

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE

XX CICLO

Studio nel sistema modello *Saccharomyces cerevisiae* di
mutazioni patologiche nel gene POLG codificante la DNA
polimerasi mitocondriale

Coordinatore:

Prof. Nelson Marmiroli

Docenti guida:

Prof.ssa Iliana Ferrero Fortunati

Prof.ssa Tiziana Lodi

Dottorando:

Enrico Baruffini

Queste tenebre, dunque, e questo terrore dell'animo
occorre che non i raggi del sole né i dardi lucenti del giorno
disperdano, bensì la realtà naturale e la scienza.

Tito Lucrezio Caro, *De Rerum Natura* (I, 146-148)

Indice

1. <u>Introduzione</u>	1
1.1 Mitocondri: struttura e funzione	2
1.2 Il DNA mitocondriale	8
1.3 Patologie mitocondriali	18
1.4 DNA polimerasi γ (Pol γ)	24
1.5 Il lievito <i>S. cerevisiae</i> come sistema modello	49
1.6 Geni che influenzano l'accumulo di cloni <i>petite</i>	53
2. <u>Scopo della ricerca</u>	67
3. <u>Materiali e metodi</u>	69
3.1 Ceppi di lievito utilizzati	70
3.2 Ceppi batterici utilizzati	72
3.3 Terreni di crescita	72
3.4 Vettori plasmidici	74
3.5 PCR	76
3.6 Sequenziamento	80
3.7 Manipolazione del DNA	81
3.8 Trasformazioni	82
3.9 Estrazione di DNA	83
3.10 <i>Southern blot</i>	84
3.11 Estrazione di RNA da lievito e <i>Northern blot</i>	84
3.12 Estrazione di proteine da lievito	85
3.13 <i>Western blot</i>	85
3.14 Saggio di <i>gap filling</i>	85
3.15 Analisi fenotipiche	86
3.16 Marcatura dell'mtDNA con DAPI	87
4. <u>Risultati (I parte)</u>	88
4.1 Costruzione di un ceppo $\Delta mip1$ e clonaggio del gene <i>MIP1</i>	89
4.2 Analisi <i>in silico</i> e scelta delle mutazioni	92
4.3 Introduzione delle mutazioni in <i>MIP1</i> e trasformazione di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
4.4 Analisi fenotipica dei ceppi DWM-5A	97
4.5 Studio della dominanza/recessività delle mutazioni G224A e Y757C	101
4.6 <i>Rescue</i> genetico del fenotipo: incremento dei dNTP <i>pool</i>	102
4.7 <i>Rescue</i> chimico del fenotipo: trattamento con l'antiossidante acido diidrolipoico	104
4.8 Discussione	106
5. <u>Risultati (II parte)</u>	111
5.1 Scelta delle mutazioni	112

5.2 Costruzione degli alleli <i>mip1</i> mutati e loro introduzione in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	112
5.3 Effetto delle mutazioni <i>mip1</i>	114
5.4 Determinazione della dominanza/ recessività	115
5.5 Studio dell'associazione di mutazioni <i>in trans</i>	117
5.6 Livelli proteici e attività di proteine Mip1 selvatica e mutate	118
5.7 Discussione	120
6. <u>Risultati (III parte)</u>	124
6.1 <i>Rescue</i> genetico mediante overespressione di geni coinvolti nella riparazione dell'mtDNA	125
6.2 <i>Rescue</i> genetico mediante trattamento con sostanze antiossidanti	133
6.3 Conclusioni e prospettive	136
7. <u>Risultati (IV parte)</u>	140
7.1 Analisi della mutabilità mitocondriale associata all'allele <i>MIP1</i> [S] e all'allele <i>MIP1</i> [Σ]	141
7.2 Confronto <i>in silico</i> fra Mip[Σ] e Mip1[S]	142
7.3 Analisi della mutabilità mitocondriale associata all'allele <i>MIP1</i> [S] ^{A661T}	145
7.4 Dominanza/recessività della mutazione T661A	146
7.5 Efficienza catalitica delle polimerasi Mip1[S], Mip1[Σ] e Mip1[S] ^{A661T}	146
7.6 Analisi del polimorfismo 661 in ceppi naturali	147
7.7 Analisi degli altri SNP di <i>MIP1</i>	149
7.8 Allelismo di <i>MMC1</i> e <i>MIP1</i>	150
7.9 Effetto dell'alanina 661 sullo studio di mutazioni associate a patologie mitocondriali	150
7.10 Discussione	152
8. <u>Note Finali</u>	155
<u>Bibliografia</u>	157
<u>Allegato 1: Pubblicazione su Human Molecular Genetics</u>	167
<u>Allegato 2: Pubblicazione su Biochimica et Biophysica Acta</u>	178
<u>Allegato 3: Pubblicazione su Genetics</u>	190
<u>Allegato 4: Pubblicazione su FEMS Yeast Research</u>	196

1. Introduzione

1.1 Mitochondri: struttura e funzione

I mitocondri sono organelli intracellulari che svolgono un ruolo chiave nel metabolismo energetico della cellula eucariotica, in quanto sede della maggior parte delle reazioni di degradazione ossidativa e della sintesi di adenosina-trifosfato (ATP) mediante fosforilazione ossidativa. Una caratteristica peculiare dei mitocondri consiste nella presenza di un proprio genoma, chiamato DNA mitocondriale, o mtDNA.

I mitocondri sono strutture allungate costituite da un doppio sistema di membrane, la membrana esterna e la membrana interna. Lo spazio compreso fra le due membrane è chiamato spazio intermembrana, mentre lo spazio racchiuso nella membrana interna è chiamato matrice mitocondriale. La membrana interna si ripiega più volte all'interno della matrice, formando strutture che vengono chiamate creste (figura 1.1).

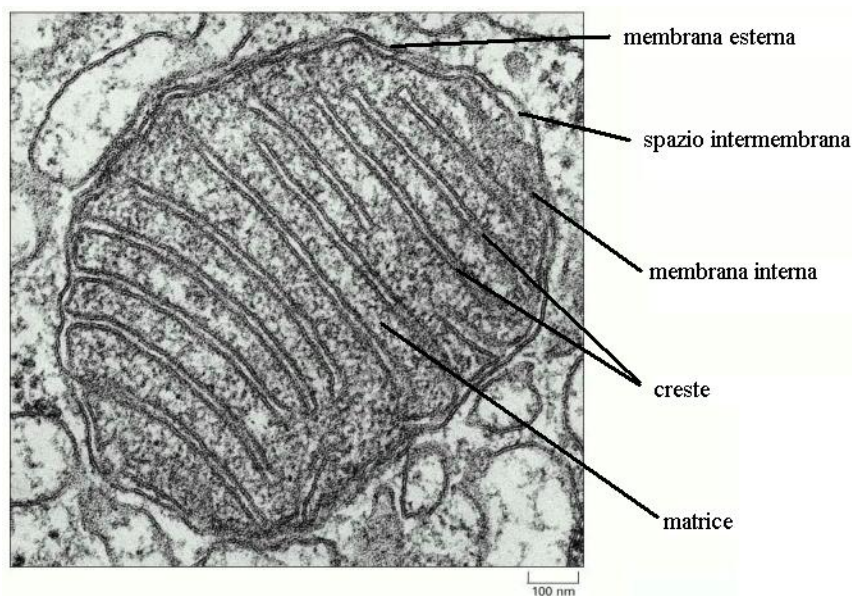


Figura 1. 1: Immagine al microscopio elettronico di un singolo mitocondrio di epatocita.

La membrana mitocondriale esterna ha una composizione simile a quella del reticolo endoplasmatico e in essa sono presenti dei pori proteici con la funzione di facilitare il passaggio di metaboliti con peso molecolare inferiore a 10 KDa. La membrana interna, priva di colesterolo e ricca di un fosfolipide caratteristico, la cardiolipina, ha una permeabilità molto limitata cosicché possono essere trasportate attraverso di essa solo sostanze per cui esistono specifici trasportatori di membrana. Sebbene i mitocondri possano essere isolati ed evidenziati da soli, come nella figura, essi costituiscono, in generale, un *network* dinamico di fissione e fusione simile al reticolo endoplasmatico.

Anche il numero dei mitocondri presenti in una singola cellula è variabile, in modo specie-specifico e, per gli eucarioti superiori, in modo tessuto-specifico; anche la condizione fisiologica in cui si trova la cellula influenza il numero dei mitocondri. Ad esempio nel muscolo e nel fegato dei mammiferi, dove la respirazione cellulare è intensa, sono presenti centinaia o migliaia di mitocondri.

Ogni comparto del mitocondrio svolge un ruolo specifico. In particolare, la degradazione ossidativa del piruvato derivante dalla glicolisi e degli acidi grassi, catalizzata da enzimi solubili, avviene nella matrice, mentre la fosforilazione ossidativa, che utilizza complessi enzimatici transmembrana, avviene attraverso la membrana interna.

1.1.1 Ossidazione del piruvato e degli acidi grassi

Le principali riserve di energia delle cellule sono costituite da zuccheri e da acidi grassi, che, mediante ossidazione ad anidride carbonica, rilasciano questa energia, che a sua volta viene immagazzinata sotto forma di ATP. Gli enzimi che catalizzano la degradazione ossidativa di questi composti sono situati nella matrice mitocondriale.

Per quanto riguarda gli zuccheri, essi vengono dapprima degradati a piruvato mediante glicolisi, i cui enzimi sono situati nel citoplasma. Il piruvato viene quindi importato nel mitocondrio, dove subisce una reazione di decarbossilazione ossidativa, ad acetil-coenzima A (Acetil-CoA) (Ochoa, 1954; Perham, 2000).

Gli acidi grassi, derivanti principalmente dal processo di mobilizzazione dei trigliceridi negli eucarioti superiori, vengono importati nella matrice mitocondriale mediante il sistema di trasporto dell'acilcarnitina. Nella matrice mitocondriale l'acido grasso viene convertito ad acil-coenzima A. Le molecole di acil-coenzima A subiscono il processo della β -ossidazione, costituito da cicli di quattro reazioni al termine di ciascuno dei quali è rilasciato una molecola di acetil-CoA più una molecola di acil-coenzima A con due atomi di carbonio in meno. Mentre negli eucarioti superiori la β -ossidazione avviene prevalentemente nei mitocondri, e nei perossisomi avviene la β -ossidazione degli acidi grassi a lunghissima catena, nel lievito la degradazione degli acidi grassi a gruppo acetile avviene prevalentemente nei perossisomi. Solo successivamente i gruppi acetile vengono trasportati, attraverso il sistema acetilcarnitina, nei mitocondri.

L'acetil-CoA viene successivamente ossidato ad anidride carbonica attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici, o TCA, o ciclo di Krebs (figura 1.2). Il ciclo di Krebs è composto da otto reazioni attraverso le quali da ogni molecola di acetil-CoA, convertita a due molecole di anidride carbonica, si generano una molecola di ATP, tre molecole di NADH e una molecola di FADH₂ (figura 1.2). La maggior parte dell'energia rilasciata viene pertanto immagazzinata sottoforma di potere riducente. E' importante sottolineare che il ciclo di Krebs non è fondamentale solo per il metabolismo ossidativo ma fornisce sostanze, quali ad esempio l'ossalacetato e l' α -chetoglutarato, fondamentali per la sintesi degli aminoacidi.

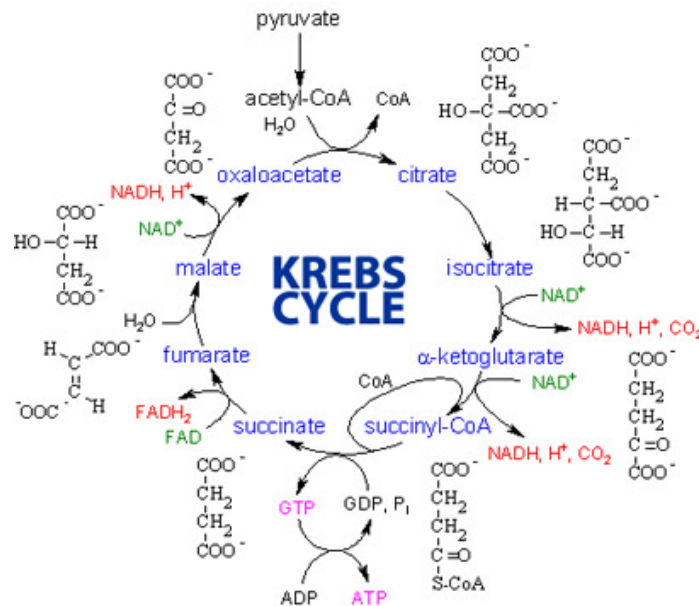


Figura 1. 2: Rappresentazione schematica del ciclo di Krebs.

1.1.2 Fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa è il principale meccanismo attraverso il quale gli organismi aerobi sono in grado di convertire l'energia derivante dalla degradazione ossidativa delle sostanze organica in ATP. Come noto, la fosforilazione ossidativa avviene tramite un accoppiamento chemiosmotico, che ha come effetto finale la sintesi di ATP nella matrice mitocondriale.

La sintesi di ATP necessita del rilascio dell'energia immagazzinata come potere riducente (NADH e FADH_2) durante i processi di glicolisi, β -ossidazione e ciclo di Krebs. In particolare NADH e FADH_2 si riossidano cedendo gli elettroni ad una catena respiratoria situata nella membrana interna, attraverso la quale gli elettroni vengono trasportati secondo gradiente attraverso trasportatori che, ciclicamente, accettano elettroni, riducendosi, da un trasportatore con un potenziale di riduzione minore e cedono elettroni, ossidandosi, ad un trasportatore con un potenziale di riduzione maggiore. Esistono tre classi di trasportatori presenti nella catena di trasporto mitocondriale:

- (1) Centri ferro-zolfo. I centri ferro-zolfo, o Fe-S, sono strutture, complessate all'interno di proteine chiamate ferredossine, in cui uno o più atomi di ferro sono legati tramite legami di coordinazione a atomi di zolfo inorganici o a atomi di zolfo di cisteine. Nei centri ferro zolfo i veri trasportatori di elettroni sono costituiti dagli atomi di ferro che, ciclicamente, accettano un elettrone riducendosi a ione ferroso (Fe^{2+}) e cedono l'elettrone riossidandosi a ione ferrico (Fe^{3+}).
- (2) Citocromi respiratori. I citocromi respiratori sono proteine a cui è complessata una molecola di tipo eme, il quale conferisce alla proteina la capacità di assorbire luce visibile, con un caratteristico spettro variabile da citocromo a citocromo. I citocromi respiratori vengono divisi in tre classi a seconda del picco di assorbimento nel visibile: citocromo a, con un picco di assorbimento a 602 nm; citocromo b, con un picco

d'assorbimento a 560 nm; citocromo c, con un picco d'assorbimento a 550 nm. Tra i trasportatori di membrana mitocondriale sono presenti tre citocromi b, due citocromi c (c e c₁) e due citocromi a (a e a₃). Nei citocromi i veri trasportatori di elettroni sono i gruppi eme, di cui fanno parte uno ione Fe²⁺ e, nel caso dei citocromi a, anche uno ione Cu⁺.

- (3) Ubichinone. L'ubichinone, o coenzima Q, è una molecola a struttura chinonica che, a differenza degli altri trasportatori, non è complessato a proteine. La struttura chinonica è legata a un numero specifico di unità isoprenoidi (10 nelle cellule di mammifero), le quali permettono alla molecola di diffondere liberamente nella membrana mitocondriale esterna. L'ubichinone è in grado di accettare due elettroni in successione, passando dalla forma ossidata (ubichinone) alla forma parzialmente ridotta (semichinone), e da questa alla forma ridotta (ubichinolo), come rappresentato in figura 1.3.

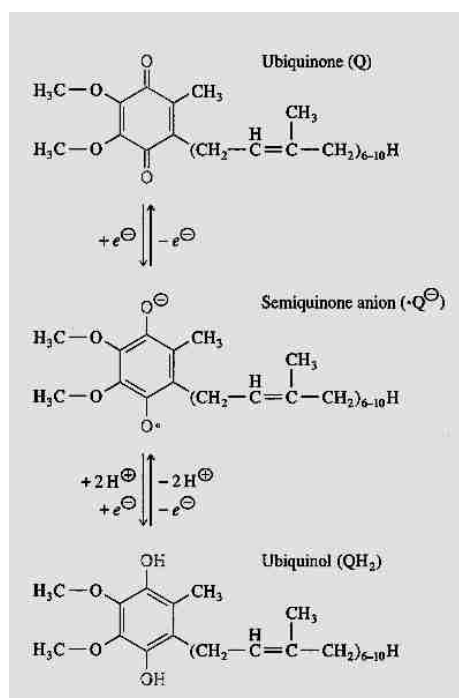


Figura 1. 3: Ossidazione e riduzione del coenzima Q.

La maggior parte dei trasportatori non sono proteine isolate, ma formano complessi multiproteici che attraversano la membrana interna, chiamati complessi respiratori, rappresentati in figura 1.4.

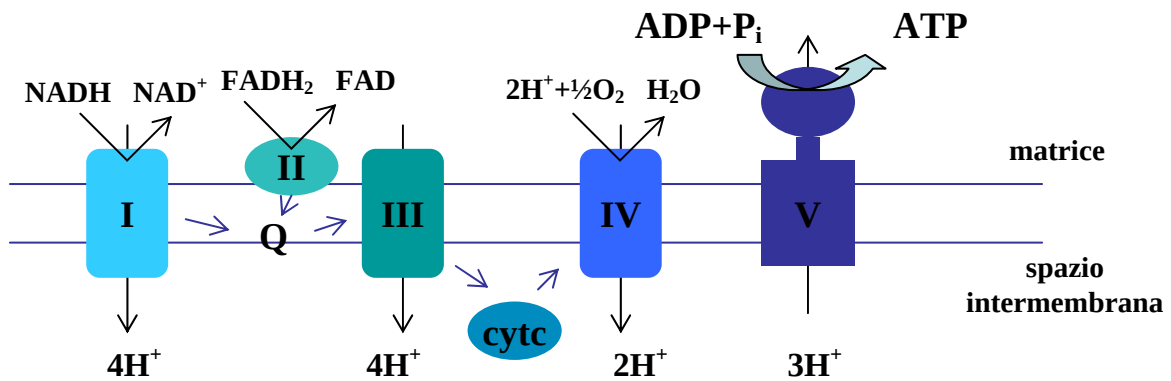


Figura 1. 4: Complessi enzimatici del sistema OXPHOS mitocondriale. I: NADH-coenzima Q reduttasi; II: succinato-coenzima Q reduttasi; III: citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi; IV: citocromo c ossidasi; V: ATP sintasi; Q: coenzima Q; cytc: citocromo c. Le frecce blu rappresentano gli elettroni.

Il complesso I, o NADH-coenzima Q reduttasi, o NADH deidrogenasi, catalizza il trasferimento di due elettroni dal NADH al coenzima Q. Il complesso I è costituito da una proteina a cui è legato un gruppo prostetico costituito da flavin mononucleotide (FMN), che ciclicamente accetta elettroni e protoni dal NADH e cede gli elettroni ai centri ferro-zolfo.

Il complesso II, o succinato-coenzima Q reduttasi, o succinato deidrogenasi, catalizza il trasferimento di due elettroni dal succinato al coenzima Q. Il complesso II è l'unico complesso che funge anche da enzima del ciclo di Krebs, in quanto il complesso catalizza l'ossidazione del succinato a fumarato. In questo caso l'accettore di protoni e di elettroni è il FAD, che si riduce a FADH₂ e che si riossida a FAD cedendo due elettroni al coenzima Q, attraverso i centri ferro-solfo del complesso II.

Il coenzima Q, a differenza degli altri trasportatori, è in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana interna, e trasferisce elettroni al complesso III.

Il complesso III, o citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi, catalizza il trasferimento di elettroni dal coenzima Q al citocromo c. Il trasferimento avviene attraverso, nell'ordine, i citocromi b, centri ferro-zolfo e il citocromo c₁.

Il citocromo c si distingue dagli altri citocromi in quanto non fa parte di complessi. Esso infatti si comporta come proteina debolmente ancorata alla membrana interna, in grado di diffondere lungo la parte esterna della membrana.

Il complesso IV, o citocromo c ossidasi, catalizza il trasferimento di elettroni dal citocromo c all'accettore finale, l'ossigeno. Il complesso IV è costituito dai citocromi a e a₃.

