nei singoli gel rispettivamente di peso molecolare di circa 33, 34 e 37 KDa (Fig. 27). L'analisi di Western Blot, effettuata con l'anticorpo monoclonale anti-V5, condotta sull'esperimento precedente ha confermato l'avvenuta over-espressione della proteina delle tre isoforme di *DmDIC* in cellule di *E. coli* immunodecorando le sole bande proteiche di over-espressione.(Fig. 28).

L'attività di trasporto è stata misurata incorporando in vescicole fosfolipidiche la proteina espressa, secondo uno schema classico e usando un substrato radioattivo esterno in grado di permettere il monitoraggio dell'entità del trasporto.

Dai risultati ottenuti dai time-course (Fig. 29) condotti su **DmDIC1-V5-His**, si evince che il *carrier* segue una cinetica di primo ordine con una k di $0,59 \text{ min}^{-1}$ e un valore massimo di quantità di substrato entrato all'equilibrio e a tempo infinito pari a $43,046 \text{ } \mu\text{mol/mg}$ proteina. La velocità iniziale di ingresso di malato, misurata come prodotto della k per la quantità massima di substrato entrato all'equilibrio, è di $25,48 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$ proteina.

Per la proteina **DmDIC3-V5-His** il risultato del time-course (Fig. 30) valutato per l'omoscambio $\text{Pi}/^{33}\text{Pi}$ ha dimostrato che il *carrier* segue una cinetica del primo ordine con un valore di k di $0,38 \text{ min}^{-1}$ e un valore massimo di quantità di substrato entrato all'equilibrio e a tempo infinito pari a $164,51 \text{ } \mu\text{mol/mg}$ proteina. La velocità iniziale di ingresso di fosfato, misurata come prodotto della k per la quantità massima di substrato entrato all'equilibrio, è di $62,51 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$ proteina. Gli esperimenti di time-course (Fig. 31) condotti su **DmDIC4-V5-His**, mostrano che il *carrier* segue una cinetica di primo ordine in entrambi gli omosambi con una fase lineare per il trasporto malato/ ^{14}C malato di 40 secondi. In questo caso i dati relativi alla k alla quantità massima di substrato in ingresso all'infinito e la velocità iniziale non sono state determinate in quanto non siamo ancora in possesso dei dati relativi alla quantità di proteina che si incorpora nei liposomi.

La prova successiva è stata quindi la determinazione delle V_{max} e delle K_{m} .

Per **DmDIC1-V5-His**, la K_{m} per il malato e per il fosfato da noi misurate sono rispettivamente di $0,817 \pm 0,12 \text{ mM}$ e di $2,352 \pm 0,2 \text{ mM}$. Il valore della V_{max} per il malato e per il fosfato è stato di $64 \pm 0,133 \text{ } \mu\text{moli fosfato min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ (Fig. 32-33).

Per **DmDIC3-V5-His**, la K_{m} per il fosfato da noi misurata è di $3,2 \pm 0,3 \text{ mM}$. Il valore della V_{max} per il fosfato è di $253 \pm 0,124 \text{ } \mu\text{moli fosfato min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ (Fig. 34).

Gli studi di caratterizzazione cinetica sulla proteina ricombinante **DmDIC4-V5-His** sono in corso di svolgimento.

Lo studio della specificità di substrato che **DmDIC1-V5-His** è in grado di trasportare con alta efficienza: malato, fosfato e malonato, e con minore efficienza solfato succinato, acido maleico ossalacetato e tiosolfato, mentre **DmDIC3-V5-His** è in grado di trasportare ad alta efficienza solo fosfato e solfato e con minore efficienza tiosolfato (*Risultati e Discussioni Tab IX*). Stessa sensibilità agli inibitori è stata osservata per **DmDIC1-V5-His** e **DmDIC3-V5-His** (*Risultati e Discussioni Tab X*).

L'analisi dei risultati da noi ottenuti sembrano indicare un differente ruolo fisiologico per le tre isoforme per le tre isoforme. In particolare e' possibile ipotizzare che *DmDIC1* espressa costitutivamente riveste un ruolo fondamentale in metabolismi quali la gluconeogenesi o la sintesi degli amminoacidi mentre *DmDIC4* potrebbe avere un ruolo anaplerotico, trasportando acidi dicarbossilici all'interno dei mitocondri (in scambio con fosfato o solfato) che sono utilizzati come substrato respiratori durante i profondi cambiamenti morfogenetici che accompagnano il passaggio dallo stadio di pupa a quello di adulto. Un simile ruolo anaplerotico puo' essere ipotizzato per *DmDIC3* ovvero sia utilizzata dall'insetto per introdurre fosfato all'interno dei mitocondri, utile per la sintesi dell'ATP; questa tesi e' avvalorata dall'analisi dei livelli di espressione durante il ciclo vitale, che colloca la proteina nella fase di pupa, stadio nel quale la *D. melanogaster* si prepara ad un profondo cambiamento morfologico (adulto) non senza un grosso dispendio energetico.

BIBLIOGRAFIA

- 1 **Charlotte, J.Avers**, *Biologia Molecolare della cellula Zanichelli*.
- 2 **Reed J.C.** (1997) Cytochrome c: can't live with it – can't live without it. *Cell* 91: 559.
- 3 **Runswick MJ, Walker JE, Bisaccia F, Iacobazi V and Palmieri F.** (1990) Sequence of the bovine 2-oxoglutarate/malate carrier protein: structural relationship to other mitochondrial transport proteins. *Biochemistry* 29 (50): 11033-11040.
- 4 **Dolce V, Messina A, Cambria A, Palmieri F.** Cloning and sequencing of the rat cDNA encoding the mitochondrial 2-oxoglutarate carrier protein. *DNA Seq.* 1994;5(2):103-9.
- 5 **Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, del Arco A, Kobayashi K, Iijima M, Runswick MJ, Walker JE, Saheki T, Satrustegui J, Palmieri F** (2001) Citrin and aralar1 are Ca²⁺-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J* 20:5060–5069
- 6 **Chappell, J. B. and Haarhoff, K. N.** (1967) in *Biochemistry of Mitochondria* (Kaniuga, Z., Slater, E. C. and Wojtczak, L., eds.), p. 75, Academic Press, London
- 7 **Palmieri F.** Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* 1994 Jun 6;346(1):48-54. Review.
- 8 **Palmieri F.** (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* 447:689-709.
- 9 **Lin CS and Klingenberg M.** (1980) Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 133(2): 229-303.
- 10 **Klingenberg M.** The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Oct;1778(10):1978-2021. Epub 2008 May 2. PMID: 18510943 [PubMed - in process]
- 11 **Dolce V, Fiermonte F, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE** (2001) The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in toxicity of nucleoside antivirals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2284–2288
- 12 **Dolce V, Iacobazzi V, Palmieri F, Walker JE.** The sequences of human and bovine genes of the phosphate carrier from mitochondria contain evidence of alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* 1994 Apr 8;269(14):10451-60.
- 13 **Fiermonte G, Dolce V, Palmieri F.** Expression in *Escherichia coli*, functional characterization, and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria. *J Biol Chem.* 1998 Aug 28;273(35):22782-7. PMID: 9712911 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 14 **Carrisi C, Madeo M, Morciano P, Dolce V, Cenci G, Cappello AR, Mazzeo G, Iacopetta D, Capobianco L.** Identification of the *Drosophila melanogaster* Mitochondrial Citrate Carrier: Bacterial Expression, Reconstitution, Functional Characterization and Developmental Distribution. *J Biochem.* 2008 Sep;144(3):389-392. Epub 2008 May 31