Il complesso V non è un complesso respiratorio, ma un complesso, chiamato ATP sintasi, che sintetizza ATP grazie all'energia rilasciata durante il trasporto di elettroni dalle molecole ridotte all'ossigeno. Il trasporto di elettroni si accompagna infatti ad un pompaggio di protoni attraverso la membrana interna, dalla matrice allo spazio intermembrana, tramite i complessi respiratori. Questo pompaggio di protoni crea un gradiente di protoni attraverso la membrana, che fornisce l'energia per la sintesi di ATP. Il gradiente, chiamato gradiente elettrochimico, è sia di concentrazione chimica, in quanto la concentrazione di protoni nello spazio intermembrana è maggiore rispetto a quello della matrice, sia di natura elettrica, in quanto la carica nello spazio intermembrana è maggiore. La dissipazione di questo gradiente, attraverso

il complesso V, permette la sintesi di ATP a partire da ADP e fosfato inorganico. E' inoltre da ricordare che il gradiente protonico elettrochimico non è fondamentale solo per la sintesi di ATP, ma anche per la maggior parte delle altre funzioni mitocondriali e per il trasporto di sostanze attraverso i trasportatori della membrana interna.

1.1.3 Altre funzioni dei mitocondri

Oltre alla sintesi di ATP, i mitocondri svolgono altri ruoli fondamentali nella cellula.

In primo luogo, i mitocondri giocano un ruolo fondamentale in alcune forme di apoptosi, cioè nella morte cellulare programmata, in particolare nell'apoptosi indotta da stress. L'apoptosi indotta da stress include l'attivazione, in maniera sequenziale, di numerose proteine, che vengono chiamati fattori pro-apoptotici. Diversi segnali pro-apoptotici sono in grado di convergere fino al mitocondrio, stimolando la permeabilità delle membrane mitocondriali e il rilascio dal mitocondrio al citoplasma di altri fattori pro-apoptotici. Il principale fattore è il citocromo c, che viene rilasciato attraverso la membrana esterna nel citoplasma (Liu *et al.*, 1996). Altri fattori rilasciati durante l'apoptosi sono le caspasi 2 e 9 e il complesso Smac-DIABLO (Susin *et al.*, 1999; Verhagen *et al.*, 2000)

Il mitocondrio svolge un ruolo fondamentale anche nella segnalazione indotta da calcio. Grazie al gradiente elettrochimico transmembrana, nella matrice mitocondriale possono essere trasportate grosse quantità di calcio, mediante uno specifico trasportatore che trasporta calcio in maniera unidirezionale. La concentrazione intramitocondriale di calcio viene inoltre regolata da un trasportatore in grado di scambiare calcio e sodio. Il principale ruolo della regolazione della concentrazione del calcio intramitocondriale consiste nell'attivazione del ciclo degli acidi tricarbossilici, che è stimolato da un aumento della concentrazione di calcio (Duchen, 2004).

I mitocondri sono gli organuli in cui viene prodotta la maggior parte delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), fra cui i più comuni sono il perossido di idrogeno, l'anione superossido e il radicale idrossile. I ROS si generano per lo più durante il trasporto di elettroni lungo la catena respiratoria, come conseguenza della riduzione parziale dell'ossigeno. In particolare la maggior parte dei ROS vengono prodotti a partire dagli elettroni che vengono direttamente ceduti dal complesso I (NADH deidrogenasi) all'ossigeno molecolare, dando origine all'anione superossido. Questo viene detossificato dall'enzima superossido dismutasi che lo converte a perossido d'idrogeno. A sua volta l'acqua ossigenata è convertita ad acqua dall'azione della glutatione perossidasi, ma può essere anche convertita nella specie reattiva radicale idrossile attraverso la reazione di Fenton (Wallace, 1999). L'esposizione ai ROS causa l'ossidazione e il conseguente danno delle proteine, dei lipidi e dell'mtDNA. In particolare, i danni dei ROS sull'mtDNA stanno alla base della teoria mitocondriale dell'invecchiamento, secondo la quale l'invecchiamento è dovuto principalmente ad un incremento dei danni sull'mtDNA causato dai ROS con l'aumentare dell'età (reviewed in Wallace, 2005).

Diversi studi hanno dimostrato che alcuni ROS prodotti nel mitocondrio possono svolgere un ruolo fisiologico. In particolare, il perossido di idrogeno rilasciato dal mitocondrio nel

citoplasma può fungere da secondo messaggero in grado di stimolare il trasporto di glucosio, la sintesi lipidica, il rilascio del calcio dal mitocondrio e l'attività piruvato deidrogenasica, e di inibire la glicolisi, la lipolisi, la sintesi di ATP e l'attività superossido dismutasica (reviewed in Valko *et al.*, 2007).

I mitocondri svolgono anche un ruolo importante nei processi biosintetici. In primo luogo, diversi aminoacidi vengono sintetizzati a partire da intermedi del ciclo di Krebs e mediante reazioni che avvengono nella matrice mitocondriale. Inoltre i mitocondri partecipano alla sintesi di steroidi e di eme.

1.2 Il DNA mitocondriale

Come detto in precedenza, i mitocondri contengono un proprio genoma, chiamato DNA mitocondriale o mtDNA. Ogni mitocondrio contiene più copie di mtDNA, e il numero varia a seconda della specie, delle condizioni ambientali e, nel caso di organismi multicellulari, del tessuto. In generale, l'mtDNA è costituito da una molecola circolare la cui lunghezza è specie-specifica. Alcuni eucarioti inferiori posseggono un mtDNA di tipo lineare. In particolare, in *S. cerevisiae* sono presenti sia molecole circolari che lineari, queste ultime sotto forma di concatenameri (Bendich, 1996; Nosek and Tomoska, 2003).

La lunghezza del DNA mitocondriale, come detto, è specie-specifica, ed è molto variabile, come riportato in tabella 1.1.

Regno	Dimensioni (Kb)	Geni codificanti proteine	Geni codificanti RNA
Funghi	19-100	8-14	10-28
Protisti	6-100	3-62	2-29
Piante	186-366	27-34	21-30
Animali	16-17	13	4-24

Tabella 1. 1: Dimensioni dell'mtDNA e numero di geni mitocondriali negli organismi dei vari regni (Lang *et al.*, 1999)

Come emerge dalla tabella, il numero di proteine e RNA codificate dal DNA mitocondriale è variabile, e in generale non correla con la lunghezza. I mammiferi posseggono un mtDNA di circa 16,5 Kb, mentre la lunghezza dell'mtDNA in organismi degli altri regni è in generale maggiore, soprattutto nelle piante, dove la lunghezza dell'mtDNA può superare le 350 Kb.

Per quanto concerne l'organizzazione fisica dell'mtDNA, esso, al contrario del DNA nucleare, non è legato da istoni. Il DNA non è comunque "nudo", in quanto è legato da molteplici proteine, alcune solubili e altre di membrana, che, insieme al DNA, costituiscono una struttura dinamica chiamata nucleotide, identificato in numerosi organismi (Kaufman *et al.*, 2000; Meeusen *et al.*, 1999; Miyakawa *et al.*, 1987; Garrido *et al.*, 2003; Bogenhagen *et al.*, 2003). I nucleotidi consistono una regione distinta situata all'interno dei mitocondri. (reviewed in Jacobs *et al.*, 2000). Il nucleotide maggiormente caratterizzato è quello di *S. cerevisiae*, per le quali sono state identificate 4 classi di proteine che lo compongono:

- 1) Proteine associate direttamente o indirettamente all'mtDNA, fra cui la proteina Abf2, coinvolta nel *packaging* dell'mtDNA e fondamentale per il mantenimento

dell'mtDNA integro, la proteina Mgm110, coinvolta nella riparazione dell'mtDNA, la proteina legante il DNA a singolo filamento Rim1, coinvolto nella replicazione, la proteina Sls1, coinvolta nella trascrizione dell'mtDNA, e in generale tutte le proteine coinvolte nella trascrizione e nella replicazione dell'mtDNA;

- 2) Proteine coinvolte nell'importazione delle proteine e nella biogenesi mitocondriale, fra cui le proteine mtHsp60, mtHsp70, mtHsp10, che sono "chaperons", e la subunità α della unità F_1 dell'ATPasi;
- 3) Enzimi coinvolti nel ciclo dell'acido citrico, fra cui l'aconitasi, l'aldeide deidrogenasi e la piruvato deidrogenasi;
- 4) Enzimi coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi (Chen *et al.*, 2005).

Secondo una teoria sviluppata da Jacobs *et al.*, 2000 ogni nucleotide contiene più copie di mtDNA identiche, derivanti da una stessa molecola originale, e si comporta come unità di trasmissione dell'mtDNA.

In una popolazione di cellule possono essere presenti due tipi di molecole di mtDNA, ad esempio un tipo wt e uno mutato. In questo caso sono possibili due condizioni: omoplasma ed eteroplasma (Dujon, 1981; Grossman and Shoubridge, 1996; Garesse and Vallejo, 2001). Si parla di omoplasma quando in una cellula è presente un solo tipo di mtDNA, per cui in una popolazione di cellule alcune cellule conterranno solo molecole wt di mtDNA e altre cellule solo molecole mutate. Si parla di eteroplasma quando le cellule contengono entrambi i tipi di mtDNA, per cui tutte le cellule della popolazione conterranno entrambi i tipi di mtDNA, in generale in proporzione variabile. Come verrà spiegato successivamente, mentre i tessuti umani sono tipicamente eteroplasmici, la condizione naturale di *S. cerevisiae* è l'omoplasma, mentre l'eteroplasma è solo una fase transeunte che si genera, ad esempio, in seguito ad una mutazione dell'mtDNA.

1.2.1 Il DNA mitocondriale umano

Il DNA mitocondriale umano è una molecola circolare costituita da 16569 bp (figura 1.5).

Il genoma mitocondriale umano contiene 37 geni: 13 codificano per proteine dei complessi respiratori, 22 per i tRNA mitocondriali e 2 per gli rRNA mitocondriali. L'organizzazione dei geni è alquanto diversa da quelli dei geni nucleari. In primo luogo, mentre nella maggior parte dei geni nucleari sono presenti degli introni, nessun introne è presente nei geni mitocondriali dei mammiferi. Ne risulta quindi un'organizzazione molto compatta, resa ancora più compatta dal fatto che alcuni geni sono parzialmente sovrapposti. In secondo luogo, mentre i geni nucleari sono codificati come mRNA monocistronico, tutti i geni dell'mtDNA sono codificati come mRNA policistronico. In particolare nell'mtDNA umano sono presenti due promotori: il *light strand promoter* (LSP) e l'*heavy strand promoter* (HSP). Il promotore HSP è situato sul filamento pesante (i filamenti vengono chiamati leggero o pesante perché presentano diversa densità), a valle del D-loop. Da esso vengono trascritti come un unico mRNA tutti i geni, eccetto il gene per la subunità 6 della NADH deidrogenasi e otto geni per tRNA. Dall'LSP, situato a monte del gene per la subunità 6 della NADH deidrogenasi, vengono trascritti gli altri geni.

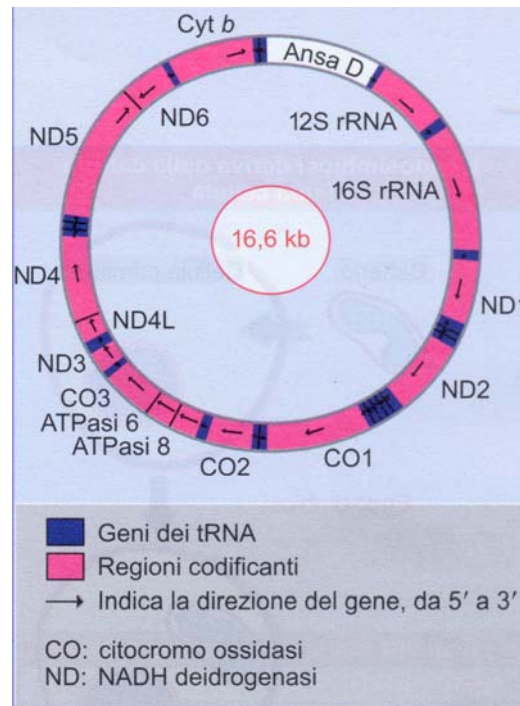


Figura 1. 5: DNA mitocondriale umano. In rosa i geni per proteine e per gli rRNA, in blu i geni per tRNA (da IL GENE VIII, Lewin).

Per quanto concerne le proteine codificate dall'mtDNA, tutte fanno parte dei complessi respiratori o dell'ATP sintasi. La maggior parte delle proteine dei complessi respiratori, nonché tutte le altre proteine mitocondriali, sono codificate da geni nucleari. Le subunità dei complessi respiratori codificati da geni mitocondriali e nucleari sono riportati in figura 1.6.

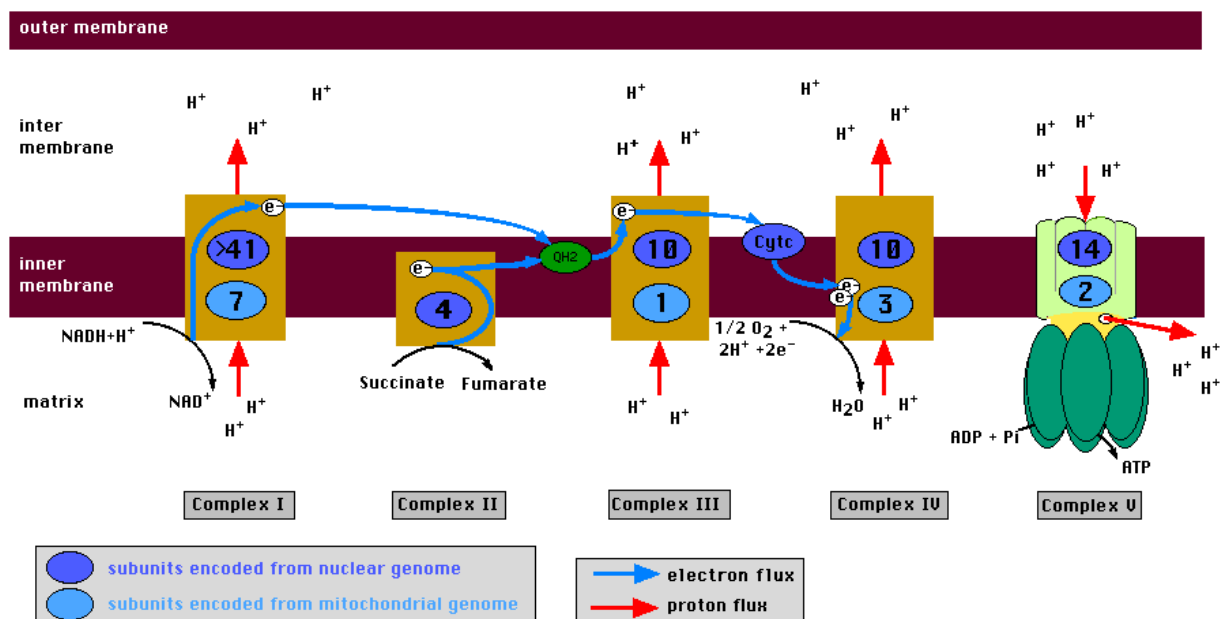


Figura 1. 6: Subunità codificate da geni mitocondriali o geni nucleari dei complessi mitocondriali umani. In blu le subunità codificate da geni nucleari, in azzurro le subunità codificate da geni mitocondriali, in verde il coenzima Q. Le frecce azzurre indicano il flusso di elettroni, le frecce rosse il flusso di protoni.

In particolare, il genoma mitocondriale codifica per:

- sette subunità del complesso I (NADH deidrogenasi): ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6;
- una subunità del complesso III (citocromo c-coenzima Q ossidoreduttasi), in particolare la componente proteica del citocromo b;
- tre subunità del complesso IV (citocromo ossidasi): COX1, COX2 e COX3;
- due subunità del complesso V (ATP sintasi): ATPasi 6 e ATPasi 8.

I 22 tRNA mitocondriali sono codificati soltanto da geni mitocondriali. A causa del ridotto numero di geni per tRNA, il DNA mitocondriale ha sviluppato un proprio codice genetico, differente dal codice genetico universale e variabile a seconda della specie. In particolare il codice genetico mitocondriale dei vertebrati presenta quattro differenze rispetto al codice genetico universale. AUA non codifica per isoleucina ma per metionina; UGA non è un codone di stop ma codifica per triptofano; AGA e AGG non codificano per arginina ma sono codoni di stop.

Grazie alla scarsa lunghezza dell'mtDNA umano, esso è stato sequenziato in migliaia di individui. Dal sequenziamento, oltre a mutazioni patologiche, che verranno discusse in seguito, sono emersi centinaia di polimorfismi, per lo più *single nucleotide polymorphism* (SNP) situati nel D-loop (www.mitomap.org).

Come detto in precedenza, ogni mitocondrio contiene più copie di mtDNA, e poiché in una cellula sono presenti più mitocondri, ogni cellula contiene un numero elevato di copie di mtDNA. Il numero varia in maniera tessuto specifico, e raggiunge alcune migliaia nel cuore, nel cervello e nei muscoli sotto sforzo, dove è richiesta un'elevata quantità di ATP. Qualora siano presenti diversi tipi di mtDNA, nell'uomo vi è una generale tendenza all'eteroplasmia, ossia nelle cellule coesistono entrambi i tipi di mtDNA. Sebbene non sia noto esattamente come avviene il trasferimento di mtDNA ai mitocondri durante il processo di divisione cellulare, è stato ipotizzato che il trasferimento sia casuale, per cui una cellula eredita, in termini di probabilità, entrambi i tipi di mtDNA. Come verrà descritto in seguito, in caso di patologie mitocondriali che riducono la stabilità dell'mtDNA, ad esempio associate a delezioni dell'mtDNA, la frazione di molecole delete tende ad aumentare col progredire dell'età, fino allo sviluppo dei sintomi, che subentra quando viene superato l'effetto soglia, cioè la percentuale di molecole mutate sopra la quale si manifesta la patologia. (Novotny *et al.*, 1986).

Per quanto concerne l'ereditarietà, il DNA mitocondriale viene ereditato soltanto dalla madre (eredità materna), poiché lo zigote riceve soltanto i mitocondri derivanti dalla cellula uovo.

1.2.2 Il DNA mitocondriale di *S. cerevisiae*

Organizzazione. Il DNA mitocondriale di *S. cerevisiae* presenta numerose differenze rispetto all'mtDNA umano, sotto vari aspetti.

In primo luogo il DNA mitocondriale di lievito presenta una lunghezza maggiore, che è variabile da 68 Kb (*short strain*) a 86 Kb (*long strain*). In figura 1.7 è riportata una rappresentazione schematica dell'mtDNA di un ceppo *long*. Il genoma mitocondriale utilizzato attualmente come riferimento è quello sequenziato da Foury a partire dal *long strain*

FY1679, isogenico al ceppo di riferimento S288c (Foury *et al.*, 1998). Il genoma è lungo 85779 bp e, al contrario dell'mtDNA umano, presenta un basso grado di compattamento (figura 1.7). Diverse regioni non sono codificanti, e tre geni contengono introni. Anche i geni mitocondriali di lievito sono trascritti per lo più come mRNA policistronici, ma in questo caso sono presenti più siti di inizio della trascrizione, caratterizzati dalla presenza di una sequenza consensus (A,T)TATAAGTA.

A

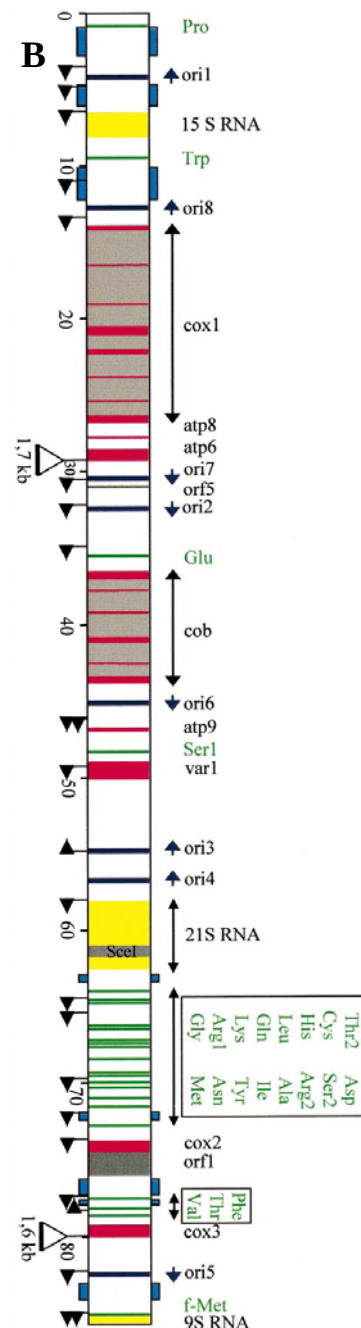
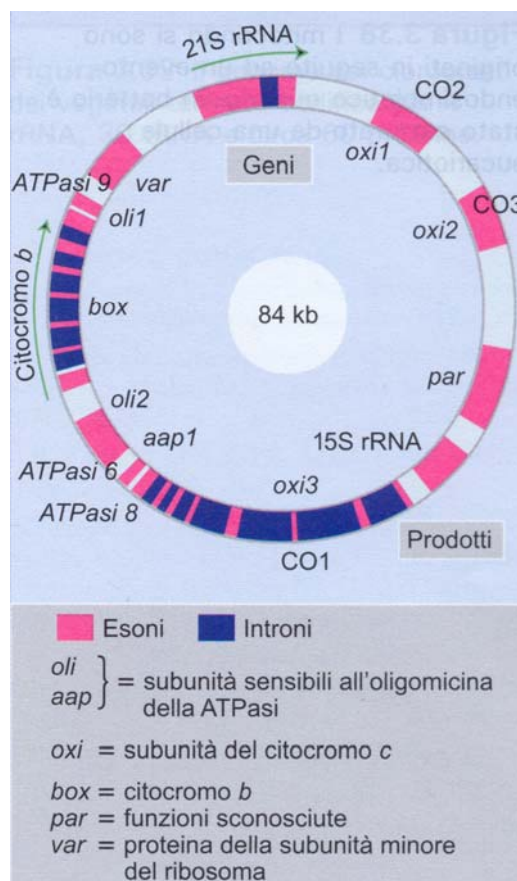


Figura 1. 7: (A) Rappresentazione schematica dell'mtDNA di un ceppo *long*. Le frecce indicano la direzione della trascrizione (da IL GENE VIII, Lewin); (B) Rappresentazione lineare dell'mtDNA del ceppo FY1679. In rosso gli esoni dei geni codificanti per proteine, in grigio gli introni; in verde i geni per tRNA; in giallo i geni per gli rRNA; in blu scuro le origini di replicazione ori; in bianco sequenze non codificanti; in azzurro regioni mancanti nei *short strain*; le frecce nere indicano i siti di inizio della trascrizione e la direzione della trascrizione (da Foury *et al.*, 1998).

Il genoma mitocondriale del ceppo FY1679 contiene 18 elementi codificanti per proteine, più 9 ORF dubbie o a funzione sconosciuta. Sette delle 18 proteine fanno parte dei complessi mitocondriali (figura 1.8).

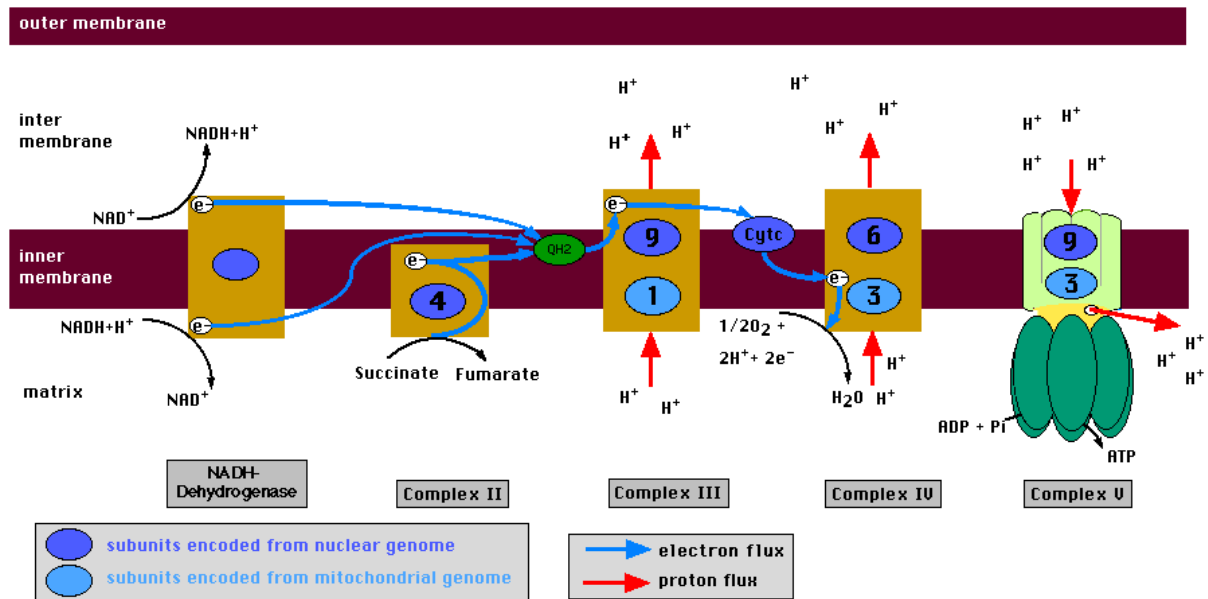


Figura 1. 8: Subunità codificate da geni mitocondriali o geni nucleari dei complessi mitocondriali di *S. cerevisiae*. In blu le subunità codificate da geni nucleari, in azzurro le subunità codificate da geni mitocondriali, in verde il coenzima Q. Le frecce azzurre indicano il flusso di elettroni, le frecce rosse il flusso di protoni.

Al contrario di quanto si osserva nell'uomo, nessun gene codifica per subunità della NADH deidrogenasi, che nel lievito non è un complesso, ma una proteina singola codificata da un gene nucleare. Così come nell'uomo, il genoma mitocondriale di lievito codifica per una subunità del complesso III, il citocromo b (codificato dal gene *COB*, detto anche *CYTB* o *BOX*) e per tre subunità del complesso III, chiamate citocromo ossidasi 1 (codificato dal gene *COX1* o *OXI3*), citocromo ossidasi 2 (*COX2* o *OXI2*) e citocromo ossidasi 3 (*COX3* o *OXI1*). Infine sono codificate dall'mtDNA tre subunità dell'ATP sintasi.

Il gene *VAR1* codifica per una proteina ribosomale mitocondriale, mentre tutte le altre proteine sono codificate da geni nucleari. Le 10 proteine rimanenti sono codificate dagli introni presenti nei geni 21S rRNA, *COB* e *COX1* e consistono in maturasi, endonucleasi e trascrittasi inverse.

Il DNA mitocondriale di lievito inoltre codifica per i 24 tRNA mitocondriali. Anche in questo caso, a causa del ridotto numero di tRNA, il codice genetico presenta delle differenze rispetto al codice universale: i codoni CUU, CUC, CUA e CUG non codificano per leucina, ma per treonina; AUA non codifica per isoleucina ma per metionina; UGA non è un codone di stop ma codifica per triptofano.

Infine il genoma mitocondriale di lievito codifica per 2 rRNA (21S e 15S) e per un RNA (9 S) facente parte dell'RNasi P, coinvolta nella maturazione dei pre-tRNA mitocondriali.

Nei ceppi *short* sono presenti tutti i geni codificanti per tRNA, rRNA, proteine dei complessi respiratori e la proteina Var1. Mancano invece parti di regioni non codificanti, alcune ORF putative e alcuni introni, e di conseguenza RNA codificanti per maturasi o endonucleasi.

Per quanto riguarda la composizione in basi, essa è molto eterogenea (Bernardi *et al.*, 1972; De Zamaroczy and Bernardi, 1986). Le regioni codificanti contengono un contenuto G+C di circa il 30%, mentre le regioni non codificanti sono costituiti quasi esclusivamente da A e T e sono interrotte da isole G+C variabili in lunghezza da 10 bp e 80 bp, alcune delle quali sono fondamentali nei processi di replicazione.

Le cellule di *S. cerevisiae* contengono diverse copie di mtDNA, il cui numero esatto varia a seconda del ceppo, dello stato aploide o diploide e delle condizioni di crescita. Tipicamente una cellula aploide contiene 20-35 copie di mtDNA (De Zamaroczy and Bernardi, 1985). Come verrà anche discusso successivamente, le cellule di lievito contengono lo stesso tipo di mtDNA, cioè sono omoplasmiche. Qualora, in seguito a mutazione, si generino due tipi di mtDNA, nel giro di poche generazioni le cellule saranno di nuovo omoplasmiche, e la popolazione sarà composta da cellule contenente mtDNA wt e cellule contenente mtDNA mutato. Attualmente non sono note esattamente i meccanismi che portano all'omoplasma, ma questo fenomeno è in parte responsabile di alcuni fenotipi tipici che si riscontrano in *S. cerevisiae*, fra cui l'ipersoppressività.

Genetica mitocondriale e *petite* positività. Il DNA mitocondriale è soggetto a mutazioni spontanee, che rendono con elevata frequenza un ceppo respiratorio deficiente (RD) (reviewed in Campbell and Duffus, 1988, Dujon, 1981 e Contamine and Picard, 2000).

Saccharomyces cerevisiae, al contrario della maggior parte degli altri eucarioti, anche aerobi facoltativi, è una specie *petite positive*. In questo organismo mutazioni nell'mtDNA che inibiscono il processo respiratorio non sono letali. Infatti i ceppi che presentano tali mutazioni sono in grado di crescere su terreni contenente una fonte fermentabile (zuccheri) mediante un metabolismo esclusivamente di tipo fermentativo. In queste condizioni i ceppi mutati formano colonie più piccole rispetto a ceppi wt, chiamate *petite*, a causa dell'incapacità di utilizzare l'etanolo prodotto durante il processo fermentativo. I *petite*, essendo respiratorio deficienti, non sono infatti in grado di crescere su fonti ossidabili, quali l'etanolo, il glicerolo, il lattato o il succinato.

I ceppi *petite* possono derivare, in realtà, sia da mutazioni in geni nucleari che portano a mutazioni o alla perdita di mtDNA (chiamati mutanti *pet*) sia da mutazioni del genoma mitocondriale. In quest'ultimo caso si parla di *petite* citoplasmatici. Mentre i mutanti *pet* si generano spontaneamente a bassa frequenza, i *petite* citoplasmatici si generano spontaneamente, su una fonte fermentabile, con una frequenza molto elevata, pari a circa l'1-2%. La frequenza della comparsa dei *petite* è comunque variabile a seconda del ceppo, dello stato aploide e diploide e delle condizioni di crescita.

I *petite* citoplasmatici, o semplicemente *petite*, si distinguono in due classi: ρ^- e ρ^0 . I ρ^- presentano lunghe delezioni dell'mtDNA, mentre i ρ^0 sono privi di mtDNA. Fenotipicamente i due tipi di *petite* non sono distinguibili, in quanto entrambi sono respiratorio deficienti e dunque incapaci di crescere su fonti ossidabili. Essi si distinguono

pertanto dai ceppi wt, che, in riferimento allo stato del genoma mitocondriale, vengono chiamati ρ^+ . I ceppi ρ^- e ρ^0 sono respiratori deficienti in quanto in essi non avviene la sintesi proteica mitocondriale, e di conseguenza l'assemblamento dei complessi respiratori. A causa delle delezioni infatti i ρ^- presentano sempre la perdita di alcuni geni per tRNA, e in generale anche di geni per rRNA e per proteine.

I ρ^- presentano lunghe delezioni dell'mtDNA, tanto che nella maggior parte dei ρ^- meno di un terzo del genoma rimane. Spesso la percentuale rimanente è inferiore, e può raggiungere valori anche inferiori allo 0,5% del genoma originale. D'altra parte, nei ρ^- , la quantità totale di mtDNA è simile a quella dei cloni ρ^+ , indicando che il DNA presente in questi ceppi è amplificato e, in generale, è tanto più ripetuto quanto maggiore è la regione deleta. Tipicamente dunque il genoma mitocondriale dei ceppi ρ^- è costituito da regioni più o meno lunghe ripetute più volte. In tal senso si distinguono due tipi di ripetizioni, o riarrangiamenti. Nel primo tipo la regione mantenuta è ripetuta più volte in tandem, così da costituire strutture circolari o lineari in cui le ripetizioni sono unite in maniera testa-coda. Nel secondo tipo, chiamato palindromico, l'unità che si ripete è costituita da due regioni legate fra loro in maniera palindromica, cioè testa-testa. Spesso, è possibile trovare in un'unica molecola entrambi i tipi di riarrangiamenti. A questo va aggiunto il fatto che spesso i ρ^- derivano da delezioni multiple dell'mtDNA, per cui in questo caso si trovano in tandem regioni che normalmente sono separate su un genoma wt.

I meccanismi con cui si generano i ρ^- non sono esattamente noti. L'ipotesi più accreditata è che le delezioni si generino in seguito a ricombinazione fra sequenze simili dell'mtDNA, tanto che spesso ripetizioni dirette si trovano nei genomi wt nei punti in cui avviene la delezione. D'altra parte è possibile che numerosi altri fenomeni influenzino la formazione di *petite*, come dimostrato dall'elevato numero di geni che, se mutati, incrementano la frequenza dei *petite* (Contamine and Picard, 2000). In ogni caso, nella formazione dei *petite* gioca un ruolo fondamentale la tendenza all'omoplasma. Dopo la comparsa della mutazione, la cellula rimane inizialmente ρ^+ a causa della presenza di numerose copie di mtDNA, la maggior parte delle quali sono ancora integre. Nel giro di poche generazioni, i due tipi di mtDNA tendono a segregare, formando alla fine così cellule che contengono soltanto l'mtDNA parzialmente deleta, dunque ρ^- , e cellule che contengono l'mtDNA wt, dunque ρ^+ . Da questa osservazione si ricava anche che in una popolazione di cellule la frequenza dei *petite* tenderebbe ad aumentare, visto che cellule ρ^+ possono dare origine a *petite*, ma cellule *petite* non possono revertire a ρ^+ . D'altra parte il numero di cellule *petite* è limitato in una popolazione dal fatto che essi crescono più lentamente rispetto alle cellule wt. La frazione di *petite* è dunque un problema di genetica di popolazione. La frazione infatti deriva da due fenomeni contrapposti: la tendenza di molecole ρ^+ a diventare *petite* e il rapporto fra la velocità di crescita dei ρ^+ e la velocità di crescita dei *petite*. Entrambi i fenomeni sono influenzati da diversi fattori, fra cui fra cui il *background* genetico e le condizioni di crescita (Taylor *et al.*, 2002).

Le proprietà genetiche dei ρ^- possono essere definite sulla base della stabilità dell'mtDNA e sulla base degli incroci con ceppi tester. Per quanto concerne la stabilità, la maggior parte dei

ρ^- posseggono un'instabilità intrinseca. Nel giro di alcune generazioni a partire da una popolazione omogenea di ρ^- , si ottiene una certa percentuale di ρ^- con una diversa soppressività rispetto al clone originale, segno di un riarrangiamento del genoma mitocondriale. Molti di questi cloni diventano nonsoppressivi, segno che sono diventati per lo più ρ^0 .

Per quanto concerne gli incroci, gli effetti sono diversi a seconda che l'incrocio avvenga con un ρ^+ o un mit^- . Dall'incrocio di un ρ^- e un ρ^+ si formano inizialmente diploidi ρ^+ . A causa della tendenza all'omoplasma, nel giro di alcune generazioni si generano due popolazioni di diploidi, una ρ^+ e una ρ^- . La soppressività di un ρ^- è definita come la percentuale di ρ^- sulla popolazione totale dopo almeno 25 generazioni, quando le cellule sono oramai diventate omoplasmiche. Sono detti nonsoppressivi i *petite* che non producono diploidi ρ^- . La maggior parte dei ceppi nonsoppressivi sono ρ^0 , ma anche alcuni ρ^- si comportano in modo tale. Sono detti ceppi a bassa, media o alta soppressività i ceppi che producono *petite* con una frequenza inferiore al 95%. La maggior parte dei ρ^- che si formano spontaneamente ricadono in questa categoria. Sono detti ipersoppressivi i ceppi ρ^- che producono *petite* con una frequenza maggiore del 95%. Tipicamente l'ipersoppressività è legata a due fenomeni, l'omoplasma e la tendenza ad essere favoriti nella replicazione. I ceppi ρ^- ipersoppressivi contengono una piccolissima regione del genoma originario contenente un'origine di replicazione, spesso soltanto questa regione. Poiché, come detto, la quantità di mtDNA nei ρ^+ e nei ρ^- è simile, la regione in questione è amplificata decine o centinaia di volte. L'ipersoppressività è dovuta al fatto che la replicazione di questi genomi ρ^- è favorita dalla presenza di numerose origini di replicazione, per cui l'apparato replicativo tenderà preferenzialmente a replicare il genoma ρ^- rispetto al genoma ρ^+ .

I mutanti mit^- sono mutanti respiratorio deficienti che presentano una singola mutazione puntiforme. Dall'incrocio di un ρ^- con un mit^- si possono avere due tipi di diploidi, respiratorio deficienti, come i parentali, o respiratorio sufficienti. Dall'incrocio di due ceppi aploidi, tipicamente nel diploide avviene ricombinazione fra i genomi mitocondriali, a causa dell'alta frequenza di ricombinazione dei genomi mitocondriali. Qualora il ceppo ρ^- contenga una regione che, nel mutante mit^- , non è mutata, il ceppo rimarrà respiratorio deficiente. Nel caso il ceppo ρ^- contenga la regione in cui mappa la mutazione del ceppo mit^- , in seguito a ricombinazione fra i genomi, si genererà un genoma ρ^+ , in cui la regione presente nel ρ^- ha complementato la mutazione mit^- .

La maggior parte dei ρ^0 si formano spontaneamente a partire da cellule ρ^- o mit^- . In una fonte fermentabile, i ceppi ρ^+ crescono più velocemente rispetto ai *petite*. Di conseguenza la perdita del genoma mitocondriale (così come delezioni) è sfavorita, o meglio le cellule che, dopo una divisione, sono rimaste ρ^+ tenderanno a crescere più velocemente di cellule che sono diventate *petite*. D'altra parte, se una cellula è già respiratorio deficiente e possiede genoma mitocondriale, la perdita di quest'ultimo non conferisce alcuno svantaggio alla cellula. In altre parole, non vi è una tendenza legata alle condizioni di crescita che favorisca il mantenimento di una molecola di mtDNA mutata o deleta.

La perdita di mtDNA può essere stimolata anche dal trattamento con bromuro d'etidio. Il bromuro d'etidio è un intercalante in grado di inserirsi fra la doppia elica del DNA. Esso tende ad intercalarsi quasi esclusivamente nell'mtDNA, e non nel DNA nucleare, a causa del superavvolgimento dell'mtDNA, che ne favorisce l'intercalazione. Una volta intercalato, l'etidio bromuro ne modifica la struttura, favorendone la degradazione ad opera di DNasi e inibendone la replicazione. Nel giro di poche generazioni in un terreno contenente una fonte fermentabile e bromuro d'etidio, tutta la popolazione è costituita da rho⁰.

I ceppi rho⁰, fenotipicamente indistinguibili dai rho⁻, posseggono due proprietà che li differenziano da questi ultimi. In primo luogo, i rho⁰ sono sempre nonsoppressivi, sebbene questo comportamento sia condiviso con una piccola percentuale di rho⁻ (per cui un differenziamento basato sull'incrocio con rho⁺ non è risolutivo). In secondo luogo, i ceppi rho⁰ non sono in grado di complementare alcuna mutazione mit⁻. In tal senso un ceppo non in grado di complementare una vasta serie di mutanti tester mit⁻ può essere considerato rho⁰.

Bisogna sottolineare infine che i ceppi rho⁻, rho⁰ e mit⁻ sono mutati nell'mtDNA, ma i mitocondri sono integri. Sebbene essi siano privi della funzionalità respiratoria, sono comunque presenti e sono in grado di svolgere le altre funzioni del mitocondrio che non dipendono dalla presenza dell'mtDNA. Affinché sia mantenuta l'integrità dei mitocondri è necessario che venga mantenuto il gradiente protonico elettrochimico di membrana. Il potenziale di membrana non è richiesto infatti solo per la sintesi di ATP, ma anche per l'importazione nel mitocondrio di molte proteine a codificazione nucleare, per il trasporto di sostanze a basso peso molecolare e per alcune reazioni, quali la sintesi di aminoacidi e lipidi, che sono vitali per la cellula di lievito (Gbelska *et al.*, 1983; Neupert, 1997).