- 15 Indiveri C, Iacobazzi V, Giangregorio N, Palmieri F.** (1997) The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem J* 321 (Pt 3):713-9.
- 16 Aquila H, Misra D, Eulitz M, Klingenberg M.** (1982) Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 363:345-349.
- 17 Saraste M., Walker J.E.** (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondria ADP/ATP translocase. *FEBS Lett* 144:250-254.
- 18 Aquila H, Link TA and Klingernberg H.** (1985) The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J* 4 : 2369-2376.
- 19 MJ Runswick, SJ Powell, P Nyren and JE Walker** (1987) Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein. *The EMBO Journal* 6: 1367-1373
- 20 Kaplan RS, Mayor JA, Wood DO.** (1993) The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *J Biol Chem.* 268 (18): 13682-90.
- 21 Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trezeguet V, Lauquin GJ, Brandolin G.** (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426 (6962): 39-44.
- 22 Fiermonte G, Dolce V, Palmieri L, Ventura M, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE** (2001) Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J Biol Chem* 276:8225-8230
- 23 Fiermonte G, De Leonardis F, Todisco S, Palmieri L, Lasorsa FM and Palmieri F** (2004) Identification of the Mitochondrial ATP-Mg/Pi Transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem* 279: 30722-30730.
- 24 Fang-Yuan Lia, Kaisu Nikalib, , Juraj Greganc, Ingo Leibigerd, Barbara Leibigerd, Rudolf Schweyenc, Catharina Larssona and Anu Suomalainenb** Characterization of a novel human putative mitochondrial transporter homologous to the yeast mitochondrial RNA splicing proteins 3 and 4. *FEBS Letters* 494 (2001) 79^84
- 25 Palmieri F, Agrimi G, Blanco E, Castegna A, Di Noia MA, Iacobazzi V, LasorsaFM, Marobbio CM, Palmieri L, Scarcia P, Todisco S, Voza A, Walker J.** Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1249-62. Epub 2006 May 23. Review. PMID: 16844075
- 26 Marobbio CM, Giannuzzi G, Paradies E, Pierri CL, Palmieri F.** {alpha}-Isopropylmalate, a Leucine Biosynthesis Intermediate in Yeast, Is Transported by the Mitochondrial Oxalacetate Carrier. *J Biol Chem.* 2008 Oct 17;283(42):28445-53. Epub 2008 Aug 5.

- 27 C.M.T. Marobbio, M.A. Di Noia, F. Palmieri**, Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization, *Biochem. J.* 393 (2006) 441–446.
- 28 S. Todisco, G Agrimi, A. Castagna, F. Palmieri**, Identificazione of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem.* 281(2006) 1524-1531.
- 29 Nathalie Picault, Michael Hodges, Luigi Palmieri and Ferdinando Palmieri**. The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science* Vol.9 No.3 March 2004
- 30 Palmieri L, Picault N, Arrigoni R, Besin E, Palmieri F, Hodges M**. Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem J.* 2008 Mar 15;410(3):621-9.
- 31 Palmieri L, Arrigoni R, Blanco E, Carrari F, Zanor MI, Studart-Guimaraes C, Fernie AR, Palmieri F**. Molecular identification of an *Arabidopsis* S-adenosylmethionine transporter. Analysis of organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes, and functional characterization. *Plant Physiol.* 2006 Nov;142(3):855-65. Epub 2006 Sep 1. PMID: 16950860
- 32 L. Palmieri, A. Santoro, F. Carrari, E. Blanco, A. Nunes-Nesi, R. Arrigoni, F. Genchi, Alisdair R. Fernie, and F. Palmieri** Identification and Characterisation of ADNT1, a Novel Mitochondrial Adenine Nucleotide Transporter from *Arabidopsis* *PLANTPHYSIOL.*, in press
- 33 Ferdinando Palmieri.** (2008) Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777:564–578
- 34 Huizing M, Ruitenbeek W, van den Heuvel LP, Dolce V, Iacobazzi V, Smeitink JA, Palmieri F, Trijbels JM.** Human mitochondrial transmembrane metabolite carriers: tissue distribution and its implication for mitochondrial disorders. *J Bioenerg Biomembr.* 1998 Jun;30(3):277-84. PMID: 9733094]
- 35 L. Palmieri, S. Alberio, I. Pisano, T. Lodi, M. Meznaric Petrusa, J. Zidar, A. Santoro, P. Scarcia, F. Fontanesi, E. Lamantea, I. Ferrero, M. Zeviani**, Complete loss-of-function of the heart-/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 3079–3088.
- 36 J.A. Mayr, O. Merkel, S.D. Kohlwein, B.R. Gebhardt, H. Böhles, U. Fötschl, J. Koch, M. Jaksch, H. Lochmuller, R. Horváth, P. Freisinger, W. Sperl**, Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation, *Am. J. Hum. Genet.* 80 (2007) 478–484.
- 37 J. Kaukonen, J.K. Juselius, V. Tiranti, A. Kyttälä, M. Zeviani, G.P. Comi, S. Keränen, L. Peltonen, A. Suomalainen**, Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance, *Science* 289 (2000) 782–785.
- 38 G. Van Goethem, B. Dermaut, A. Löfgren, J.J. Martin, C. Van Broeckhoven**, Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions, *Nat. Genet.* 28 (2001) 211–212.