Quando la respirazione è abolita a causa di mutazioni nell'mtDNA, il gradiente elettrochimico di membrana è mantenuto sia dalla attività di pompa protonica del complesso V sia dall'ingresso di ATP⁴⁺ in cambio di ADP³⁺ ad opera dell'ATP/ADP carrier (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2003). Il mantenimento del gradiente protonico è reso possibile dalla presenza del complesso V. In assenza delle subunità codificate dal mitocondrio, fondamentale per l'accoppiamento del trasporto di elettroni con la sintesi di ATP, l'ATP sintasi agisce come ATP idrolasi, o ATPasi, cioè idrolizza ATP ad ADP e fosfato inorganico (Giraud and Velours, 1997). All'idrolisi di ATP è accoppiato un pompaggio in senso inverso, dalla matrice allo spazio intermembrana, di protoni, il quale mantiene il gradiente. All'idrolisi di ATP si accompagna inoltre il trasporto di nuovo ATP nella matrice.

Genoma mitocondriale e antibiotico resistenza. *Saccharomyces cerevisiae* è sensibile a vari antibiotici antibatterici, fra cui antibiotici che inibiscono la funzionalità mitocondriale. In questo caso, la sensibilità è dovuta al fatto che le componenti dell'apparato respiratorio, trascrizionale e traduzionale dei mitocondri sono molto simili a quelli dei batteri, da cui i mitocondri derivano. Diversi antibiotici attivi su batteri sono attivi anche su *S. cerevisiae*, sebbene a concentrazione più elevate. La sensibilità si osserva solo su fonti respirabili, in quanto su fonti fermentabili la funzionalità mitocondriale non è necessaria. La resistenza ad antibiotici avviene tipicamente in seguito a mutazioni puntiformi che alterano la struttura del prodotto genico, in modo tale che questo mantenga la funzione ma non venga più inibito

dall'antibiotico. I mutanti resistenti ad un antibiotico vengono chiamati ant⁻, o Ant⁻, dove ant indica la sigla dell'antibiotico. Fra le varie resistenze, quattro sono maggiormente utilizzate negli studi genetici. La resistenza all'eritromicina (ceppi Ery^R) è dovuta a specifiche mutazioni nel gene codificante l'rRNA 21S. La resistenza al cloramfenicolo (ceppi Cap^R) è dovuta a mutazioni in specifici nucleotidi sempre nel gene per il 21S rRNA, diverse dalle mutazioni precedenti. La resistenza all'oligomicina (ceppi Oli^R) è dovuta a specifiche mutazioni in due geni codificanti per le subunità dell'ATPasi a codificazione mitocondriale. La resistenza all'antimicina (ceppi Ana^R) è dovuta a mutazioni nel gene per il citocromo b. Come i mutanti mit⁻, i mutanti Ant^R sono dovuti per lo più a mutazioni puntiformi che si generano durante il processo di replicazione.

La resistenza ad antibiotici è importante dal punto di vista genetico per due motivi. In primo luogo le varie resistenze possono essere usate come marcatori genetici, utili, ad esempio, per studiare processi di ricombinazione. In secondo luogo, la variazione della frequenza dei cloni resistenti ad un antibiotico è indice di una variazione della frequenza di mutazioni nell'mtDNA. La resistenza agli antibiotici è dunque utile per studiare l'effetto di mutazioni in geni nucleari sulla mutabilità puntiforme dell'mtDNA.

1.3 Patologie mitocondriali

Le patologie mitocondriali, o malattie mitocondriali, sono state definite inizialmente come patologie multisistemiche caratterizzate da deficienze delle attività associate alla fosforilazione ossidativa. Più recentemente sono state definite, per includere anche patologie che non alterano direttamente la fosforilazione ossidativa, come patologie caratterizzate da una disfunzione del metabolismo mitocondriale (DiMauro *et al.*, 1998).

Il primo caso di patologia mitocondriale fu descritto nel 1962 in una paziente i cui muscoli scheletrici presentavano la proliferazione di un ampio numero di mitocondri anomali, caratterizzati da un meccanismo di dissipazione dell'energia (Luft *et al.*, 1962). Successivamente furono descritti numerosi altri casi, ma fino agli anni '90 le patologie mitocondriali venivano considerate malattie estremamente rare; recenti studi epidemiologici hanno invece evidenziato un'incidenza di 1:8000 nelle popolazioni caucasiche, ponendo tali malattie tra i più frequenti patologie geneticamente determinate (Chinnery *et al.*, 2000; Skladal *et al.*, 2003; Chinnery and Turnbull, 2001). Secondo la teoria dell'invecchiamento mitocondriale, anche il processo di invecchiamento può essere considerato alla stregua di una patologia mitocondriale, poiché è caratterizzato dall'accumulo di mutazioni somatiche nell'mtDNA (Harmen, 1972).

Le patologie mitocondriali hanno tipicamente un decorso progressivo e comprendono un ampio spettro di fenotipi clinici associati all'insufficienza della fosforilazione ossidativa, che rendono la diagnosi difficile e complessa. I tessuti maggiormente colpiti sono quelli con una più alta richiesta energetica e quindi più dipendenti dal metabolismo ossidativo, quali tessuto nervoso, tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, ma anche reni, fegato, sistema endocrino e retina (Land *et al.*, 2004). Da questo deriva che le patologie mitocondriali sono per lo più multisistemiche, e determinano sintomi associabili a più tessuti ed organi. Diversi sintomi

sono comuni a più malattie, mentre altri sono specifici di alcune patologie. I sintomi generali delle patologie mitocondriali sono riportati in tabella 1.2.

Tessuti od organi colpiti	Fenotipi clinici	Tessuti od organi colpiti	Fenotipi clinici
Sistema neuro-muscolare	Oftalmoplegia Miopatia Intolleranza all'esercizio Neuropatia sensoriale periferica Mielopatia Mal di testa Demenza Attacchi epilettici Atassia Distonia Parkinsonismo Mioclono	Sistema endocrino	Ipoparatiroidismo Endocrinopatia multipla Bassa statura
Occhio	Cecità Neuropatia ottica Retinopatia pigmentosa Cataratta	Cuore	Cardiomiopatia Difetti della conduzione cardiaca
Orecchio	Sordità	Sangue	Pancitopenia Anemia sideroblastica
Sistema endocrino	Diabete Disfunzione pancreatica	Organi mesenchimali	Epatopatia Nefropatia Pseudo-ostruzione intestinale

Tabella 1. 2: Fenotipi clinici associati alle patologie mitocondriali.

Per quanto concerne i tessuti dei pazienti, essi sono caratterizzati da fenotipi associati a difetti della fosforilazione ossidativa. In primo luogo, la maggior parte dei pazienti affetti da disordini mitocondriali presentano fibre muscolari “*red ragged*”, cioè fibre muscolari caratterizzate dall'accumulo di mitocondri, spesso anomali, sotto il sarcolemma dei miociti (Gasser *et al.*, 2001). Le fibre “*red ragged*” si generano in seguito a proliferazione di mitocondri che, per supplire alla deficienza della fosforilazione ossidativa, si moltiplicano. Un altro fenomeno tipico delle malattie mitocondriali è la COX negatività, cioè i muscoli dei pazienti non presentano attività citocromo ossidasica evidenziata mediante reazione istochimica. Inoltre sono spesso associati difetti in uno o più dei complessi respiratori, con una notevole riduzione dell'attività enzimatica.

Sebbene le malattie mitocondriali possano essere classificate sulla base di vari parametri, esse vengono in generale suddivise sulla base del tipo di ereditarietà, in quattro classi, come riportato in figura 1.9.

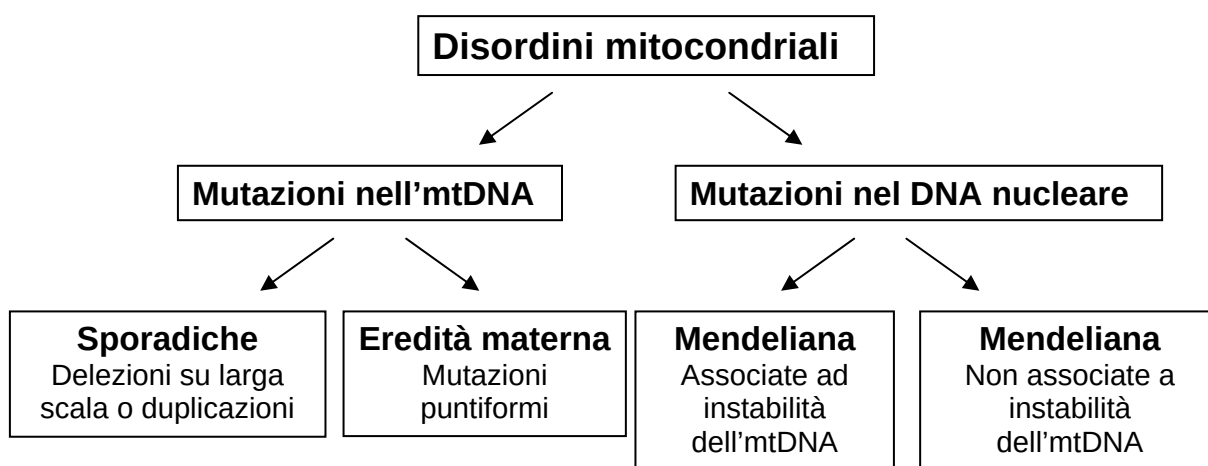


Figura 1. 9: Suddivisione delle patologie mitocondriali sulla base dell'ereditarietà.

Una prima classe di patologie è dovuta a mutazioni nell'mtDNA. In questo caso le mutazioni causanti la patologia possono essere sporadiche oppure ereditate per via materna. Una seconda classe di patologie sono dovute a mutazioni in geni nucleari codificanti per proteine mitocondriali, per cui l'eredità è di tipo mendeliana. In questo caso le mutazioni in geni nucleari possono determinare instabilità dell'mtDNA, oppure difetti biochimici nel metabolismo mitocondriale senza alterazione della stabilità dell'mtDNA.

1.3.1 Mutazioni sporadiche dell'mtDNA

Le mutazioni sporadiche dell'mtDNA consistono tipicamente in riarrangiamenti su larga scala dell'mtDNA, quali singole delezioni, duplicazioni o inversioni. Queste mutazioni sono sporadiche perché non sono di origine ereditaria. Le mutazioni infatti si generano durante l'oogenesi o le prime fasi dell'embriogenesi. Di conseguenza ciascun paziente presenta un solo tipo di mtDNA mutato (DiMauro *et al.*, 1998). La maggior parte dei riarrangiamenti mostrano all'estremità ripetizioni dirette di lunghezza variabile, suggerendo che questi riarrangiamenti si verifichino mediante ricombinazione omologa illegittima (Mita *et al.*, 1990). Queste mutazioni non sono, in genere, trasmesse alla progenie, probabilmente perché le cellule gametiche femminili recanti queste mutazioni non vanno incontro a maturazione e/o fecondazione.

Le mutazioni possono colpire uno o più tessuti, anche a seconda della fase dell'embriogenesi durante la quale è avvenuto il riarrangiamento. Ne deriva che le patologie dovute a riarrangiamenti sporadici dell'mtDNA possono essere più o meno sistemiche. In ogni caso queste mutazioni sporadiche sono sempre eteroplasmiche, cioè nei tessuti colpiti insieme alle molecole mutate si trovano anche molecole wt. La percentuale di molecole di mtDNA mutate varia all'interno di un tessuto, fra tessuti e in diversi momenti temporali. Inoltre tale percentuale può variare in seguito alla divisione mitotica della cellula, e questo può spiegare in parte le variazioni temporali di genotipo e fenotipo clinico osservate nelle patologie relative all'mtDNA, che tipicamente sono progressive (DiMauro *et al.*, 1998). In particolare, l'espressione fenotipica di un difetto genetico si manifesta solo quando è superato un livello critico, ovvero la presenza di una certa proporzione di molecole mutate è necessaria per una

riduzione dell'attività respiratoria e quindi una ridotta funzionalità del tessuto. Una volta raggiunta questa proporzione compaiono i primi sintomi, che diventano progressivamente più gravi. Al di sotto di questa proporzione le mutazioni risultano invece fenotipicamente silenti. Tale minimo livello critico prende il nome di livello soglia o “*threshold*” (Novotny *et al.*, 1986). Questa soglia risulta inferiore nei tessuti maggiormente dipendenti dal metabolismo ossidativo rispetto a quelli in grado di utilizzare la glicolisi anaerobia e costituisce un elemento di variabilità per il fenotipo clinico (McKenzie *et al.*, 2003). Inoltre vi sono soglie differenti per differenti mutazioni, ad esempio circa il 60% per delezioni del mtDNA (Bourgeron *et al.*, 1993). L'effetto soglia può essere in parte spiegato con l'esistenza di riserve di macromolecole (mRNA, tRNA e proteine), presenti in eccesso rispetto alla quantità necessaria per garantire una respirazione normale (Rossignol *et al.*, 2003).

Sono note tre patologie causate da riarrangiamenti dell'mtDNA, riassunte in tabella 1.3.

Sindrome	Fenotipi clinici
KSS (Sindrome di Kearns-Sayre)	Atassia, neuropatia, PEO, deaerazione retinale pigmentosa, cardiomiopatia, bassa statura.
Sindrome di Pearson	Morte frequente nell'infanzia, anemia, vacuolarizzazione dei precursori del midollo.
Oftalmoplegia esterna progressiva (PEO) sporadica	Ptosi bilaterale, oftalmoplegia, debolezza muscolare e intolleranza all'esercizio.

Tabella 1. 3: Malattie da mutazioni sporadiche dell'mtDNA (reviewed in Zeviani and Di Donato, 2004)

1.3.2 Mutazioni dell'mtDNA ad eredità materna

Le mutazioni dell'mtDNA ad eredità materna sono tipicamente mutazioni puntiformi dell'mtDNA, che vengono trasmesse dalla madre al figlio. Visto il numero elevato di polimorfismi dell'mtDNA, risulta spesso difficile determinare se una mutazione puntiforme nell'mtDNA è patologica. Alcune caratteristiche sono presenti generalmente nelle mutazioni patologiche:

- mutazione che cambia un aminoacido (o un nucleotide) molto conservato nell'evoluzione, oppure che introduce un codone di stop in un gene mitocondriale codificante una proteina;
- segregazione col fenotipo patologico;
- correlazione quantitativa fra fenotipo clinico e grado di eteroplasmia (per mutazioni eteroplasmiche);
- presenza della mutazione in famiglie derivanti da popolazioni etnicamente distinte (Zeviani and Carelli, 2003)

Le mutazioni più frequenti mappano in geni per i tRNA mitocondriali. Queste mutazioni riducono l'espressione delle proteine mitocondriali, e portano ad una riduzione di tutte le attività enzimatiche a codificazione mitocondriale. Altre mutazioni mappano in geni codificanti proteine, e in questo caso si ha una riduzione dell'attività specifica di quella proteina (Mariotti *et al.*, 1994).

Le mutazioni ereditate per via materna sono per lo più eteroplasmiche, e si manifestano in generale quando viene superato l'effetto soglia, che ad esempio per mutazioni nei geni per tRNA è dell'80-90%. Alcune mutazioni sono invece omoplasmiche. In contrasto con le mutazioni eteroplasmiche, le mutazioni omoplasmiche coinvolgono uno o pochi tessuti. Inoltre la mutazione non è sufficiente di per sé a causare il fenotipo patologico, che è invece influenzato da fattori ambientali, e dal *background* genetico, nucleare e/o mitocondriale (Howell and Mackey, 1998).

Le patologie più comuni associate a mutazioni ad eredità materna sono riassunte in tabella 1.4.

Sindrome da mutazioni eteroplasmiche	Fenotipi clinici
Encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica e <i>stroke-like episodes</i> (MELAS)	Lesioni del cervello nei lobi parieto-occipitali, acidosi lattica e fibre “ <i>red ragged</i> ”
Epilessia mioclonica con fibre “ <i>red ragged</i> ”	Mioclono, epilessia, debolezza muscolare, affaticamento, fibre “ <i>red ragged</i> ”, atassia cerebellare, sordità e demenza
Debolezza neurogenica, atassia e retinite pigmentosa (NARP)	Atassia, retinopatia pigmentosa, neuropatia periferica e debolezza neurogenica distale
Perdita di udito-atassia-mioclono	Perdita di udito, mioclono, epilessia, atassia e miopia
Sindrome da mutazioni omoplasmiche	Fenotipi clinici
Neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON)	Perdita della visione centrale e microangiopatia circumpapillare
Perdita di udito sensoriale neurale non-sindromica e indotta da amino glicoside (SNLH)	Perdita di udito

Tabella 1. 4: Malattie da mutazioni eteroplasmiche ed omoplasmiche ad eredità materna (reviewed in Zeviani and Di Donato, 2004).

1.3.3 Mutazioni ad eredità mendeliana associate ad instabilità dell'mtDNA

Le malattie ad eredità mendeliana associate a instabilità dell'mtDNA sono dovute a mutazioni in geni nucleari codificanti proteine mitocondriali fondamentali per la stabilità dell'mtDNA. La scoperta che mutazioni in geni nucleari potessero determinare patologie mitocondriali è stata fatta nel 1989 da Zeviani (Zeviani *et al.*, 1989). Mutazioni in uno di questi geni causano instabilità dell'mtDNA, in generale delezioni multiple e/o deplezione, cioè riduzione del numero di copie. A differenza di mutazioni mitocondriali, in questo caso le mutazioni in geni nucleari sono la causa primaria della patologia, mentre la causa secondaria sono le mutazioni del DNA mitocondriale causate dal difetto del prodotto genico nucleare (Zeviani *et al.*, 1995; Gasser *et al.*, 2001). La caratterizzazione molecolare delle specie di mtDNA anomale, mediante analisi di PCR e *Southern-blot*, ha stabilito che la regione del mtDNA maggiormente colpita da delezioni è quella compresa tra l'origine di replicazione del filamento pesante e l'origine di replicazione del filamento leggero (Zeviani *et al.*, 1995). Il D-loop è conservato in tutte le specie mutanti. Inoltre i riarrangiamenti avvengono tra ripetizioni dirette fiancheggianti di varia lunghezza. Per quanto riguarda la distribuzione delle mutazioni, le delezioni sono più abbondanti nei tessuti post-mitotici caratterizzati da un'alta dipendenza dalla produzione energetica aerobica (Zeviani *et al.*, 1995).

Una caratteristica delle patologie caratterizzate da mutazioni in geni nucleari associate o meno ad instabilità dell'mtDNA consiste nel fatto che spesso una mutazione può causare un diverso quadro clinico o addirittura una diversa patologia, e, viceversa, una stessa patologia può essere causata da mutazioni in geni diversi. Le patologie causate da mutazioni in geni nucleari associate ad instabilità nell'mtDNA condividono molte caratteristiche con le patologie sporadiche. Anche in questo caso infatti i sintomi sono multisistemici e progressivi, e la sintomatologia subentra quando viene superato l'effetto soglia.

I geni responsabili di patologie associate ad instabilità dell'mtDNA e le corrispondenti patologie sono riportate in tabella 1.5.

Gene	Sindrome	Fenotipi clinici
POLG (subunità catalitica della DNA polimerasi mitocondriale)	PEO autosomica dominante (adPEO), PEO autosomica recessiva (arPEO), PEO sporadica	Delezioni multiple dell'mtDNA, PEO, debolezza muscolare, atassia depressione, ipogonadismo, perdita di udito, neuropatia periferica
	Sindrome da atassia-neuropatia (ANS)	Delezioni multiple dell'mtDNA, neuropatia periferica, disartria, difetti cognitivi di media gravità, movimenti involontari, sintomi psichiatrici, mioclono e attacchi epilettici
	Neuropatia atassica sensoriale, disartria e oftalmoparesi (SANDO)	Delezioni dell'mtDNA, neuropatia, disartria, oftalmoparesi, areflessia, depressione, emicrania, disfagia e nistagmo
	Sindrome di Alpers	Deplezione dell'mtDNA, atrofia del cervello, crisi epilettiche, regressione psicomotoria, proliferazione dei dotti biliari, fibrosi, cirrosi, crisi epatiche croniche, ipotonia, emiparesi e atassia
POLG2 (subunità accessoria della DNA polimerasi mitocondriale)	arPEO	
C10ORF2 (elicasi Twinkle)	arPEO	
ANT1 (ADP/ATP carrier)	adPEO e arPEO	
TP (timidina fosforilasi)	Encefalomiopatia mitocondriale neuro-gastrointestinale (MNGIE) dominante o recessiva	Delezioni multiple e deplezione dell'mtDNA, oftalmoparesi, neuropatia periferica, leucoencefalopatia, sintomi gastrointestinali
TK2 (timidina chinasi mitocondriale)	Miopatia infantile	Deplezione dell'mtDNA, miopatia congenita infantile con o senza sindrome renale
DGUOK (guanosina chinasi mitocondriale)	Epatopatia infantile	Deplezione dell'mtDNA, epatopatia infantile, difetti epatici progressivi
SUCLA2 (subunità β della succinil-CoA sintetasi)	Encefalomiopatia	Ritardo psicomotorio, ipotonia e riduzione dell'udito
MPV17 (funzione sconosciuta)	Sindrome da deplezione dell'mtDNA epatocerebrale	Deplezione dell'mtDNA, ipoglicemia grave, ittero, elevati livelli di lattato nel sangue e fibrosi progressiva del fegato.