- 39 J.N. Spelbrink, F.Y. Li, V. Tiranti, K. Nikali, Q.P. Yuan, M. Tariq, S. Wanrooij, N. Garrido, G. Comi, L. Morandi, L. Santoro, A. Toscano, G.M. Fabrizi, H. Somer, R. Croxen, D. Beeson, J. Poulton, A. Suomalainen, H.T. Jacobs, M. Zeviani, C. Larsson, Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria, *Nat. Genet.* 28 (2001) 223–231.
- 40 M. Huizing, V. Iacobazzi, L. Ijlst, P. Savelkoul, W. Ruitenbeek, L.P. van den Heuvel, C. Indiveri, J. Smeitink, F.J.M. Trijbels, R.J.A. Wanders, F. Palmieri, Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA, and identification of the molecular defect in a patient, *Am. J. Hum. Genet.* 61 (1997) 1239–1245.
- 41 C.A. Stanley, D.E. Hale, G.T. Berry, S. Deleuw, J. Boxer, J.P. Bonnefont, Brief report: a deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane, *New Engl. J. Med.* 327 (1992) 19–23.
- 42 Fiermonte G, Dolce V, David L, Santorelli FM, Dionisi-Vici C, Palmieri F, Walker JE (2003) The mitochondrial ornithine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* 278:32778–32783
- 43 S. Salvi, F.M. Santorelli, E. Bertini, R. Boldrini, C. Meli, A. Donati, A.B. Burlina, C. Rizzo, M. Di Capua, G. Fariello, C. Dionisi-Vici, Clinical and molecular findings in hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria syndrome, *Neurology* 57 (2001) 911–914
- 44 K. Kobayashi, N. Shaheen, R. Kumashiro, K. Tanikawa, W.E. O'Brien, A.L. Beaudet, T. Saheki, A search for the primary abnormality in adult-onset type II citrullinemia, *Am. J. Hum. Genet.* 53 (1993) 1024–1030.
- 45 T. Ohura, K. Kobayashi, Y. Tazawa, I. Nishi, D. Abukawa, O. Sakamoto, K. Iinuma, T. Saheki, Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia, *Hum. Genet.* 108 (2001) 87–90.
- 46 R.I. Kelley, D. Robinson, E.G. Puffenberger, K.A. Strauss, D.H. Morton, Amish lethal microcephaly: a new metabolic disorder with severe congenital microcephaly and 2-ketoglutaric aciduria, *Am. J. Med. Genet.* 112 (2002) 318–326.
- 47 M.J. Rosenberg, R. Agarwala, G. Bouffard, J. Davis, G. Fiermonte, M.S. Hilliard, T. Koch, L.M. Kalikin, I. Makalowska, D.H. Morton, E.M. Petty, J.L. Weber, F. Palmieri, R.I. Kelley, A.A. Schäffer, L.G. Biesecker, Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly, *Nat. Genet.* 32 (2002) 175–179.
- 48 M.J. Lindhurst, G. Fiermonte, S. Song, E. Struys, F. De Leonardis, P.L. Schwartzberg, A. Chen, A. Castegna, N. Verhoeven, C.K. Mathews, F. Palmieri, L.G. Biesecker, Knockout of *Slc25a19* causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 15927–15932.
- 49 Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE (2002) Identification of the mitochondrial glutamate transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* 277:19289–19294

- 50 F. Molinari, A. Raas-Rothschild, M. Rio, G. Fiermonte, F. Encha-Razavi, L. Palmieri, F. Palmieri, Z. Ben-Neriah, N. Khadom, M. Vekemans, T. Attié-Bitach, A. Munnich, P. Rustin, L. Colleaux, Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 334–339.**
- 51 D.A. Berkich, M.S. Ola, J. Cole, A.J. Sweatt, S.M. Hutson, K.F. LaNoue, Mitochondrial transport proteins of the brain, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 3367–3377.**
- 52 M. Ramos, A. del Arco, B. Pardo, A. Martínez-Serrano, J.R. Martínez-Morales, K. Kobayashi, T. Yasuda, E. Bogóñez, P. Bovolenta, T. Saheki, J. Satrústegui, Developmental changes in the Ca²⁺-regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 143 (2003) 33–46.**
- 53 L. Palmieri, V. Papaleo, V. Porcelli, P. Scarcia, L. Gaita, R. Sacco, J. Hager, F. Rousseau, P. Curatolo, B. Manzi, R. Militerni, C. Bravaccio, S. Trillo, C. Schneider, R. Melmed, M. Elia, C. Lenti, M. Saccani, T. Pascucci, S. Puglisi-Allegra, K.-L. Reichelt and A. M. Persico. Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Molecular Psychiatry* advance online publication 8 July 2008; doi: 10.1038/mp.2008.63**
- 54 American Psychiatric Association. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Washington D.C., 1994.**
- 55 Gervais H, Belin P, Boddaert N, Leboyer M, Coez A, Sfaello I, Barthelemy C, Brunelle F, Samson Y, Zilbovicius M. *Nat Neurosci* 7, 801-802, 2004**
- 56 Persico A.M., Bourgeron T. *Trends Neurosci* 29, 349-358, 2006**
- 57 Garbett KA, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, Persico AM. *Neurobiol Dis* 2008, in press**
- 58 Fiermonte G, Palmieri L, Dolce V, Lasorsa FM, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE (1998) The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 273:24754–24759**
- 59 Indiveri C, Prezioso G, Dierks T, Krämer R, Palmieri F. Kinetic characterization of the reconstituted dicarboxylate carrier from mitochondria: a four-binding-site sequential transport system. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Jul 26;1143(3):310-8. PMID: 8329439].**
- 60 Fiermonte G, Dolce V., Arrigoni R., Runswick M.J., Walker J.E. and Palmieri F. Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem. J.* (1999) 344, 953-960.**
- 61 Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. (1996) *Genetica: Principi di analisi formale*, (Zanichelli eds), 65-67.**
- 62 Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster* (2001) *Genome Res.*, 11, 1114-1125.**

- 63 Bridges EG, Jiang Z, and Cheng Y.** (1999) Characterization of a dCTP transport activity reconstituted from human mitochondria. *J Biol Chem* 274: 4620-4625.
- 64 McKee EE, Bentley AT, Smith RM Jr, Kraas JR, Ciaccio CE.** (2000) Guanine nucleotide transport by atractyloside-sensitive and -insensitive carriers in isolated heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(6):C1870-9.
- 65 Jimenez A, Pubill D, Pallas M, Camins A, Llado S, Camarasa J, Escubedo E.** (2000) Further characterization of an adenosine transport system in the mitochondrial fraction of rat testis. *Eur J Pharmacol.* Jun 9;398(1):31-9.
- 66 Hagen T, Joyal JL, Henke W, Aprille JR.** (1993) Net adenine nucleotide transport in rat kidney mitochondria. *Arch Biochem Biophys.*303 (2): 195-207.
- 67 Vozza A, Blanco E, Palmieri L, Palmieri F.** (2004) Identification of the mitochondrial GTP/GDP transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*279 (20): 20850-7.
- 68 Fridel Y.W., Sánchez-Blanco A., Silvia B.A., Helfand S.L.,** Targeted expression of the human uncoupling protein 2 (hUCP2) to adult neurons extends life span in the fly. *J. Bioenerg Biomembr.* 2004 Jun, 36 (3):219-28.
- 69 Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ.** The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content, *Biochem J.* 2005 Dec 1; 392 (Ptz): 353-62.
- 70 Mullis,K.B. and Faloona, F.A.** (1987) *Methods in Enzymol* 155, 355-350
- 71 Maniatis, T., Fristh, E.F. and Sambrook, J.** (1982) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (Cold spring Harbor laboratory)
- 72 Laemmli, U.K.** (1970) *Nature* 227,680-685
- 73 Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F. and Iacobazzi, V.** (1995) *Methods Enzymol.* 260, 349-369
- 74 Luigi Palmieri, Nathalie Picault, Roberto Arrigoni, Evelyne Besin, Ferdinando Palmieri and Michael Hodges.** (2007) Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochemical Journal Immediate Publication.* Published on 26 Nov 2007 as manuscript BJ20070867.