Tabella 1. 5: Principali malattie da mutazioni nucleari associate ad instabilità dell'mtDNA (reviewed in Zeviani and Di Donato, 2004; Alberio *et al.*, 2007; Zeviani and Carelli, 2007).

1.3.4 Mutazioni ad eredità mendeliana non associate ad instabilità dell'mtDNA

L'ultima classe di mutazioni che causano patologie mitocondriali comprende mutazioni in geni nucleari non associate ad instabilità dell'mtDNA. In questo caso la patologia è dovuta alla mutazione nucleare in sé, che inibisce il processo della fosforilazione ossidativa o, più in generale, il metabolismo mitocondriale. A seconda della funzione del prodotto genico, questa classe può essere divisa in quattro sottoclassi:

- 1) Mutazioni in geni codificanti proteine dei complessi respiratori.
- 2) Mutazioni in geni codificanti proteine coinvolte nell'assemblaggio dei complessi respiratori.
- 3) Mutazioni in geni codificanti proteine coinvolte nella sintesi di componenti non proteiche della catena respiratoria.
- 4) Mutazioni in geni codificanti proteine indirettamente coinvolte nella fosforilazione ossidativa (Zeviani and Di Donato, 2004).

Mutazioni in uno di questi geni causano diverse patologie, fra cui le più comuni sono la sindrome di Leigh, il paraganglioma ereditario, la sindrome di Barth e l'atassia di Freidreich. Per i tipi di patologia mitocondriale, i fenotipi clinici e i geni coinvolti nella patologia si rimanda al database MITOMAP (www.mitomap.org).

1.4 DNA polimerasi γ (Pol γ)

Il DNA mitocondriale, nei funghi e negli animali, è replicato ad opera della DNA polimerasi γ (Pol γ). Allo stato attuale, la polimerasi γ è l'unica polimerasi eucariotica ad essere stata identificata nei mitocondri di eucarioti superiori, indicando così che la polimerasi è necessaria in tutti i processi in cui è necessaria la sintesi di DNA, cioè replicazione, riparazione e ricombinazione dell'mtDNA. Come spiegato successivamente, la Pol γ è costituita da due subunità, una subunità catalitica e una subunità accessoria, mentre la Pol γ dei lieviti è costituita da una sola subunità.

1.4.1 Scoperta e struttura

La DNA polimerasi mitocondriale è stata identificata inizialmente nel 1970 come DNA polimerasi RNA-dipendente, incapace di utilizzare però RNA naturale come substrato (Temin and Mizutani, 1970; Baltimore, 1970). Nel 1975 la polimerasi venne ufficialmente chiamata DNA polimerasi γ , per distinguerle dalle due DNA polimerasi nucleari allora note, la DNA polimerasi α e β (Weissbach *et al.*, 1975). Soltanto nel 1977 venne identificata come polimerasi mitocondriale capace di replicare l'mtDNA (Bolden *et al.*, 1977; Hübscher *et al.*, 1979). Inoltre la polimerasi γ costituisce circa l'1-5%, a seconda dell'organismo, dell'attività DNA polimerasica totale di una cellula (Fry and Loeb, 1986; Kornberg and Baker, 1992).

Per quanto concerne la sequenza, il gene codificante Pol γ è stato dapprima identificato e clonato in *S. cerevisiae* e chiamato *MIP1* (**M**itochondrial **p**olymerase) (Foury, 1989).

Successivamente il gene codificante la subunità catalitica è stato identificato anche in *Homo sapiens*, in *Mus musculus*, in *Gallus gallus*, in *Xenopus laevis* e in *Drosophila melanogaster* (Ropp and Copeland, 1995; Ropp and Copeland, 1996; Ye *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1996). Dall'allineamento delle sequenze codificanti, è emerso che le polimerasi mitocondriali sono conservate, con un alto grado di similarità di sequenza, e che appartengono alla famiglia A delle polimerasi, a cui appartengono le polimerasi I di *E. coli*, la polimerasi I di *Bacillus stearothermophilus* e le polimerasi di *Thermus aquaticus* e del fago T7. In particolare le polimerasi mitocondriali costituiscono, nella famiglia A, una sottofamiglia, la sottofamiglia γ . Come le polimerasi sopra elencate, la subunità catalitica di Pol γ è costituita da due domini: un dominio N-terminale con attività 3'-5' esonucleasica, a cui è affidata l'attività di *proofreading* durante la replicazione, e un dominio C-terminale con attività polimerasica (Ito and Braithwaite, 1990). Più recentemente, nelle polimerasi animali, è stata identificata una terza attività, la 5'-deossiribosio fosfato (dRP) liasi, coinvolta nella *base excision repair* (Pinz and Bogenhagen, 1998; Pinz and Bogenhagen, 2000; Longley *et al.*, 1998a). Inoltre i due domini sono separati da una regione chiamata regione *linker* o *spacer*, di lunghezza variabile, da 337 residui in lievito a 482 residui nell'uomo.

Dall'allineamento di numerose polimerasi γ è emerso inoltre che esistono sei motivi di sequenza altamente conservati in tutte le polimerasi mitocondriali. Nel dominio esonucleasico sono presenti i motivi ExoI, ExoII ed ExoIII, mentre nel dominio polimerasico sono presenti i motivi PolA, PolB e PolC (figura 1.10). I sei motivi svolgono un ruolo diretto nella catalisi dell'attività esonucleasica e polimerasica.

(a) Exonuclease Domain																																									
Motif I							Motif II							Motif III																											
<i>H. s.</i>	196*	V	F	D	V	E	V	-	201	265	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	278	395	-	Y	C	A	Q	D	V	W	A	T	H	-	404
<i>R. n.</i>	179	V	F	D	V	E	V	-	184	248	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	261	377	-	Y	C	A	R	D	V	W	A	T	F	-	386
<i>M. m.</i>	179	V	F	D	V	E	V	-	184	248	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	261	377	-	Y	C	A	R	D	V	W	A	T	F	-	386
<i>X. l.</i>	170	V	F	D	V	E	V	-	175	239	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	252	369	-	Y	C	A	L	D	V	Q	A	T	H	-	378
<i>D. m.</i>	183	V	F	D	V	E	V	-	188	254	-	L	V	V	G	H	N	V	S	Y	D	R	A	R	L	-	267	363	-	Y	C	A	S	D	V	E	A	T	H	-	372
<i>N. c.</i>	187	C	F	D	V	E	V	-	192	240	-	I	I	V	G	H	N	I	G	Y	D	R	A	K	I	-	253	373	-	Y	C	A	A	D	V	Q	V	T	H	-	382
<i>S. p.</i>	169	V	F	D	V	E	V	-	174	220	-	L	F	V	G	H	N	V	S	F	D	R	Q	R	I	-	233	351	-	Y	C	A	H	D	T	Y	S	T	H	-	360
<i>S. c.</i>	169	V	F	D	V	E	V	-	174	221	-	V	I	I	G	H	N	V	A	Y	D	R	A	R	V	-	234	343	-	Y	C	A	T	D	V	T	A	T	S	-	352

(b) Polymerase Domain																																													
Motif A							Motif B							Motif C																															
<i>H. s.</i>	886	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-	899	946	A	K	I	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-	958	1132	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-	1140
<i>R. n.</i>	863	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-	876	924	A	K	I	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-	936	1109	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-	1117
<i>M. m.</i>	863	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-	876	923	A	K	V	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-	935	1110	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-	1118
<i>X. l.</i>	856	L	I	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-	869	916	A	K	V	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-	928	1101	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-	1109
<i>D. m.</i>	804	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-	817	864	A	K	V	I	N	Y	A	R	I	Y	G	A	G	-	876	1036	S	F	H	D	E	L	R	Y	L	-	1044
<i>N. c.</i>	736	F	V	G	A	D	V	D	S	E	E	L	W	I	A	-	849	795	A	K	V	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-	807	938	T	V	H	D	E	I	R	Y	L	-	946
<i>S. p.</i>	677	F	V	G	A	D	V	D	S	E	E	L	W	I	V	-	690	736	A	K	V	F	N	Y	G	R	L	Y	G	A	G	-	748	885	T	V	H	D	E	V	R	Y	L	-	893
<i>S. c.</i>	689	F	V	G	A	D	V	D	S	E	E	L	W	I	A	-	702	748	A	K	I	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-	760	889	S	I	H	D	E	I	R	F	L	-	897

* Codon number

Figura 1. 10: Sequenze dei motivi ExoI, II e III, e PolA, B e C (da Graziewicz *et al.*, 2006). I motivi sono evidenziati in colore. In nero i residui conservati, in rosso i residui non conservati. H. s. indica *Homo sapiens*, R. n. *Rattus norvegicus*, M. m. *Mus musculus*, X. l. *Xenopus laevis*, D. m. *Drosophila melanogaster*, N. c. *Neurospora crassa*, S. p. *Schizosaccharomyces pombe*, S. c. *Saccharomyces cerevisiae*.

Oltre ai sei motivi sopra riportati, sono stati identificati altri sei elementi, chiamati $\gamma 1$ - $\gamma 6$, conservati nei vertebrati, debolmente conservati negli insetti e assenti negli eucarioti inferiori (Kaguni, 2004) (figura 1.11).

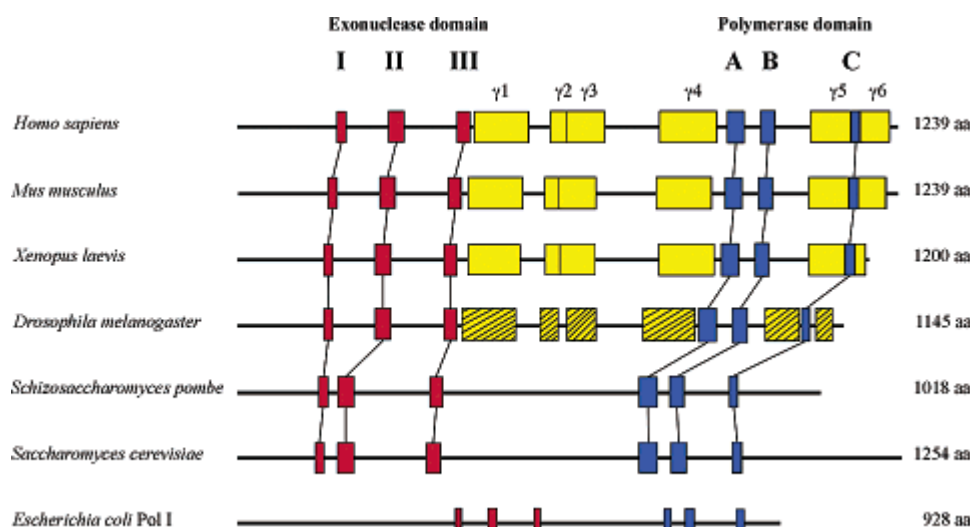


Figura 1. 11: Struttura lineare schematica delle subunità catalitiche di Pol γ di diversi organismi (da Graziewicz *et al.*, 2006). In rosso i motivi ExoI, II e III, in blu i motivi PolA, B e C, in giallo i motivi $\gamma 1$ - $\gamma 6$, in giallo a righe i motivi $\gamma 1$ - $\gamma 6$ di *Drosophila melanogaster*.

I motivi $\gamma 1$ - $\gamma 4$ sono situati nella regione linker, mentre i motivi $\gamma 5$ - $\gamma 6$ sono situati nel dominio polimerasico, rispettivamente a monte e a valle del motivo PolC. Come dimostrato recentemente, i motivi $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 4$ della Pol γ di *Drosophila* giocano un ruolo importante nell'attività polimerasica e mutazioni in questi motivi causano una riduzione dell'affinità di legame per il DNA, dell'attività polimerasica o della processività (Luo and Kaguni, 2005).

Allo stato attuale non è disponibile la struttura di alcuna polimerasi γ . Copeland ha comunque sviluppato un modello della struttura del dominio polimerasico della subunità catalitica di Pol γ umana (residui 871-1145) basato sulle strutture presenti in banche dati del *Klenow fragment*, della KlenTaq polimerasi I di *T. aquaticus*, del frammento largo della polimerasi I di *B. stearothermophilus* e della polimerasi del fago T7 (Bienstock and Copeland, 2004; Graziewicz *et al.*, 2004). (figura 1.12). Dalla struttura emergono chiaramente i tre subdomini tipici delle DNA polimerasi, i subdomini *thumb*, *fingers* e *palm*.

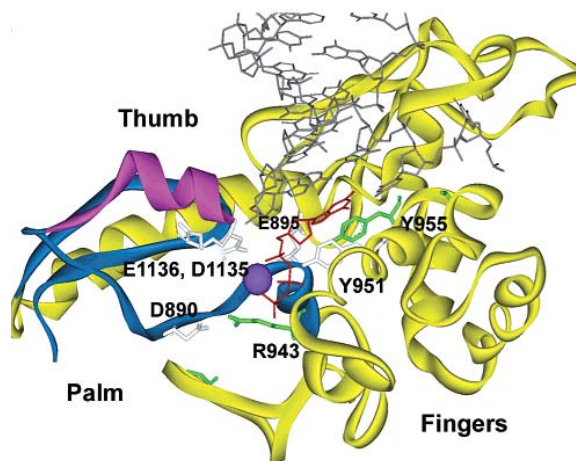


Figura 1. 12: Modello della struttura del dominio polimerasico (residui 871-1145) della polimerasi γ umana (da Graziewicz *et al.*, 2006). In magenta il subdominio *thumb*, in giallo il subdominio *fingers* e in blu il subdominio *palm*. In grigio il template e il primer, in rosso il ddGTP entrante e in porpora lo ione Mg^{2+} .

Come detto in precedenza, le polimerasi animali sono costituite anche da una subunità accessoria. La subunità accessoria è stata dapprima clonata in *Drosophila*, e successivamente in altri eucarioti superiori (Wang *et al.*, 1997b). L'allineamento di sequenza ha mostrato che la similarità di sequenza fra le varie subunità accessorie è scarsa. L'unica regione conservata comprende un frammento di circa 120 residui situato al C-terminale. Recentemente è stata determinata la struttura della subunità accessoria di topo, che ha mostrato una notevole somiglianza strutturale con le aminoacil-tRNA sintetasi di classe IIa (Carrodegua *et al.*, 2001).

Recentemente è stato dimostrato che l'oloenzima della polimerasi γ umana è un eterotrimerico costituito da una subunità catalitica e due subunità accessorie (Yakubovskaya *et al.*, 2006), mentre l'oloenzima della polimerasi γ di *Drosophila* è un eterodimero costituito da una subunità catalitica e una subunità accessoria (Kaguni, 2004). Studi su mutanti hanno determinato che la regione *linker* della subunità catalitica è responsabile del legame con la subunità accessoria. In particolare, in *Drosophila* i motivi $\gamma 1$ e $\gamma 4$ sono responsabili dell'interazione con la subunità accessoria (Fan and Kaguni, 2001).

1.4.2 Proprietà biochimiche di Pol γ

La polimerasi γ , al contrario della maggior parte delle altre polimerasi, è in grado di utilizzare diversi template: DNA naturale, DNA omopolimerico costituito da poli(dC)-oligo(dG) o poli(dA)-oligo(dT) e DNA-RNA omopolimerico costituito da poli(rA)-oligo(dT). Ad esempio la Pol γ umana, su un template poli(dA)-oligo(dT), possiede *in vitro* una K_m di 4 μM e una k_{cat} di 0,28 s^{-1} (Lim *et al.*, 1999), mentre la Pol γ di *Drosophila*, su un template di *calf thymus* DNA attivato dalla DNasi I, possiede una K_m di 12,5 μM e una k_{cat} di 3,1 s^{-1} (Wernette *et al.*, 1988). Inoltre l'attività catalitica è più elevata a pH compreso fra 7,5 e 9,5, è stimolata da concentrazioni medie o elevate di sale (75-200 mM, a seconda delle condizioni e del template) e, al contrario delle polimerasi nucleari, è inibita da N-etilmaleimmide e da

dideossinucleotiditrifosfato, ma non dall'afidilcolina. Inoltre la polimerasi necessita, per catalizzare la sintesi di DNA *in vitro*, di uno ione bivalente, costituito da Mg^{2+} o Mn^{2+} .

Per quanto concerne la processività, essa è pari, *in vitro*, a 30 nucleotidi per la subunità catalitica della Pol γ di *Drosophila* (Wernette *et al.*, 1988). L'aggiunta della subunità accessoria aumenta la processività fino a 1000 nucleotidi, dimostrando che una delle funzioni fondamentali della subunità accessoria è l'incremento della processività (Williams *et al.*, 1993). Anche la polimerasi umana mostra un incremento della processività in presenza della subunità accessoria, da 100 nucleotidi a 7000 nucleotidi (Lim *et al.*, 1999).

La subunità catalitica delle polimerasi animali possiede una bassa affinità per il DNA templato, che è notevolmente incrementata, di 10-100 volte, dalla presenza della subunità accessoria (Wang and Kaguni, 1999; Lim *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000a; Carrodegua *et al.*, 1999).

Il DNA mitocondriale deve essere replicato fedelmente, in quanto mutazioni nell'mtDNA sono responsabili di diverse patologie mitocondriali, nonché dell'invecchiamento. La Pol γ è una replicasi fedele, con una frequenza di errore *in vitro* di circa $2-4 \times 10^{-6}$ per nucleotide in condizioni ottimali (Kunkel and Mosbaugh, 1989; Kunkel and Soni, 1988). Un contributo di circa 100 volte alla fedeltà di replicazione è conferito dal dominio esonucleasico. La subunità catalitica della polimerasi umana è altamente accurata, con una frequenza di errore di 1 su 500000 nucleotidi (Longley *et al.*, 2001). La fedeltà è influenzata da diversi fattori, fra cui la concentrazione di sali, la presenza di basi ossidate sul template e uno sbilanciamento delle concentrazioni dei dNTP. Inoltre la presenza di regioni omopolimeriche incrementa la frequenza di *frameshift*, suggerendo che la presenza di regioni omopolimeriche sull'mtDNA possa essere fonte di mutazioni. La presenza della subunità accessoria, se da un lato incrementa la processività e l'affinità per il DNA, dall'altro riduce la fedeltà, sia per quanto riguarda la frequenza di sostituzioni che di *frameshift* (Longley *et al.*, 2001).

Per quanto concerne l'attività esonucleasica, essa è in grado di rimuovere l'ultimo nucleotide incorporato in un template a doppio filamento che presenta un *mismatch* in 3'. In particolare il dominio esonucleasico riconosce un *mismatch* rispetto ad un appaiamento corretto con una frequenza da 5 a 34 volte superiore, a seconda del tipo di *mismatch* (Longley *et al.*, 1998b; Kaguni and Olson, 1989; Insdorf and Bogenhagen, 1989; Longley and Mosbaugh, 1991; Olson and Kaguni, 1992). Come le polimerasi della famiglia A, è inoltre in grado di degradare DNA a singolo filamento.

Per quanto concerne l'attività dRP liasica, essa è intrinseca al dominio polimerasico ed è in grado di rimuovere lo zucchero in 5' di un sito apurinico precedente tagliato da un'AP endonucleasi (Longley *et al.*, 1998a). La polimerasi γ svolge dunque un ruolo diretto nella BER, in quanto dopo la rimozione dello zucchero in 5' inserisce in 3' un nuovo nucleotide, che può essere poi legato al nucleotide in 5' mediante una reazione catalizzata dalla ligasi. Anche l'attività liasica viene stimolata dalla subunità accessoria (Pinz and Bogenhagen, 2006).