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI

IJB

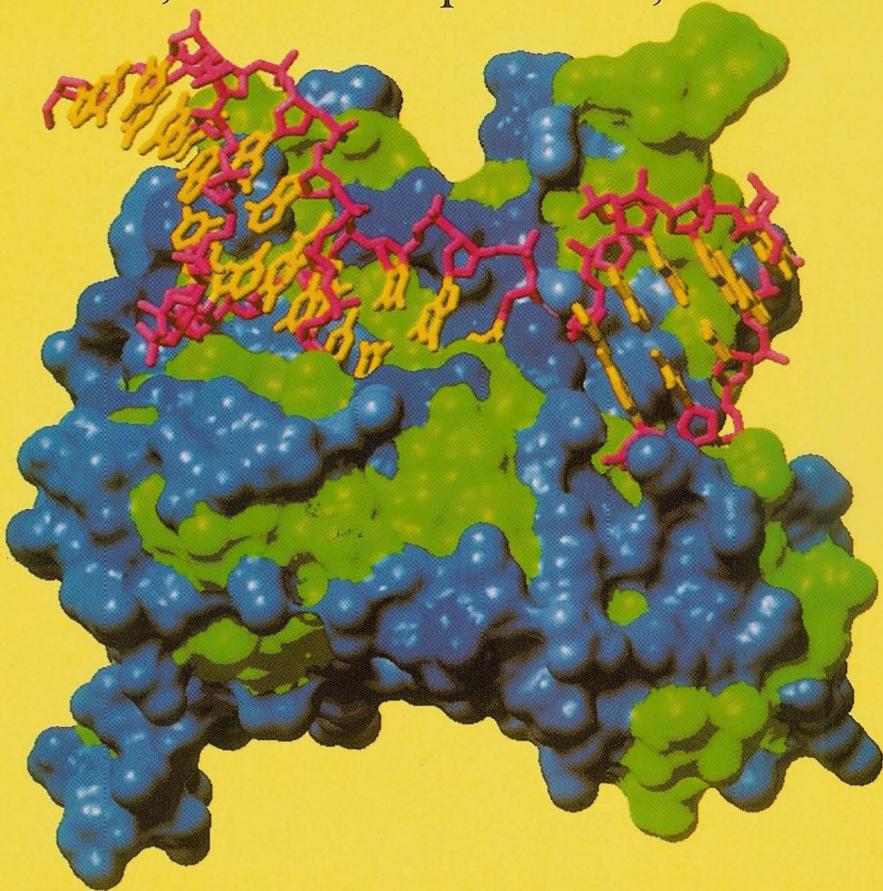
*the Italian Journal
of Biochemistry*

Vol. 56 n. 3 September 2007

Special Issue:

SIB 2007

Riccione, 26 - 28 September, 2007



12.09

HOMOLOGOUS EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION STUDIES ON TRANSPORTER BELONGING TO NEW FAMILY OF YEAST PROTEINS MEDIATING BIDIRECTIONAL VACUOLAR AMINO ACID TRANSPORT

D. Iacopetta¹, C. Carrisi², M. Madeo¹, G. Mazzeo¹, A. R. Cappello¹, L. Capobianco², L. Dini², V. and Dolce¹

¹Dip. Farmaco Biologico, Università della Calabria, Italy

²Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università del Salento, Italy

Introduction. The vacuole of *S.cerevisiae* is involved in enzymatic degradation of proteins and homeostatic control of solutes as ions and amino acids. This organelle support many carrier-mediated transport systems. Several amino acid transport systems have been described in purified vacuoles but the responsible proteins have yet to be identified. Sequence analysis of the *S.cerevisiae* genome has predicted 7 yeast proteins (AVT1-7) related to the neuronal GABA-glycine vesicular transporters (1). AVT1-3-4-7 mediate amino acid transport in vacuoles; no vacuolar amino acid transport role is assigned to proteins AVT2-5-7. Aims of this work are the AVT2p overexpression in *S.cerevisiae* and its subcellular localization, since preliminary data showed that this protein probably localizes to endoplasmic reticulum (1).

Methods. In order to express AVT2p, the ORF (YEL064C) was amplified by PCR from *S.cerevisiae* genomic DNA. A his-tag useful for the successive purification was added at the coding sequences of protein. The resulting cDNA was cloned into the pYES vector behind the inducible Gal-Cyc promoter and overexpressed in *avt2Δ* yeast strains. This cDNA devoid of his-tag was cloned into the pUG35 vector in frame with the yEGFP. The GFP fusion construct obtained was used for intracellular localization study.

Results. His-tagged AVT2p was overexpressed in *avt2* yeast strains and purified by Ni+agarose chromatography. The purified protein had an apparent molecular mass of about 53 kDa. The electron microscopy analysis demonstrated that the overproduction of AVT2p, in yeast cell, does not determine morphological modifications on the structure of intracellular membranes.

AVT2p-GFP expressing cells showed a green fluorescence of the vacuolar network. With the vacuole specific dye, FM 4-64, the same cell showed a pattern of fluorescence coinciding with the vacuole. The overlapping images confirmed the vacuolar localization of AVT2p. Fluorescent DNA stain (DAPI) experiments showed no stacks of paired membranes closely associated with the nuclear envelope (karmellae).

Conclusions. Our results asses the AVT2p localization. Moreover the overexpressed and purified protein will be used to further functional characterization.

References

1. Russnak, R. et al. (2001) *J. Biol Chem* 276,23849-23857

12.10

IDENTIFICATION OF THE MITOCHONDRIAL NAD⁺ TRANSPORTER IN *Saccharomyces cerevisiae*

S. Todisco¹, G. Agrimi¹, A. Castegna¹, F. Palmieri¹

¹Dept. of Pharmaco-Biology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bari, Bari, Italy

The *S. cerevisiae* gene products YIL006W and YEL006W, now called Ndt1p and Ndt2p, display a high degree (70%) of homology and possess the characteristic features of the mitochondrial carrier family (1). However, their function is not known yet. Ndt1p and Ndt2p were overexpressed in *E. coli*, purified and reconstituted in phospholipids vesicles to measure their transport properties. Strains lacking Ndt1p and Ndt2p (or one of these proteins) were tested for their growth rate on non-fermentable carbon sources. The mitochondrial extracts were submitted to mass spectrometry analysis to evaluate the NAD⁺ and NADH levels and used to determine the activity of the mitochondrial enzymes PDH and ACDH. GFP-Ndt1p and GFP-Ndt2p were used to establish their subcellular localization.

The reconstituted Ndt1p catalyzed the uptake of NAD⁺ into liposomes with high substrate specificity. Yeast strain lacking Ndt1p had reduced levels of mitochondrial NAD⁺ and NADH and reduced activity of the mitochondrial NAD⁺-requiring enzymes PDH and ACDH compared to the wild type strain. The knock-out of YEL006W (*ndt2Δ*) exhibited the same results. The double deletant strain (*ndt1Δndt2Δ*) showed a more pronounced decrease in NAD⁺ and NADH levels in mitochondria and a delayed growth on non-fermentable carbon sources compared to the wild type and the single deletant strains. Subcellular localization studies through GFP-tagging confirmed that both the gene products are targeted to mitochondria. Ndt2p expressed in *E. coli* was inactive upon reconstitution into liposomes. The activities of the two NAD⁺-synthesizing enzymes, NAD⁺ synthetase and NAMN/NMN adenyltransferase, were confirmed to be absent in the mitochondria.

Taken together, these data demonstrate that Ndt1p and its isoform Ndt2p are mitochondrial carriers responsible for the uptake of NAD⁺ into mitochondria.

Reference

1. F. Palmieri., G. Agrimi, E. Blanco, A. Castegna, M.A. Di Noia, V. Iacobazzi, F.M. Lasorsa, C.M. Marobbio, L. Palmieri, P. Scarcia, S. Todisco, A. Voza, J. Walker (2006) Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757, 1249-1262.

14.21

STRUCTURE, EXPRESSION IN Baculovirus SYSTEM, TISSUE DISTRIBUTION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF A PUTATIVE HUMAN PROTON-COUPLED AMINO ACID TRANSPORTER (hPAT4)

D. Iacopetta¹, M. Madeo¹, C. Carrisi², G. Mazzeo¹, L. Capobianco², A. R. Cappello¹, C. Bucci², V. and Dolce¹

¹Dip. Farmaco Biologico, Università della Calabria, Italy

²Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università del Salento, Italy

Introduction. The amino acid/auxin permease (AAAP) family is one of the largest families of amino acid transporters identified so far. Three different subfamilies of the AAAP transporters have been identified in mammals; the third mammalian AAAP subfamily is represented by the PAT1 to PAT4 (1). PAT3 and PAT4 are orphan transporters, whereas PAT1 and PAT2 are characterized as electrogenic amino acid/proton cotransporters. In this report the structural features of human PAT4 cDNA, the organization of pat4 gene, the mRNA tissue distribution and the protein subcellular localization were investigated. Moreover, the hPAT4 cDNA was over-expressed in baculovirus infected Sf9 cells and the recombinant protein was purified.

Materials and methods. The coding region for the hPAT4 was amplified from human kidney cDNA by PCR, cloned into the pBlueBac 4.5/his baculo transfer vector, over-expressed in Sf9 cells and purified by affinity chromatography. The tissue distribution of PAT family was performed by RT-PCR analysis. The subcellular localization was investigated by using Western blot analysis.

Results. The hPAT4 cDNA is 2493bp long (NM_152313) with a 1515bp ORF coding for a protein of 504 amino acids. The gene, consisting of at least 11 exons, is located on chromosome 11q2. The tissue distribution of mRNAs for PAT1-4 showed that PAT1 gene is expressed ubiquitously but in very abundant amounts in kidney, small intestine, spleen and brain; the PAT2 gene is expressed only in heart, kidney and skeletal muscle; the PAT3 gene is expressed in very low amount only in testis; the PAT4 is expressed ubiquitously but in very abundant amounts in kidney and brain. A Western blot analysis conducted on Percoll-density gradient fractions, showed a lysosomal localization of the PAT4 protein. The hPAT4 recombinant protein over-expressed in baculovirus infected Sf9 cells was purified, the purified protein was homogeneous with an apparent molecular weight of 59 kDa.

Conclusions. Our preliminary results showed that PAT4 is a lysosomal transporter protein expressed prevalently in brain and kidney. Currently, in order to understanding its metabolic role are in progress study of functionally characterization.

1. Boll M. et al. (2004) *Plugers Arch.*, 447.776-779.

14.22

THE DIFFERENTIAL BIOCHEMICAL PROPERTIES OF NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE ADENYLYL - TRANSFERASE ISOZYMES ENABLE TO DETERMINE THEIR RELATIVE EXPRESSION LEVELS

S. Scotti¹, M. Di Stefano¹, F. Cimadamore¹, L. Sorci¹, F. Mazzola¹, G. Magni¹

¹Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

Background. Nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase (NMNAT) activity catalyzes the final step of NAD⁺ biosynthesis. In humans, three isozymes differing for the oligomeric state, subcellular localization and catalytic properties have been identified and characterized: NMNAT1 is hexameric and is localized in the nucleus, NMNAT2 is a golgian monomeric protein, while NMNAT3 is tetrameric and mitochondrial. To date, there is no information on the relative contribution of NMNAT isozymes to NAD⁺ formation. We recognized, however, that these isozymes might be discriminated in experiments based on their distinctive substrate utilization and sensitivity to different metal ions (1).

Objective. We developed an unambiguous biochemical assay that allowed us to discriminate the activity of the three isozymes and to determine their relative amounts in cell line and tissue extracts.

Methods. NMNAT activity was measured by a HPLC-based assay in the presence of different metal ions as well of alternative substrates.

The isozyme specific mRNA levels were determined by RT real-time PCR.

Results. Discrimination between recombinant purified NMNAT1 and NMNAT2 has been achieved on the basis of their different sensitivity to ZnCl₂ and MgCl₂, whereas the mitochondrial isozyme is unique in that it is also able to use ITP as substrate.

We next demonstrated that this approach was valid for discriminating the amounts of the three isozymes in different cell extracts, in which they are not simultaneously present and do not contribute equally to NAD⁺ formation. For example, while NMNAT1 is ubiquitously expressed, NMNAT2 predominates in brain and NMNAT3 is present in liver.

The mRNA expression profiles validate our protocol, in that in the cell lines and tissues analyzed the distinctive presence or absence of each isozymes perfectly matched.

Conclusions. To our knowledge this is the first report on the development of a protocol aiming at the identification of the specific contribution to NAD⁺ biosynthesis of NMNAT isozymes in the cell.