1.4.3 Regolazione della polimerasi γ

La replicazione dell'mtDNA, che avviene lungo tutto il ciclo cellulare, richiede la presenza costante della polimerasi γ . La quantità della polimerasi γ presente nella cellula è fondamentale. E' stato dimostrato che se da un lato la delezione del gene codificante la polimerasi γ in lievito porta alla perdita dell'mtDNA, l'overespressione della Pol γ in *Drosophila* e in cellule in coltura porta ad una deplezione dell'mtDNA (Genga *et al.*, 1986; Lefai *et al.*, 2000, Martínez-Azorín *et al.*, 2007). Anche l'overespressione in lievito porta ad un notevole incremento dei *petite* (dati non pubblicati). Poche informazioni sono note circa la regolazione dei geni codificanti per la Pol γ . E' noto comunque che la polimerasi, in lievito e in cellule umane in coltura, è presente sia in presenza che in assenza di DNA, indicando che la polimerasi è espressa e stabile anche in assenza di mtDNA (Genga *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1996). Inoltre la polimerasi è presente anche in mitocondri non in replicazione (Davis *et al.*, 1996).

1.4.4 Replicazione del DNA mitocondriale

La DNA polimerasi γ svolge un ruolo fondamentale nella replicazione del DNA mitocondriale. D'altra parte la replicazione del DNA mitocondriale, così come la replicazione di qualsiasi tipo di DNA, richiede la partecipazione di diversi enzimi o proteine strutturali. Inoltre l'inizio della replicazione necessita sia di specifici elementi di sequenza presenti sull'mtDNA sia di opportune proteine che permettano alla DNA polimerasi γ di accedere al template. Di seguito verrà descritto brevemente il processo di replicazione dell'mtDNA nell'uomo e nel lievito.

Replicazione dell'mtDNA nell'uomo. La caratteristica peculiare della replicazione dell'mtDNA di mammiferi consiste nel fatto che essa è continua e asimmetrica, sia nello spazio che nel tempo. Questo significa in primo luogo che ogni singolo filamento è sintetizzato in maniera continua, senza la presenza di frammenti di Okazaki, al contrario della replicazione del DNA nucleare, che è semidiscontinua, in cui, in ogni forca replicativa, un filamento è sintetizzato in maniera continua (*leading strand*) mentre l'altro è sintetizzato in maniera discontinua (*lagging strand*). In secondo luogo, la sintesi dei due filamenti inizia a partire da origini diverse (asimmetria spaziale) e in tempi diversi (asimmetria temporale).

I meccanismi della replicazione del DNA mitocondriale di mammifero sono conosciuti, sebbene recenti osservazioni di cui verrà detto successivamente suggeriscono che la replicazione possa procedere anche in modo diverso. Il DNA mitocondriale di mammiferi contiene due regioni che fungono da siti di inizio di trascrizione chiamati HSP (*heavy strand promoter*) e LSP (*light strand promoter*), tra i quali è situata una regione non codificante. Da ciascun promotore viene sintetizzato un filamento di RNA che funge da primer per la sintesi del filamento L e H, rispettivamente.

Le caratteristiche della replicazione sono riportate in figura 1.13.

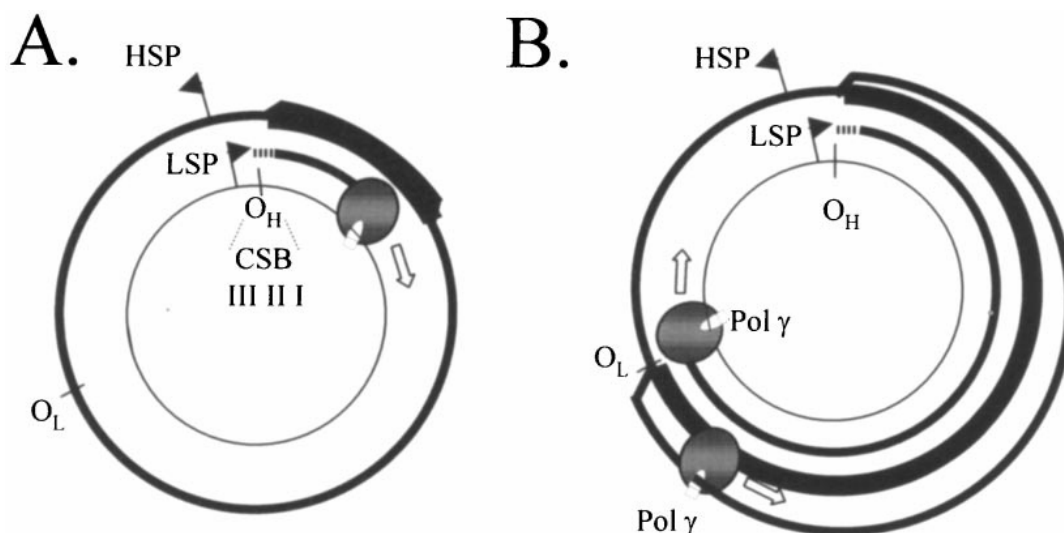


Figura 1. 13: Rappresentazione schematica della replicazione dell'mtDNA umano. Le linee circolari sottili rappresentano il filamento L, le linee circolari spesse il filamento pesante. Le linee tratteggiate indicano il primer di RNA processato. Le frecce bianche indicano la direzione della replicazione. Le frecce nere rappresentano la direzione della trascrizione a partire da HSP e LSP; (A) Inizio della sintesi del filamento H; (B) Inizio della replicazione del filamento L e continuazione della sintesi del filamento H. (da Lecrenier and Foury, 2000).

Dapprima viene sintetizzato un nuovo filamento H. Dall'LSP, usando come template il filamento L, viene sintetizzato un primer di RNA che, in corrispondenza di O_H , l'origine di replicazione del filamento H, viene opportunamente processato. L'RNA processato funge da primer per la polimerasi γ che sintetizza un nuovo filamento H usando come template il filamento L parentale. Man mano che la sintesi procede, il filamento H parentale emerge come regione a singolo filamento, nella regione chiamata *D-loop* o ansa di dislocazione. Quando la sintesi del nuovo filamento H, e dunque la dislocazione del filamento H parentale, giunge in corrispondenza di O_L , inizia la sintesi del nuovo filamento L. O_L consiste di un'origine di replicazione di circa 30 bp situata in una regione contenente numerosi geni per tRNA. Come per la sintesi del filamento H da O_H , la sintesi del filamento L richiede la presenza di un primer di RNA. La sintesi del filamento H finisce quando la polimerasi giunge in corrispondenza di O_H , mentre la sintesi del filamento L finisce successivamente quando la polimerasi giunge in corrispondenza di O_L (reviewed in Lecrenier and Foury, 2000).

Nel processo di replicazione, oltre alla polimerasi γ , sono coinvolte numerose proteine:

- la RNA polimerasi mitocondriale, codificata dal gene h-mtRPOL (Tiranti *et al.*, 1997), sintetizza l'RNA che fungerà da primer in corrispondenza di LSP.
- il fattore di trascrizione mtTFA, codificato dal gene h-mtTFA, è fondamentale affinché la RNA polimerasi mitocondriale inizi la trascrizione ad alta efficienza. Infatti mtTFA promuove l'inizio della trascrizione legandosi, piegando e svolgendo il DNA e reclutando altri fattori di replicazione in corrispondenza del *D-loop* (Fisher *et al.*, 1992; Ghivizzani *et al.*, 1994). L'importanza del fattore mtTFA nel mantenimento dell'mtDNA è dimostrata dal fatto che topi *knock out* eterozigoti mostrano una riduzione del numero di copie di mtDNA (Larsson *et al.*, 1998).

- i fattori di specificità TFB1M e TFB2M sono coinvolti anch'essi nella replicazione e interagiscono con mtTFA e la RNA polimerasi (Falkenberg *et al.*, 2002; McCulloch *et al.*, 2002).
- endo G è una RNasi che localizza nel mitocondrio dei mammiferi ed è in grado di degradare l'RNA in un duplex RNA:DNA. L'enzima è necessario per il rimaneggiamento dell'RNA in corrispondenza delle origini di replicazione (Prats *et al.*, 1997).
- l'RNasi MRP taglia anch'esso l'RNA in un duplex RNA:DNA. Nonostante l'RNasi MRP localizzi principalmente nel nucleo, essa è presente anche nel mitocondrio (Li *et al.*, 1994).
- mentre l'RNA che funge da innesco per la sintesi del filamento H viene sintetizzato a partire da LSP dalla RNA polimerasi, l'RNA necessario per la sintesi del filamento L necessita di una primasi, necessaria per la sintesi di RNA in corrispondenza di O_L. Il gene codificante la primasi non è ancora stato identificato, ma nel 1985 è stata identificata una primasi putativa mitocondriale con un componente di RNA (Wong and Clayton, 1985a; Wong and Clayton, 1985b).
- la proteina legante il DNA a singolo filamento mitocondriale (mtSSB) è una proteina che, legando il DNA a singolo filamento ad alta affinità, promuove la destabilizzazione dell'elica necessaria per il successivo svolgimento ad opera delle elicasi. *In vivo*, la mtSSB agisce come tetrametro, ciascuno dei quali è in grado di legare una regione di 8-17 nucleotidi (Yang *et al.*, 1997; Thömmes *et al.*, 1995).
- la 5'-3' elicasi Twinkle, codificata dal gene C10ORF2 o *TWINKLE*, è responsabile dello svolgimento nella direzione 5'-3' del DNA, necessario per la sintesi dell'mtDNA. Twinkle condivide un'elevata similarità di sequenza con la regione C-terminale dell'elicasi-primasi del fago T7. Come l'elicasi-primasi del fago T7, Twinkle possiede cinque motivi di sequenza delle elicasi, ma è assente un dominio primasico. Twinkle è fondamentale non solo per il mantenimento dell'mtDNA, ma anche per la regolazione del numero di copie di mtDNA, in quanto topi overesprimenti Twinkle mostrano un aumento del numero di copie di circa tre volte, mentre cellule in cui l'espressione di Twinkle viene ridotta mostrano una forte riduzione del numero di copie di mtDNA (Tyynismaa *et al.*, 2004).
- le topoisomerasi I e III α sono coinvolte nel rilassamento del DNA durante la replicazione. In particolare la topoisomerasi mitocondriale I rilassa i *supercoil* negativi e rimuove i *supercoil* positivi generati dall'attività elicasica (Zhang *et al.*, 2001).
- la ligasi III, codificata dal gene LIGIII, è fondamentale nel processo di replicazione, in quanto ha il compito di legare l'estremità 3' del filamento neosintetizzato con l'estremità 5'. Cellule umane in coltura con una ridotta espressione di ligasi mostrano una riduzione del contenuto di mtDNA (Lakshmipathy and Campbell, 2001).

Come detto in precedenza, recenti osservazioni hanno portato ad ipotizzare altri meccanismi di replicazione (Holt *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Bowmaker *et al.*, 2003). In questi esperimenti venivano identificati due tipi di intermedi di replicazione. Il primo tipo era

resistente al taglio con nucleasi che tagliano DNA a singolo filamento e aveva mobilità su gel tipico di intermedi contenenti un *leading* e un *lagging strand*. Questi intermedi sono incompatibili con la teoria “discontinua e asimmetrica” e prevedono un modello simile a quello della replicazione nucleare, cioè semidiscontinuo e simmetrico. Secondo questo modello, esistono diverse origini di replicazione situate in una regione di circa 4 Kb situata a valle del D-loop (Yasukawa *et al.*, 2005).

Replicazione dell’mtDNA in *S. cerevisiae*. La replicazione dell’mtDNA di *S. cerevisiae*, non ancora del tutto compresa, è semidiscontinua e simmetrica, con la contemporanea sintesi, in corrispondenza della forca replicativa, di un *leading strand* e di un *lagging strand*. La piena comprensione dei meccanismi di replicazione è resa difficile dal fatto che diversi ceppi di *S. cerevisiae* presentano mtDNA di diversa lunghezza, con un numero di origini di replicazione variabili. Inoltre sono state identificate in cellule in divisione sia molecole circolari di mtDNA sia molecole lineari, che spesso formano concatenameri (Bendich, 1996; Nosek and Tomaska, 2003).

Sulla base del tipo di ceppo, il genoma mitocondriale di *S. cerevisiae* contiene sette-otto origini di replicazione, di cui solo quattro sono funzionali in quanto contengono un sito di inizio di trascrizione necessario per la sintesi dell’RNA che funge da innesco per la sintesi di DNA e sono chiamate ori1, ori2, ori3 e ori5 (Baldacci *et al.*, 1984). Le origini di replicazione sono inoltre bidirezionali. Nello specifico le quattro origini di replicazione funzionali sono lunghe 300 bp e sono costituite da tre cluster GC ripetuti, chiamati C, B e A e separati da sequenze ricche in AT. Il *cluster* C è sempre preceduto nelle origini funzionali da un sito di inizio trascrizione chiamato *r* (Foury *et al.*, 1998).

Lo schema della replicazione a partire da un’origine di replicazione e i dettagli della replicazione sono riportati in figura 1.14.

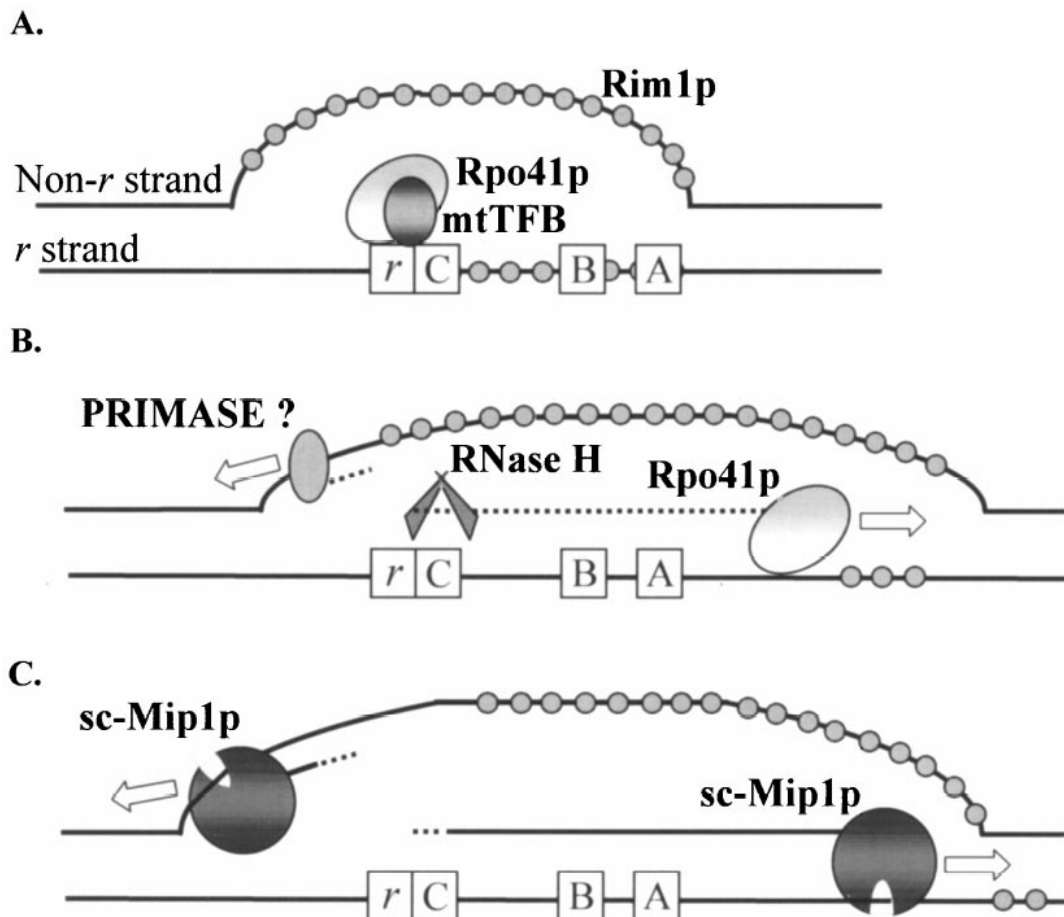


Figura 1. 14: Rappresentazione schematica della replicazione dell'mtDNA di *S. cerevisiae*. Le linee continue rappresentano filamenti di DNA, le linee tratteggiate filamenti di RNA. La regione compresa fra il sito *r* e il cluster A rappresenta l'origine di replicazione. Le frecce bianche rappresentano la direzione in cui la DNA polimerasi sintetizza nuovo DNA; (A) La RNA polimerasi Rpo41 sintetizza un filamento di RNA usando come template lo *strand r* a partire dal sito di trascrizione *r*. Il DNA a singolo filamento viene legata dalla proteina legante il DNA a singolo filamento Rim1; (B) L'RNasi H processa l'RNA sintetizzato da Rpo41 in corrispondenza del cluster C. Una primasi sintetizza un RNA usando come template lo *strand non-r*; (C) La DNA polimerasi usa gli inneschi di RNA per sintetizzare il DNA; la sintesi è bidirezionale. (da Lecrenier and Foury, 2000).

Per quanto concerne le proteine coinvolte nel processo di replicazione, diverse proteine sono omologhe alle proteine umane riportate in precedenza. Come l'inizio della trascrizione a partire da O_H nell'uomo richiede la presenza della RNA polimerasi e di fattori di trascrizione, così nel lievito l'inizio della trascrizione, necessaria per la sintesi dell'innesco di RNA, richiede la presenza della RNA polimerasi mitocondriale Rpo41, ortologo funzionale di h-mtRPOL, e del fattore di trascrizione Abf2. Abf2 è una proteina che condivide il 21% di identità di sequenza con h-mtTFA ed è in grado di legare, piegare e introdurre superavvolgimenti negativi nel DNA (Fisher *et al.*, 1992). Sebbene le due proteine siano omologhe, diversi studi hanno dimostrato che Abf2 ha un ruolo limitato nell'inizio della trascrizione, e che serve piuttosto per la stabilità dell'mtDNA, per il mantenimento del numero di copie, e per la trasmissione delle molecole alla progenie (MacAlpine *et al.*, 1998; Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1998). Nell'inizio della trascrizione è inoltre coinvolto il fattore di specificità mtTFB, necessario per il legame della RNA polimerasi al promotore e dunque per

la specificità di inizio (Schinkel *et al.*, 1987; Xu and Clayton, 1992). Inoltre, le molecole ρ^- non necessitano della presenza di Rpo41 per essere replicati, tanto che ceppi ρ^- , anche ipersoppressivi, deleti in *RPO41* mantengono l'mtDNA (Fangman *et al.*, 1990; Lorimer *et al.*, 1995). E' probabile che i ceppi ρ^- replichino il loro mtDNA in maniera RNA polimerasi indipendente, ad esempio mediante l'uso di una primasi, come per il filamento non-*r*, o mediante processi di ricombinazione.

Come la sintesi a partire dall'origine O_L necessita di una primasi per la sintesi dell'innesco di RNA, la sintesi del filamento non-*r* in lievito richiede anch'essa la presenza di una primasi che non è stata ancora clonata (Baldacci *et al.*, 1984). Inoltre, come nell'uomo, l'RNA sintetizzato dalla RNA polimerasi o dalla primasi deve essere processato. Nel lievito l'RNA viene processato dalla RNasi MRP, contenente una componente di RNA (Stohl and Clayton 1992; Lee and Clayton, 1998).

Il DNA a singolo filamento che si forma in corrispondenza della forca di replicazione viene legato, come nell'uomo, da una proteina SSB, codificata, in lievito, dal gene *RIM1* (Van Dick *et al.*, 1992). Come l'ortologo umano, Rim1p agisce come tetrametro.

Come nella replicazione dell'mtDNA umano sono coinvolte topoisomerasi, elicasi e una ligasi. Per quanto concerne le elicasi, l'elicasi Pif1 sembra essere coinvolta nei processi di ricombinazione, mentre l'elicasi Hmi1 è direttamente coinvolta nella replicazione (Sedman *et al.*, 2000). La ligasi Cdc9, che verrà descritta nel dettaglio successivamente, svolge un ruolo fondamentale nel processo di replicazione, in quanto ha il compito di ligare i frammenti di Okazaki sul *lagging strand*.

In conclusione è chiaro che i sistemi di replicazione dell'mtDNA nell'uomo e in *S. cerevisiae*, pur presentando elementi di diversità, mostrano numerose similitudini, in particolare la richiesta di specifiche proteine, la maggior parte delle quali sono omologhe fra lievito e uomo.

1.4.5 Ruolo della polimerasi γ nella riparazione

Poiché la polimerasi γ è l'unica polimerasi identificata nei mitocondri, almeno negli eucarioti superiori, essa è coinvolta, oltre che nella replicazione, in tutti i processi di riparazione mitocondriale che necessitano di sintesi *ex novo* di DNA. Il DNA mitocondriale presenta una frequenza di mutazioni puntiformi di circa 10 volte superiore rispetto al DNA nucleare (Brown *et al.*, 1979). Questa maggiore frequenza è dovuta al fatto che il DNA, in primo luogo, non è protetto da istoni e, in secondo luogo, come detto in precedenza, è maggiormente soggetto all'azione dei ROS, abbondanti nel mitocondrio. Inoltre il DNA mitocondriale è soggetto all'azione mutagenica di radiazioni ionizzanti e UV e di prodotti chimici. La frequenza di mutazioni è comunque ridotta grazie alla presenza di sistemi di riparazione presenti nei mitocondri, che verranno brevemente descritti (Graziewicz *et al.*, 2006).

BER. La *base excision repair*, o BER, è il principale meccanismo di riparazione attraverso il quale basi danneggiate vengono rimosse dal DNA mitocondriale. La BER inizia col riconoscimento di una base danneggiata ad opera di una specifica DNA glicosilasi. Nei mitocondri di mammiferi e di lievito sono state identificate diverse DNA glicosilasi, ognuna delle quali riconosce uno specifico tipo di base danneggiata. L'uracile DNA glicosilasi

riconosce residui di uracile, derivanti, in generale, dalla deaminazione ossidativa della citosina, e che potrebbe portare a sostituzioni GC→AT. La 8-oxoG DNA glicosilasi riconosce la 7,8-dididro-8-guanina (8-oxo-dG), la base che si forma con maggiore frequenza in seguito a danni ossidativi del DNA. La timina glicole DNA glicosilasi riconosce la timina glicole, derivante dall'ossidazione della timina. Inoltre sono state identificate DNA glicosilasi in grado di rimuovere basi metilate ed etilate. Una volta che la DNA glicosilasi si lega alla base danneggiata, essa catalizza l'idrolisi del legame N-glicosidico fra il deossiribosio e la base azotata, portando così alla formazione di un sito apurinico sul DNA.

Il sito apurinico viene riconosciuta da una specifica endonucleasi apurinica (AP endonucleasi) che catalizza l'idrolisi del legame fosfodiester fra l'OH in 3' e il fosfato del sito apurinico. Nei mitocondri esistono AP endonucleasi specifiche: nei mammiferi, le proteine Ape1 e Ape2, e, nel lievito, le proteine omologhe Apn1 e Apn2.

All'attività della AP endonucleasi, segue un'attività liasica 4' terminale 2-deossiribosio-5-fosfato (dRP liasi) che catalizza, mediante β -eliminazione, la rimozione dello zucchero fosfato in 5'. In concomitanza con la reazione di β -eliminazione avviene l'incorporazione del nucleotide ad opera della polimerasi γ , a cui segue la ligazione ad opera della DNA ligasi mitocondriale. In particolare la reazione di β -eliminazione può essere catalizzata dalla DNA polimerasi stessa, che, come detto, almeno nelle polimerasi animali, possiede un'attività dRP liasica. In particolare, è stato dimostrato che, *in vitro*, la Pol γ di *X. laevis* è in grado di rimuovere uracile dal DNA in presenza di una uracile DNA glicosilasi e di un'AP endonucleasi (Longley *et al.*, 1998a).

La BER può avvenire anche attraverso una via alternativa. Alcune DNA glicosilasi infatti, come Ntg1, Ntg2 e Ogg1 di lievito, posseggono anche un'attività AP liasica intrinseca. Esse, dopo la rimozione della base danneggiata, sono in grado di catalizzare la rimozione mediante β -eliminazione direttamente del 3' deossiribosio. Anche in questo caso segue direttamente l'incorporazione del nucleotide ad opera della DNA polimerasi γ e la ligazione.

Mismatch repair. Il *mismatch repair* (MMR), o riparazione di malappaiamenti, è il meccanismo attraverso il quale vengono riparati appaiamenti di coppie sbagliate, introdotte in generale durante la replicazione e non corrette dall'attività esonucleasica della DNA polimerasi γ . Mentre in tutti gli organismi esistono numerosi enzimi coinvolti nell'MMR del DNA nucleare, un'attività di MMR è stata isolata soltanto in *S. cerevisiae* e in *Schizosaccharomyces pombe*. Il gene *MSH1*, trattato successivamente, codifica infatti per una proteina mitocondriale, omologa a MutS di *E. coli*, in grado di riconoscere *mismatch* e di portare avanti la sostituzione mediante il reclutamento di altre proteine. Queste proteine catalizzano la rimozione del nucleotide sbagliato e di alcuni nucleotidi adiacenti, a cui segue l'incorporazione di nucleotidi ad opera di Pol γ e la ligazione ad opera della ligasi mitocondriale.

Recentemente è stata identificata un'attività MMR nei mitocondri di ratto, che, al contrario dell'attività di lievito, è bidirezionale (cioè sostituisce indipendentemente un nucleotide o il nucleotide sull'altro filamento) e *mismatch* selettivo, in quanto ripara soltanto *mismatch* GG e GT) (Mason *et al.*, 2003). D'altra parte l'attività di MMR identificata è meno attiva rispetto

all'attività di *mismatch* di *S. cerevisiae* (e in generale dell'attività nucleare) e inoltre non è stata identificata nessun enzima omologo a MutS, suggerendo che l'attività sia catalizzata da proteine con una diversa struttura e diversi meccanismi.

Ricombinazione. Nei mitocondri di lievito è presente un *pathway* di ricombinazione, coinvolgente numerose proteine e trattato successivamente, grazie al quale vengono anche riparati tagli a doppio filamento del DNA. Fra le proteine coinvolte vi sono l'endonucleasi cruciforme Cce1, la DNA elicasi Pif1, la 5'-3' esonucleasi Din7 e la proteina Mhr1. Mutazioni in questi geni aumentano la frequenza di mutanti *petite*, suggerendo che la ricombinazione è fondamentale per il mantenimento del genoma mitocondriale.

La ricombinazione è stata osservata anche in mitocondri di cellule di mammifero, sia *in vitro* che *in vivo*, sebbene a bassa frequenza, e a tutt'oggi non è noto il ruolo di questo processo di ricombinazione.

Sintesi translesione. Le polimerasi replicative, come Pol γ , sono in genere bloccate dalla presenza, sul template, di danni quali siti apurinici, basi ossidate o alchilate o dimeri di timina. Nel nucleo, in presenza di questi danni, intervengono polimerasi riparative, quali Pol zeta e Pol eta, che sono in grado di catalizzare la sintesi translesione, cioè di incorporare nucleotidi nella regione opposta alla lesione e dopo appaiamenti costituiti da una lesione e un nucleotide.

E' stato osservato che Pol γ umana è in grado di catalizzare la sintesi translesione in presenza di addotti DNA-platino. In presenza di un sito apurinico, la sintesi *in vitro* si interrompe la maggior parte delle volte ma, quando procede, porta all'incorporazione preferenziale di adenosina. Inoltre la polimerasi umana è in grado di compiere sintesi translesione, sebbene con attività moderata, in presenza di addotti costituiti da benzopirene-DNA.

1.4.6 Patologie mitocondriali causate da mutazioni in POLG

Come detto in precedenza, mutazioni nel gene codificante la subunità catalitica della polimerasi γ umana causano patologie caratterizzate da delezioni multiple e/o deplezione dell'mtDNA in specifici tessuti. In particolare le patologie causate da mutazioni in POLG possono essere suddivise in due classi: patologie dovute a delezioni multiple dell'mtDNA e patologie dovute a deplezione dell'mtDNA. Le prime colpiscono solo alcuni tessuti, sono tipicamente ad esordio adulto e non letali. Le seconde sono più o meno multisistemiche e ad esordio infantile, e portano alla morte nel giro di pochi anni o pochi mesi. Come descritto nel paragrafo successivo, la maggior parte delle mutazioni patologiche in POLG causano un solo tipo di patologia, mentre alcune mutazioni causano più patologie, a seconda delle mutazioni associate *in cis* o *in trans*. Di seguito verranno descritte le patologie causate da mutazioni in POLG.

Oftalmoplegia esterna progressiva (PEO). L'oftalmoplegia esterna progressiva è la patologia mitocondriale dovuta a mutazioni in POLG più comune. Questa malattia è ad esordio adulto ed è caratterizzata da ptosi e progressiva paralisi bilaterale dei muscoli oculari e del muscolo elevatore della palpebra. A questi sintomi principali sono in generale associati altri sintomi, quali generalizzata debolezza dei muscoli scheletrici con intolleranza

all'esercizio fisico, atassia, depressione, ipogonadismo, deficit uditivi, neuropatie periferiche, cardiopatie e cataratta (Biousse and Newman, 2003).

Dal punto di vista molecolare, la PEO è caratterizzata da delezioni singole o multiple nell'mtDNA (Holt *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 1989; Holt *et al.*, 1989). Tali delezioni sono solitamente lunghe da 1 a 9 kb, fiancheggiate da sequenze dirette ripetute, probabilmente importanti nella generazione delle delezioni stesse (Mita *et al.*, 1990). Inoltre non sono rimosse le origini di replicazione del filamento leggero e di quello pesante, ma viene sempre perso almeno un gene per tRNA mitocondriali, con conseguente generalizzato difetto della sintesi proteica mitocondriale, quando il rapporto tra molecole di mtDNA mutate e wild-type supera il livello soglia, approssimativamente intorno al 75% (Hayashi *et al.*, 1991). Inoltre i muscoli scheletrici dei malati presentano fibre “*red ragged*”, espressione della proliferazione mitocondriale, accumuli di numerose strutture mitocondriali anomale con inclusioni paracrystalline, una ridotta attività degli enzimi della catena respiratoria, espressione della disfunzione mitocondriale, e ampie delezioni del mtDNA, evidenziabili mediante *Southern blot* (Van Goethem *et al.*, 2002; Kaukonen *et al.*, 2000).

La PEO ha due cause principali:

- 1) il 40-70% dei casi è dovuto a singole delezioni dell'mtDNA avvenute *ex novo* durante l'oogenesi o l'embrionogenesi. In questi casi sporadici di PEO tipicamente è presente una sola delezione dell'mtDNA, con un grado più o meno elevato di eteroplasmia.
- 2) circa il 15-30% dei casi di PEO sono ad eredità mendeliana, dunque dovuti a mutazioni in geni nucleari (Agostino *et al.*, 2003). In questi casi la causa primaria della malattia sono le mutazioni nei geni nucleari codificanti proteine fondamentali per l'integrità dell'mtDNA, mentre le delezioni multiple nell'mtDNA sono la causa secondaria dovuta agli effetti delle mutazioni nucleari (Hirano and Vu, 2000).

Le delezioni causate da mutazioni in geni nucleari non vengono ereditate, sono eteroplasmiche e la proporzione di molecole di mtDNA mutate può variare dal 20 al 90% nel muscolo scheletrico (Biousse and Newman, 2003). La proporzione di copie di mtDNA mutate nel muscolo scheletrico aumenta anche con l'età e in parallelo alla progressione della malattia, ma ad oggi non è noto come tali delezioni si generano e quale è la loro rilevanza nella patogenesi della malattia (Larsson *et al.*, 1990; Chinnery, 2003). L'aumento nel tempo del numero di molecole di mtDNA mutate è dovuta ad un vantaggio replicativo delle copie di mtDNA delete rispetto alle copie wt, in quanto sono più corte e quindi preferenzialmente amplificate (Van Goethem *et al.*, 2002).

Per quanto concerne l'eredità di questi casi di PEO, essa può essere recessiva (arPEO) o dominante (adPEO). In molti casi non è nota la storia familiare dei pazienti, e in questo caso si parla di PEO sporadica. L'adPEO, i cui sintomi riguardano principalmente la muscolatura, è stata descritta la prima volta da Zeviani e collaboratori (Zeviani *et al.*, 1989) ed ha un'incidenza di 1/100.000 in Italia e Finlandia (Kaukonen *et al.*, 2000).

Allo stato attuale della conoscenza, la PEO ereditaria è causata da mutazioni in almeno quattro geni nucleari: ANT1, codificante per l'isoforma 1 dell'ADP/ATP carrier; C10ORF2, codificante per l'elicasi mitocondriale Twinkle; POLG; POLG2, codificante per la subunità

catalitica della polimerasi γ . Mutazioni in POLG sono responsabili di circa il 50% delle forme ereditarie di PEO (Van Goethem *et al.*, 2001; Lamantea *et al.*, 2002). Una percentuale del 10-35% dei casi sono dovuti a mutazioni negli altri tre geni, ma la percentuale rimanente di casi è dovuta a mutazioni in geni non ancora identificati.

Sindrome da atassia-neuropatia (ANS). La sindrome da atassia-neuropatia è una patologia recessiva caratterizzata da delezioni multiple nell'mtDNA ad esordio adulto (dalla pubertà fino ai quarant'anni in generale). Questa patologia, e le sue varianti sindrome atassica associata ai mitocondri (MIRAS) e sindrome epilettica-atassica spino-cerebellare (SCAE), è causata specificatamente da mutazioni in POLG, che causano delezioni multiple come effetto secondario. I sintomi includono neuropatia periferica, disartria, difetti cognitivi di media gravità, movimenti involontari, sintomi psichiatrici, mioclono e, eventualmente, attacchi epilettici (Hakonen *et al.*, 2005).

Neuropatia atassica sensoriale, disartria e oftalmoparesi (SANDO). La SANDO è una sindrome recessiva dovuta a mutazioni nel gene POLG o C10ORF2. I sintomi classici, oltre a neuropatia, includono disartria, oftalmoparesi, areflessia, depressione, emicrania, disfagia, nistagmo. Dal punto di vista molecolare, i pazienti presentano delezioni multiple nell'mtDNA, di lunghezza variabile dalle 4 alle 10 Kb, nel muscolo e nel sistema nervoso periferico. Il muscolo inoltre presenta fibre “red ragged” (Fadic *et al.*, 1997; Rantamäki *et al.*, 2001).

Sindrome di Alpers. La sindrome di Alpers, o sindrome di Alpers-Huttenlocher, è una malattia da deplezione dell'mtDNA ad esordio infantile. Le malattie da deplezione dell'mtDNA, o MDS, sono caratterizzate da una forte riduzione del numero di copie di mtDNA in specifici tessuti, che colpiscono tipicamente i bambini e sono ad esito fatale. La sindrome di Alpers rientra nelle forme epatocerebrali di MDS, e tipicamente colpisce il sistema nervoso centrale, il fegato e il tessuto muscolare. I sintomi tipici della sindrome di Alpers includono atrofia del cervello, crisi epilettiche, regressione psicomotoria, proliferazione dei dotti biliari, fibrosi, cirrosi, crisi epatiche croniche, ipotonia, emiparesi e atassia (Gordon, 2006; Alberio *et al.*, 2007).

I tessuti muscolari dei soggetti affetti da Alpers sono caratterizzati dalla presenza di fibre “red ragged”, a cui sono associate deficienze dei complessi respiratori, in particolare della NADH deidrogenasi, della succinato deidrogenasi e della citocromo c ossidasi (Schwabe *et al.*, 1997). La deficienza dei complessi respiratori è presente in genere anche nel fegato.

La sindrome di Alpers è causata da mutazioni in POLG ed è ereditata come malattia autosomica recessiva. Mutazioni in POLG sono state associate ad altre forme di MDS caratterizzate da un coinvolgimento del cervello e del fegato (sindrome epatocerebrale infantile) oppure dal coinvolgimento di numerosi tessuti e organi (grave disordine multisistemico dell'infanzia) (de Vries *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2005).

Altre patologie. Oltre alle patologie sopra riportate, vi sono altre patologie causate da mutazioni in POLG non riconducibili direttamente a delezioni o deplezione dell'mtDNA. In particolare casi di infertilità maschile sono associate ad una specifica mutazione in POLG. All'estremità 5' di POLG è presente un tratto costituito da 13 codoni CAG ripetuti. Due studi

hanno dimostrato che la riduzione del numero dei codoni CAG è responsabile di casi di infertilità o subfertilità maschile (Rovio *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2004). Studi recenti sembrano però smentire questa osservazione (Krausz *et al.*, 2004; Akinin-Seifer *et al.*, 2005; Brusco *et al.*, 2006)

Sebbene il parkinsonismo sia un sintomo spesso associato a forme di PEO, soltanto nel 2004 sono stati riportati casi che cosegregano con specifiche mutazioni in POLG (Luoma *et al.*, 2004). I soggetti presentavano perdita di neuroni dopaminergici e di neuroni pigmentati, ma non presentavano corpi di Levy, tipici della forma classica di sindrome di Parkinson. Gli autori hanno ipotizzato che il parkinsonismo dovuto a mutazioni in POLG è dovuto ad un *pathway* alternativo rispetto ai casi classici, in cui mutazioni, per lo più puntiformi, nell'mtDNA causano una riduzione della produzione di ATP oppure un maggiore danno ossidativo. Recentemente numerose mutazioni in POLG sono state identificate in individui affetti da parkinsonismo (Luoma *et al.*, 2007).

Mutazioni in POLG sono associate a casi di menopausa precoce in donne affette da PEO (Luoma *et al.*, 2004).

Recentemente due mutazioni in POLG sono state associate a casi di Charcot-Marie Tooth (CMT), un tipo di atassia cerebellare demielinizzante (Harrower *et al.*, 2008).

Infine è noto che la polimerasi γ è inibita dagli analoghi dei deossinucleotidi utilizzati come farmaci anti-HIV, tanto che soggetti trattati con inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) hanno presentato sintomi simili a quelli dei soggetti affetti da patologie mitocondriali, quali miopatie con fibre "red ragged", riduzione dell'mtDNA e acidosi lattica (reviewed in Graziewicz *et al.*, 2006). Recentemente è anche stata identificata una mutazione in POLG che incrementa la sensibilità della polimerasi al trattamento con NRTI (Yamanaka *et al.*, 2007).

Meccanismi molecolari delle delezioni. Allo stato attuale il meccanismo molecolare responsabile per la generazione e l'accumulo di delezioni del mtDNA nei pazienti affetti da PEO rimane sconosciuto e non è noto come le mutazioni nel gene POLG causino delezioni nell'mtDNA (Van Goethem *et al.*, 2003). In tal senso sono state formulate varie ipotesi.

- 1) Le delezioni osservate nell'mtDNA potrebbero essere una conseguenza dell'aumento delle mutazioni puntiformi. Diverse mutazioni causanti PEO, come la mutazione Y955C, incrementano la frequenza di mutazioni puntiformi (Ponamarev *et al.*, 2002). Nel DNA mitocondriale esistono regioni con un'elevata similarità. L'introduzione di mutazioni puntiformi potrebbe aumentare la similarità di sequenza, favorendo un processo di ricombinazione omologa illegittima. Più precisamente, secondo la teoria dello *strand slippage*, la presenza di un non corretto appaiamento, dovuto ad un errore per sostituzione di base, tra sequenze dirette ripetute può promuovere, dopo la sintesi del frammento, uno scivolamento di un filamento del DNA rispetto all'altro e causare in conseguenza una delezione, come riportato in figura 1.15 (Ponamarev *et al.*, 2002). Questa teoria non ha trovato però dimostrazione pratica. E' invece stato dimostrato che non tutte le mutazioni patologiche in POLG causano un aumento delle mutazioni puntiformi, e quando si osserva un aumento delle mutazioni puntiformi questo è presente sia in molecole wt che in molecole delete, suggerendo che non siano le

mutazioni puntiformi a causare la comparsa di delezioni multiple (Wanrooij *et al.*, 2004).