References

1. Sorci L, Cimadamore F, Scotti S, Petrelli R, Cappellacci L, Franchetti P, Orsomando G and Magni G. *Biochemistry* 2007;46:4912-4922.

PUBBLICAZIONI

Identification of the *Drosophila melanogaster* Mitochondrial Citrate Carrier: Bacterial Expression, Reconstitution, Functional Characterization and Developmental Distribution

Chiara Carrisi^{1,†}, Marianna Madeo^{1,2,†}, Patrizia Morciano³, Vincenza Dolce², Giovanni Cenci³, Anna Rita Cappello², Giancarlo Mazzeo², Domenico Iacopetta² and Loredana Capobianco^{1,*}

¹Department of Biological and Environmental Sciences and Technologies, University of Salento, Lecce, Italy;

²Department of Pharmaco-Biology, University of Calabria, Arcavacata di Rende, Cosenza, Italy; and

³Department of Basic and Applied Biology, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy

Received May 9, 2008; accepted May 27, 2008; published online May 31, 2008

The mitochondrial carriers are a family of transport proteins that shuttle metabolites, nucleotides and cofactors across the inner mitochondrial membrane. The genome of *Drosophila melanogaster* encodes at least 46 members of this family. Only four of them have been characterized: the two isoforms of the ADP/ATP translocase, the brain uncoupling protein and the carnitine/acylcarnitine carriers. The transport functions of the remainders cannot be assessed with certainty. One of them, the product of the gene CG6782, shows a fairly close sequence homology to the known sequence of the rat mitochondrial citrate carrier. In this article the fruit fly protein coding by the CG6782 gene has been functionally characterized by over-expression in *Escherichia coli* and reconstitution into liposomes. It shows to have similar transport properties of the eukaryotic mitochondrial citrate carriers previously biochemically characterized. This indicates that in addition to the protein sequence conservation, insect and mammalian citrate carriers are also significantly related at the functional level suggesting that *Drosophila* may be used as model organism for the study of mitochondrial solute transporter. The *DmCIC* expression pattern throughout development was also investigated; the transcripts were detected at equal levels in all stages analysed.

Key words: citrate carrier, *Drosophila melanogaster*, metabolite transporter, mitochondria, transport.

Abbreviations: BAT, Bathophenanthroline; BTA, benzenetricarboxylic acid; *DmCIC*, *Drosophila melanogaster* citrate carrier; PIPES, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; PLP, Pyridoxal 5'-phosphate; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

The tricarboxylate (or citrate) carrier (CIC) is a transport protein of the inner mitochondrial membrane, which belongs to the mitochondrial carrier family [for review see (1)]. The CIC catalyses the transport of citrate in exchange for a tricarboxylate, a dicarboxylate (L-malate) or phosphoenolpyruvate (2–4). This carrier protein plays a central role in intermediary metabolism because it supplies the cytosol with acetyl units (deriving from the transported citrate) necessary for the de novo fatty acid and cholesterol biosyntheses (5). The CIC has been kinetically characterized in eukaryotes (6–8) and its primary structure has been determined (7, 9–11). However, the functional characterization of this particular mitochondrial solute carrier in model organisms is still missing.

In this study, we have examined the proteins encoded on the genome of *Drosophila melanogaster* for members of the mitochondrial carrier family, and we have

identified 46 members (data not shown). One of them, encoded by gene CG6782 (<http://www.flybase.org>), displays a high identity (*i.e.* 62%) to the rat citrate carrier protein. We therefore have expressed and characterized the protein encoded by this sequence, afterwards named *DmCIC*. In the present article, we report (i) the expression and purification of large quantities of the fruit fly *DmCIC*, (ii) the functional characterization of the over-expressed *DmCIC* following its incorporation into liposomes and (iii) an expression profile of *DmCIC* by RT-PCR analysis in different developmental stages. To our knowledge, this report presents the first information on the molecular properties of the fruit fly *DmCIC* and a definitive identification of its gene.

MATERIALS AND METHODS

Computer Search for *DmCIC*—The proteins annotated in the FlyBase were compared with the rat sequence of the mitochondrial citrate carrier (P32089) with the aid of the program blastp.

Construction of the Expression Plasmid Coding for Mature *DmCIC*—Total RNA was extracted from Oregon

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +39(0)832298864, Fax: +39(0)832298626,

E-mail: loredana.capobianco@unile.it

†These two authors contributed equally to this work.

R adult flies using RNeasy Mini Kit (Quiagen) and reverse transcribed as described in (12). The mature coding region for the *DmCIC* was amplified from first strand cDNA (100 ng) by polymerase chain reaction with nucleotides 164–180 and 1011–1036 of the fruit fly transcript CG6782-RA. The product was cloned into the NdeI-HindIII sites of the expression vector pET-21b that it had been previously modified by cloning into HindIII-XhoI sites a cDNA sequence coding for a V5 epitope followed by six histidines (pET-21b/V5/His). Transformants of *Escherichia coli* TG1 cells were selected and screened. The absence of the stop codon in the reverse primer sequence led to the expression of the *DmCIC* with carboxy-terminal V5- and His6-epitope tag. The *DmCIC* protein was overexpressed in *E. coli* in BL21 (DE3). Inclusion bodies were isolated and *DmCIC* was purified by centrifugation and Ni⁺-NTA-agarose affinity chromatography as described (13).

Reconstitution into Liposomes and Transport Assays—The recombinant protein in sarkosyl was reconstituted into liposomes in the presence of substrates as described (14). External substrate was removed on Sephadex G-75. Transport at 25°C was started by adding [¹⁴C]citrate (from Amersham) to proteoliposomes and terminated by addition of 20 mM 1,2,3-BTA. In controls, inhibitor was added with the labelled substrate. All transport measurements were carried out at the same internal and external pH values (PIPES 10 mM, pH 7.0). Finally, the external substrate was removed, and the radioactivity in the liposomes was measured (14).

RNA Isolation and Semiquantitative RT-PCR—Total RNA was isolated from wild-type Oregon R embryos, larvae, pupae and adult flies using RNeasy Mini Kit (Qiagen). Fifty nanograms of RNA were reverse transcribed and amplified using Access RT-PCR System kit (Promega). The *twinstar* (*tsr*) gene was used as an internal control. The sense and antisense gene-specific primers were as follows: *DmCIC*, sense CTGTCCCATCGCCACTTCA, anti sense CTATAGCCACTTACCCATTGC; *tsr*, sense TTGTTTCGTGA AA, antisense ATACGTGTTTCC. The PCR products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis. Band intensities were quantified using Quantity One 1-D Analysis Software (Biorad, Hercules, CA).

Other Methods—Proteins were analysed by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue dye or transferred to nitrocellulose membranes. The amount of pure *DmCIC* was estimated by laser densitometry of stained samples using carbonic anhydrase as a protein standard. The amount of protein incorporated into liposomes was measured as described previously (12). Western blotting was carried out with mouse anti-V5 monoclonal antibody as described previously (15).

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial Expression of Recombinant *DmCIC*—By screening *Drosophila melanogaster* non-redundant databases with the rat CIC (P32089), a gene CG6782 encoding for the putative fruit fly citrate carrier, *DmCIC*, was found.

The multiple clustalW alignment (data not shown) of the the *DmCIC* with mature citrate carrier of rat and silver eel, which N-terminal sequences were determined

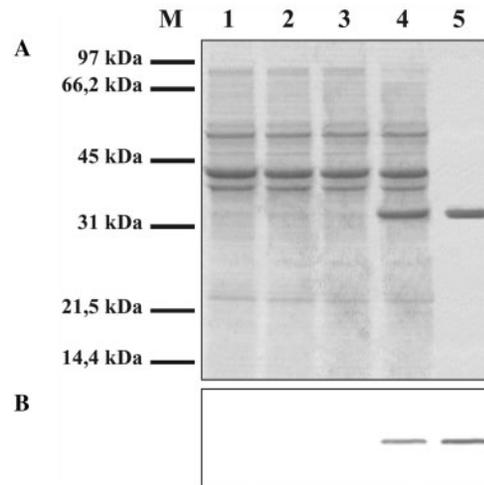


Fig. 1. Expression in *E. coli* and purification of the *DmCIC*. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie-blue dye (A) or transferred to nitrocellulose and immunodecorated with mouse anti-V5 monoclonal antibody (B). Lanes M, markers (Phosphorylase b, Serum albumin, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, Trypsin inhibitor and Lysozyme); lanes 1–4, *E. coli* BL21(DE3) containing the expression vector, without (Panels A and B, lanes 1 and 3) and with the coding sequence for *DmCIC* (Panels A and B, lanes 2 and 4). Samples were taken at the time of induction (lanes 1 and 2) and 4 h later (lanes 3 and 4). The same number of bacteria was analysed in each sample. Lane 5, purified *DmCIC* (5 micrograms) originating from bacteria shown in lane 4.

by direct sequence of purified native proteins (9, 11), shows that the mature *DmCIC* starts with residues ADSG, indicating that fruit fly *DmCIC* is processed between residues 26 and 27.

The mature *DmCIC* was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) at high levels (see Fig. 1A, lane 4). The protein was not detected in bacteria harvested immediately before induction of expression (Fig. 1A, lanes 1 and 2), nor in cells harvested after induction and transformed with empty vector (Fig. 1A, lane 3). The purified protein showed a single band when analysed by SDS-PAGE (Fig. 1A, lane 5), with an apparent molecular mass of about 33 kDa. Its identity was confirmed by western blot analysis using mouse anti-V5 monoclonal antibody (Fig. 1B, lanes 4 and 5).

Functional Characterization of *DmCIC*—The *DmCIC* recombinant protein was reconstituted into liposomes and the uptake of 1 mM [¹⁴C]citrate was measured either as uniport (in the absence of internal citrate) or as exchange (in the presence of 20 mM citrate). The uptake of citrate by exchange followed a first order kinetics (rate constant 0.147/min; initial rate, 9.25 μmol/min/mg of protein) with isotopic equilibrium being approached exponentially (14). In contrast, no [¹⁴C]citrate uptake was observed without internal substrate, demonstrating that *DmCIC* does not catalyse unidirectional transport (uniport) but only an exchange of substrates (data not shown). The exchange reaction was completely inhibited by 1,2,3-BTA. If the solubilized protein was boiled before the incorporation into liposomes no uptake of labelled external substrate into proteoliposomes was observed.

Similarly, no citrate/citrate exchange was detected when sarkosyl-solubilized material from bacterial cells, either lacking the expression vector for *DmCIC* or harvested immediately before induction of expression, was reconstituted into liposomes. Furthermore, the proteoliposomes did not catalyse homoexchange activities for phosphate, glutamate, aspartate, ornithine, ADP and ATP (internal concentration, 20 mM; external concentration, 1 mM).

The substrate specificity of recombinant *DmCIC* was extensively investigated by measuring the uptake of [¹⁴C]citrate into proteoliposomes preloaded with various substrates. As shown in Fig. 2, the highest activities were observed in the presence of internal *cis*-aconitate, threo-isocitrate, phosphoenolpyruvate and L-malate. Some activity was also observed with succinate. Furthermore, no significant exchange activity was found using *trans*-aconitate, or substrates of other mitochondrial carriers, like phosphate, 2-oxoglutarate, glutamate and ATP. These results indicate clearly that radioactive citrate is transported into proteoliposomes containing *DmCIC*, only in exchange for an internal counter-substrate.

The sensitivity of the reconstituted citrate/citrate exchange to externally added inhibitors was investigated (Fig. 3). The 1,2,3-BTA was more effective than its structural isomers 1,2,4-BTA and 1,3,5-BTA. The activity of the recombinant protein was markedly inhibited by PLP and BAT (known inhibitors of several mitochondrial carriers) as well as by thiol reagents (methylmercuric chloride and mercuric chloride), whereas a much higher amount of *N*-ethylmaleimide was required for a partial inhibition. The different inhibitory potency of these SH reagents can be explained, at least in part, by taking into account the microenvironment surrounding the reactive cysteine(s). Therefore, the binding of such reagents with a specific SH-group could be differently affected by amino acid residues surrounding it. *DmCIC* was inhibited slightly by impermeable dicarboxylate analogues butylmalonate and phenylsuccinate, which are known to be powerful inhibitors of the dicarboxylate and oxoglutarate carriers, respectively (2).

The transport characteristics of the recombinant *DmCIC* and the effects of inhibitors on transport are in agreement with those determined for rat and silver eel mitochondrial CIC (3, 8, 16).

The kinetic constants of the recombinant purified CIC were determined by measuring the initial transport rate at various external [¹⁴C]citrate concentrations, in the presence of a constant saturating internal concentration (20 mM) of citrate. The K_m and V_{max} values (measured at 25°C) were $132 \pm 0.8 \mu\text{M}$ and $11.75 \pm 0.133 \mu\text{mol/min/mg protein}$, respectively (four experiments). The activity was calculated by taking into account the amount of CIC recovered in the proteoliposomes after reconstitution. The half-saturation constant of citrate of *DmCIC* is similar than that determined for the tricarboxylate carrier of rat liver (3, 16) while is higher than those determined for yeast and silver eel CIC (7, 8).

From its high sequence identity with rat CIC, transport properties and kinetic characteristics there is no doubt that the fruit fly *DmCIC* is the mitochondrial citrate carrier protein and that the *Drosophila melanogaster*

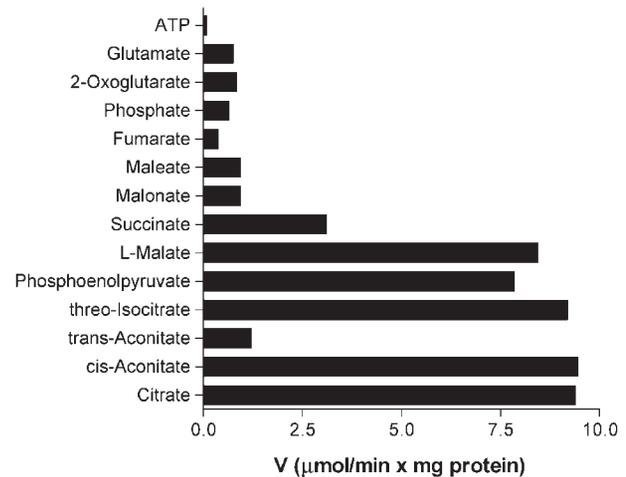


Fig. 2. **Dependence of *DmCIC* activity on internal substrate.** Proteoliposomes were preloaded internally with various substrates (20 mM). Transport was started by adding 150 μM [¹⁴C]citrate to proteoliposomes reconstituted with *DmCIC*, and stopped after 1 min. Similar results were obtained in at least three independent experiments.

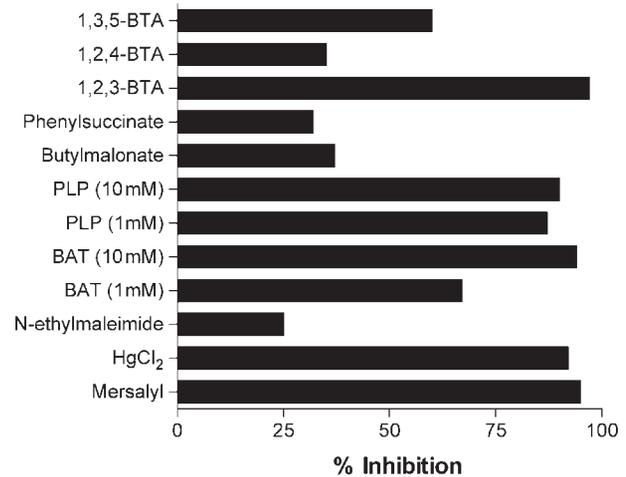


Fig. 3. **Effect of inhibitors on the [¹⁴C]citrate/citrate exchange by *DmCIC*.** Transport was started by adding [¹⁴C]citrate (final concentration 150 μM) to proteoliposomes containing 20 mM citrate. Thiol reagents were added 2 min before the labelled substrate, the other inhibitors together with labelled substrate. The final concentrations of inhibitors were 0.1 mM (methylmercuric chloride, *p*-hydroxymercuribenzoate and HgCl₂), 10 mM (BAT and PLP), 1 mM (BAT, PLP and *N*-ethylmaleimide), 2 mM (1,2,3-BTA; 1,2,4-BTA; 1,3,5-BTA). The control value for uninhibited citrate uptake was 9.455 μmol/min/mg protein. The data represent means of at least four independent experiments.

could be used as model organism for the studies of mitochondrial solute transporters.

RT-PCR—To determine the expression levels of *DmCIC*, we performed a RT-PCR analysis on mRNAs from wild-type embryos, larvae, pupae and adults (Fig. 4). This analysis revealed that *DmCIC* appears to be equally transcribed at each stage suggesting that its expression is required during the fruit fly development.

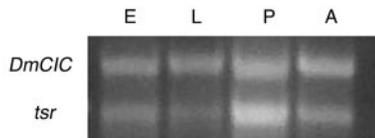


Fig. 4. **Expression of *DmCIC* during development.** RT-PCR for *DmCIC* and *tsr* (internal control) was carried out on RNAs obtained from Oregon R embryos (E), larvae (L), pupae (P) and adults (A). Quantification of 1.3 kb *DmCIC* products relative to *tsr* in each stage has revealed that the levels of *DmCIC* transcripts do not significantly differ during development.

REFERENCES

1. Palmieri, F. (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* **447**, 689–709
2. Palmieri, F., Stipani, I., Quagliariello, E., and Klingenberg, M. (1972) The kinetics of citrate uptake by malate-loaded mitochondria were measured using the inhibitor stop method and analysed for possible carrier mechanisms. *Eur. J. Biochem.* **26**, 587–594
3. Bisaccia, F., De Palma, A., and Palmieri, F. (1989) Identification and purification of the tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 171–176
4. Zara, V., Iacobazzi, V., Siculella, L., Gnoni, G.V., and Palmieri, F. (1996) Purification and characterization of the tricarboxylate carrier from eel liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 508–513
5. Conover, T.E. (1987) Does citrate transport supply both acetyl groups and NADPH for cytoplasmic fatty acid synthesis? *Trends Biochem. Sci.* **12**, 88–89
6. Bisaccia, F., De Palma, A., Prezioso, G., and Palmieri, F. (1990) Kinetic characterization of the reconstituted tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1019**, 250–256
7. Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Gremse, D.A., and Wood, D.O. (1995) High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 4108–4114
8. Zara, V., Palmieri, L., Franco, M.R., Gnoni, G.V., and Palmieri, F. (1998) Kinetics of the reconstituted tricarboxylate carrier from eel liver mitochondria. *J. Bioenerg Biomembr.* **30**, 555–563
9. Kaplan, R.S., Mayor, J.A., and Wood, D.O. (1993) The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 13682–13690
10. Iacobazzi, V., Lauria, G., and Palmieri, F. (1997) Organization and sequence of the human gene for the mitochondrial citrate transport protein. *DNA Seq.* **7**, 127–139
11. Zara, V., Dolce, V., Capobianco, L., Ferramosca, A., Papatheodorou, P., Rassow, J., and Palmieri, F. (2007) Biogenesis of eel liver citrate carrier (CIC): negative charges can substitute for positive charges in the presequence. *J. Mol. Biol.* **365**, 958–967
12. Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., and Palmieri, F. (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett.* **579**, 633–637
13. Dolce, V., Fiermonte, F., Runswick, M.J., Palmieri, F., and Walker, J.E. (2001) The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in toxicity of nucleoside antivirals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 2284–2288
14. Fiermonte, G., Walker, J.E., and Palmieri, F. (1993) Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem. J.* **294**, 293–299
15. Capobianco, L., Bisaccia, F., Michel, A., Sluse, F.E., and Palmieri, F. (1995) The N- and C-termini of the tricarboxylate carrier are exposed to the cytoplasmic side of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.* **357**, 297–300
16. Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Johnston, N., and Oliveira, D.L. (1990) Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**, 13379–13385