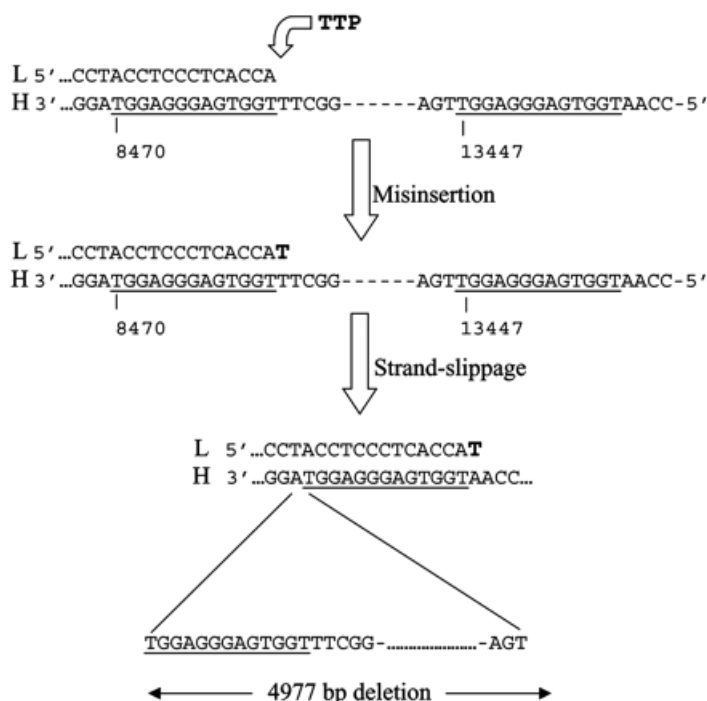


Figura 1. 15: Rappresentazione schematica dell'ipotesi dello strand slippage (da Ponamarev *et al.*, 2002).

- 2) E' noto che alcune mutazioni nel gene POLG riducono notevolmente l'attività catalitica e/o la processività dell'enzima. Una riduzione dell'attività catalitica potrebbe portare ad uno stallo della replicazione, cioè al blocco, o al rallentamento, della sintesi del DNA, con la conseguente comparsa di delezioni. In particolare alcune polimerasi mutate posseggono la stessa affinità per il DNA template, o un'affinità maggiore. Le polimerasi mutate dunque potrebbero legarsi al DNA template, bloccando la replicazione e impedendo allo stesso tempo alla polimerasi selvatica di legarsi al DNA. Anche una riduzione della processività potrebbe essere responsabile dell'accumulo di delezioni dell'mtDNA, poiché potrebbe determinare una terminazione precoce della replicazione dell'mtDNA (Graziewicz *et al.*, 2004).
- 3) Alcune mutazioni potrebbero inibire l'interazione e/o la cooperatività della DNA polimerasi γ con altre proteine coinvolte nella replicazione, impedendo che questa possa procedere correttamente (Lamantea *et al.*, 2002).
- 4) Un eventuale incremento dell'attività enzimatica della DNA polimerasi mutata potrebbe causare un depauperamento del pool dei dNTP mitocondriali, presenti in quantità limitante (Lamantea *et al.*, 2002).

1.4.7 Mutazioni patologiche associate a POLG

Allo stato attuale (dicembre 2007) sono state identificate 89 mutazioni patologiche nel gene POLG, più 16 SNP (Figura 1.16).

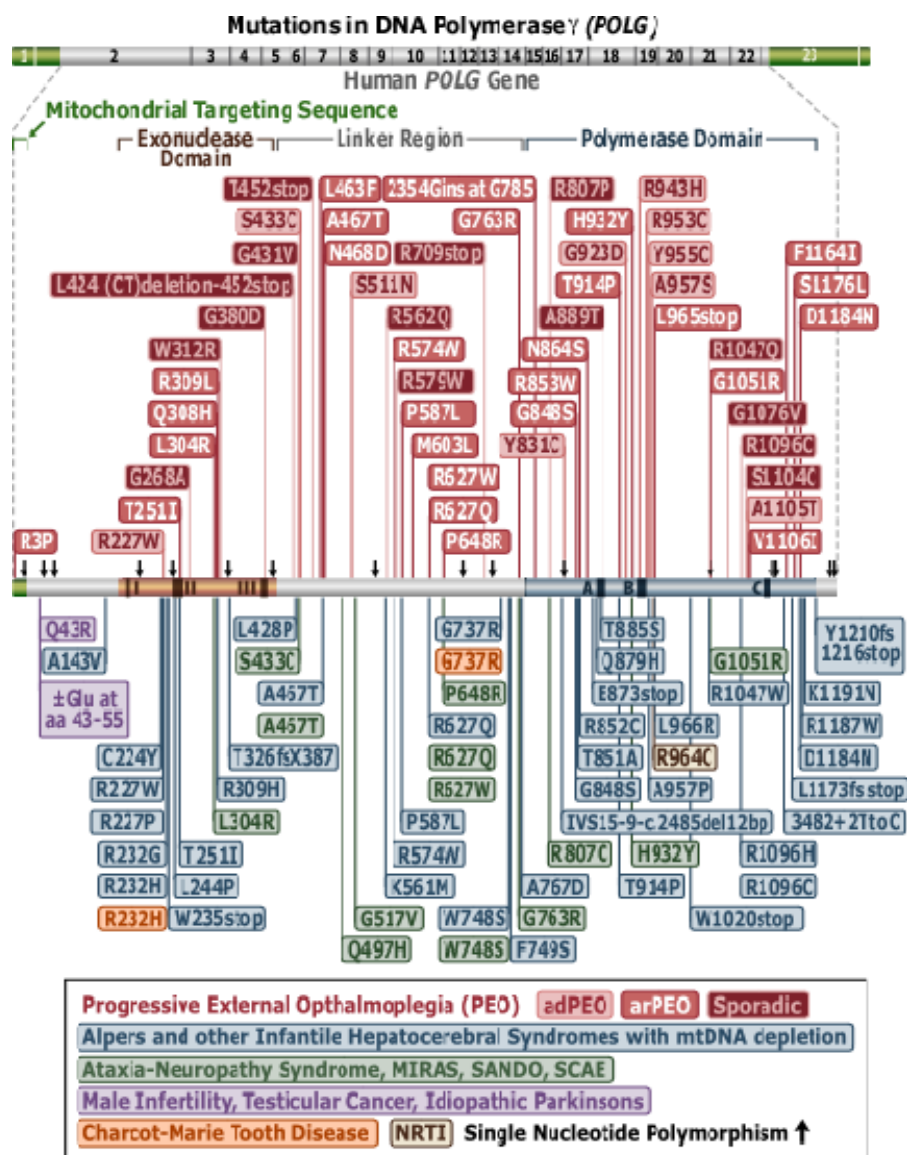


Figura 1. 16: Mutazioni patologiche e SNP nella subunità catalitica della DNA polimerasi γ (dallo “Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database”, <http://tools.niehs.nih.gov/polg/index.cfm> curato da W. Copeland).

Dalla figura emergono chiaramente alcune osservazioni. In primo luogo, mutazioni in POLG causano diversi tipi di patologie, le cui caratteristiche sono state riportate in precedenza. La patologia a cui è associato un maggior numero di mutazioni è l'oftalmoplegia esterna progressiva (PEO), sia sporadica sia recessiva (arPEO) sia dominante (adPEO). In particolare le mutazioni che causano forme di adPEO sono situate tutte nel dominio polimerasico, con l'eccezione di due mutazioni recentemente scoperte, la S511N e la G517V (Hudson *et al.*, 2006; Horvath *et al.*, 2006), situate nella regione linker. Nessuna forma di adPEO è associata al dominio esonucleasico, sebbene per la mutazione W312R diverse osservazioni fanno supporre che possa essere dominante. In secondo luogo, sebbene la maggior parte delle mutazioni sia associata ad un'unica patologia, alcune mutazioni sono associate a più patologie, soprattutto quando sono *in cis* o *in trans* con diverse mutazioni. In tal senso non sono ancora noti i meccanismi attraverso cui medesime mutazioni possono dare origine a patologie diverse, caratterizzate da insorgenza e sintomi molto differenti. In terzo luogo, è

emerso recentemente che alcuni SNP, in particolare lo SNP E1143G, possa influenzare il tipo e la gravità del fenotipo patologico.

Di seguito vengono riportate le patologie associate alle mutazioni analizzate in questo studio.

G268A. La sostituzione G268A è stata associata a casi sporadici di PEO in omozigosi o in eterozigosi con la mutazione A467T (Del Bo *et al.*, 2003; Di Fonzo *et al.*, 2003; Gonzalez-Vioque *et al.*, 2006). Il residuo G268 è situato nel motivo ExoII ed è altamente conservato in diversi organismi. La mutazione è stata identificata dapprima in due pazienti, per la quale non era nota la storia familiare (Di Fonzo *et al.*, 2003). Un paziente era affetto da PEO, e il sequenziamento di POLG ha mostrato la presenza della mutazione G268A in eterozigosi con la mutazione recessiva A467T. L'altra paziente era invece affetta da PEO, retinopatia pigmentosa, intolleranza all'esercizio e amenorrea; l'analisi molecolare ha mostrato la presenza della mutazione G268A in omozigosi. Sulla base del fatto che in entrambi i casi la mutazione era *in trans* con una seconda mutazione ha fatto ipotizzare che la mutazione fosse recessiva, sebbene la recessività non fosse dimostrata dalla storia familiare. Successivamente è stato dimostrato che nei fibroblasti della paziente omozigote la mutazione G268A era associata ad un incremento significativo delle mutazioni puntiformi dell'mtDNA, sia nel D-loop che nella regione codificante (Del Bo *et al.*, 2003).

Uno studio successivo ha mostrato che un paziente affetto da PEO con neuropatia sensoriale era eterozigote per la mutazione G268A, suggerendo che la mutazione G268A potesse essere dominante (Gonzalez-Vioque *et al.*, 2006). D'altra parte la mutazione era in associazione con un polimorfismo, la sostituzione Q1236H, indicando che il fenotipo potesse essere mediato dalla presenza di questo polimorfismo. Anche in questo caso, l'assenza della storia familiare non ha permesso di determinare la dominanza/recessività della mutazione.

A conferma del ruolo patologico della mutazione, la mutazione non è stata trovata in 200 soggetti sani (Di Fonzo *et al.*, 2003; Gonzalez-Vioque *et al.*, 2006).

G848S. La mutazione G848S è stata associata a casi di arPEO e di sindrome di Alpers. Il residuo G848, molto conservato durante l'evoluzione, è situato nel dominio polimerasico, a monte del motivo PolA. La mutazione è stata riportata in diversi casi di Alpers e di arPEO in associazione con diverse mutazioni, ed è un esempio di come una mutazione possa essere responsabile di diverse patologie, a seconda delle mutazioni che vi sono associate. La storia familiare, disponibile per diversi pazienti, ha dimostrato che la mutazione è recessiva.

Per quanto concerne il coinvolgimento nella PEO, è stato riportato solo in due casi (Lamantea *et al.*, 2002; Kollberg *et al.*, 2005) La mutazione è stata osservata in un paziente affetto da PEO recessiva, in eterozigosi con la mutazione recessiva T251I nel dominio esonucleasico, mentre non è stata osservata in 100 soggetti di controllo sani (Lamantea *et al.*, 2002). La mutazione è stata osservata anche in un paziente affetto da PEO sporadica in eterozigosi con la doppia mutazione T251I-P587L (Kollberg *et al.*, 2005).

La mutazione G848S è stata riportata in numerosi casi di Alpers (Ferrari *et al.*, 2005; Davidzon *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005; de Vries *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2006; Kollberg *et al.*, 2006). La mutazione è stata descritta dapprima in eterozigosi con la mutazione A467T, una delle mutazioni più comuni riscontrate nei casi di Alpers (Ferrari *et al.*, 2005). Il

soggetto, a conferma dell'insorgenza in età infantile di Alpers, ha mostrato i primi sintomi già a sette mesi, caratterizzati successivamente da allargamento del fegato, ipoglicemia, acidosi lattica, fibrosi del fegato, epilessia, strutture spongiformi nel cervello e cirrosi epatica. La biopsia ha mostrato la presenza di mitocondri anomali nel fegato, nel cervello e nel muscolo. Successivamente la mutazione è stata riscontrata in quattro pazienti, morti prima dei sei anni, che presentavano il classico quadro clinico di Alpers, associato con una deplezione di mtDNA nel fegato superiore all'85% (Davidzon *et al.*, 2005). In tutti e quattro i casi la mutazione era associata in eterozigosi con il doppio allele mutato W748S-E1143G. In tutti i casi di Alpers descritti successivamente la mutazione è stata identificata in eterozigosi sempre con le mutazioni A467T o W748S-E1143G (Nguyen *et al.*, 2005; de Vries *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2006; Kollberg *et al.*, 2006).

A889T. La mutazione A889T è stata associata a due casi di PEO, uno di PEO recessiva, l'altra di PEO dominante, rendendo difficile comprendere l'ereditarietà della mutazione. Il residuo A889, anch'esso molto conservato durante l'evoluzione, è situato nel dominio polimerasico, all'interno del motivo PolA.

La mutazione è stata descritta per la prima volta nel 2003, in una paziente affetta da PEO con ptosi progressiva, limitazione dei movimenti oculari, atassia, areflessia, cataratta e dismotilità intestinale, e riduzione delle attività enzimatiche di tutti i complessi di trasporto di elettroni (Filosto *et al.*, 2003). In questa paziente la mutazione è stata osservata in associazione con la mutazione R579W, sebbene non fosse noto dal sequenziamento se le mutazioni fossero *in cis* o *in trans*. La recessività della mutazione A889T (e R579W) è stata confermata dal fatto che i parenti sani della paziente erano eterozigoti per l'una o per l'altra mutazione. In questo studio inoltre, la mutazione non è stata riscontrata in 120 controlli sani.

Successivamente la mutazione è stata identificata in due fratelli affetti da sindrome da atassia-neuropatia con PEO (Hisama *et al.*, 2005). I soggetti erano affetti da ptosi, oftalmoplegia progressiva, nistagmo, areflessia, tremori e grave atassia. I soggetti presentavano soltanto la mutazione A889T, *in cis* con lo SNP E1143G, mentre l'altro allele era selvatico, così da suggerire che la mutazione fosse dominante. Gli autori hanno ipotizzato che la dominanza potesse essere dovuta a due alternative: la mutazione A889T era dominante di per sé oppure la presenza dello SNP E1143G rendeva la mutazione dominante, indicando che quest'ultimo non si comportava come SNP neutrale. A questo va aggiunto che la madre e due prozii dei pazienti, portatori obbligati dell'allele A889T-E1143G, erano affetti da un fenotipo molto meno grave, caratterizzato da tremori, suggerendo che il fenotipo patologico fosse influenzato da altri fattori, ambientali o genetici.

H932Y. La sostituzione H932Y è stata identificata in un caso di PEO sporadica e a casi di arPEO con SANDO (Filosto *et al.*, 2003; Mancuso *et al.*, 2004). Il residuo H932 è situato nel dominio polimerasico fra il motivo PolA e PolB ed è altamente conservato durante l'evoluzione.

Dapprima è stato riportato il caso di una paziente con PEO sporadica associata a disfagia, che era eterozigote per la mutazione H932Y e per la mutazione recessiva T251I, facendo presupporre che la mutazione fosse recessiva, sebbene la recessività non potesse essere

confermata dalla storia familiare (Filosto *et al.*, 2003). La mutazione non è stata osservata in 100 controlli sani.

Successivamente è stata riportata la storia di una famiglia, in cui due soggetti erano affetti da SANDO con PEO e vari sintomi. Il primo soggetto presentava debolezza progressiva delle palpebre, disfunzioni erettili, parestesia, ptosi bilaterale, oftalmoplegia progressiva, perdita di udito, disartria, debolezza dei muscoli distali, areflessia, atassia, deficit cognitivi, deterioramento mentale, depressione, polineuropatia sensorimotoria, demielinizzazione delle fibre nervose, degenerazione assonale, e presenza nei muscoli di fibre “*red ragged*” citocromo c ossidasi negative. Il secondo soggetto, sorella del primo, presentava una sintomatologia simile, ma meno pronunciata. I due soggetti erano eterozigoti per le mutazioni H932Y e G1051R. La determinazione della dominanza/recessività della mutazione era complicata dal fatto che numerosi parenti eterozigoti per l’una o per l’altra mutazione non erano completamente asintomatici, ma presentavano fenomeni di emicrania ricorrente e/o problemi psichiatrici. In particolare tre soggetti su cinque portatori della mutazione H932Y presentavano fenomeni di emicrania, che erano assenti in soggetti con alleli wt, suggerendo che la mutazione potesse essere parzialmente dominante. La mutazione non è stata riscontrata in 120 soggetti sani.

Y955C. La sostituzione Y955C è responsabile del fenotipo più grave di adPEO, ed è stata riportata in numerosi casi (Van Goethem *et al.*, 2001; Lamantea *et al.*, 2002; Luoma *et al.*, 2004; Kollberg *et al.*, 2005; Pagnamenta *et al.*, 2006)

La mutazione è stata descritta originariamente da Van Goethem, come prima mutazione in POLG associata ad una patologia mitocondriale (Van Goethem *et al.*, 2001). In questo studio, una famiglia presentava soggetti affetti da una grave forma di PEO dominante, con debolezza muscolare, fibre “*red ragged*”, abbondanti mitocondri subsarcolemmali con strutture paracristalline e delezioni multiple dell’mtDNA. I soggetti erano eterozigoti per la mutazione Y955G. La mutazione era assente in 432 controlli. Successivamente altri casi sono stati descritti in cinque famiglie, i cui soggetti eterozigoti per la mutazione Y955C erano affetti da una grave forma di adPEO (Lamantea *et al.*, 2002).

Sono stati poi identificati vari soggetti affetti da adPEO eterozigoti per la mutazione Y955C (Luoma *et al.*, 2004). In questo studio emerge come la mutazione sia associata a sintomi non riconducibili all’oftalmoplegia esterna progressiva. In particolare, la maggior parte delle donne presentavano una menopausa precoce, prima dei 35 anni, osservazione successivamente confermata da altri (Pagnamenta *et al.*, 2006). In secondo luogo, diversi soggetti erano affetti da parkinsonismo non classico. I soggetti presentavano perdita di neuroni dopaminergici e di neuroni pigmentati, ma non presentavano corpi di Levy, tipici del Parkinson. Questo studio ha dimostrato per la prima volta una correlazione fra mutazioni in POLG e parkinsonismo. La mutazione inoltre non era presente in 1640 soggetti sani.

A causa della severità del fenotipo associato alla mutazione Y955C sono stati condotti numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* per comprendere i meccanismi attraverso i quali la polimerasi mutata agisce.

Mediante predizione della struttura tridimensionale del dominio polimerasico basato sulla struttura di proteine della famiglia A di cui era nota la struttura, è stato determinato che il residuo Y955, situato nel motivo PolB e conservato in tutte le polimerasi della famiglia A, è situato nelle vicinanze del dNTP entrante (Ponamarev *et al.*, 2002). In particolare il residuo di tirosina è coinvolto nel riconoscimento e nel legame del dNTP entrante. Il legame del dNTP necessita probabilmente della stabilizzazione mediante un legame idrogeno a cui partecipa il gruppo idrossile della tirosina e mediante interazione idrofobica a cui partecipa l'anello aromatico (Ponamarev *et al.*, 2002). Studi biochimici sulle polimerasi priva del dominio polimerasico, wt o recante la mutazione Y955, hanno dimostrato che:

- la polimerasi mutata mostra una K_m 45 volte superiore a quella della polimerasi wt;
- la k_{cat} è simile fra le due polimerasi;
- l'affinità per il DNA template è simile fra le due polimerasi;
- la polimerasi mutata mostra un incremento dell'incorporazione di basi sbagliate di circa 42 volte;
- in presenza del dominio esonucleasico, la polimerasi mutata mostra una riduzione della fedeltà di circa 2 volte;
- la polimerasi mostra un incremento di circa 4 volte di mutazioni di *frameshift* +1 o -1 (Ponamarev *et al.*, 2002).

Sulla base di queste osservazioni è stato ipotizzato che la comparsa di delezioni multiple fosse dovuta, almeno in parte, all'incremento di mutazioni puntiformi, ad esempio attraverso il meccanismo dello *strand slippage*.

Uno studio successivo ha dimostrato che, in presenza della subunità accessoria, i valori di K_m della polimerasi mutata è più elevata di circa 300 volte, mentre la k_{cat} è ridotta di circa 10 volte (Graziewicz *et al.*, 2004). Queste variazioni risultano in una riduzione dell'efficienza catalitica di circa 3000 volte. Alla riduzione dell'attività è associata una riduzione di circa l'80% della processività *in vitro* (Graziewicz *et al.*, 2004). Sulla base di queste osservazioni è stato ipotizzato che delezioni nell'mtDNA siano dovute *in vivo* ad uno stallo della replicazione, dovuto al fatto che la polimerasi mutata, che mostra la stessa affinità per il DNA template rispetto a quella selvatica, è in grado di legare il DNA, ma, una volta legatosi, impedisce o rallenta la sintesi.

Recentemente è stato dimostrato *in vitro* che la polimerasi recante la mutazione Y955C potrebbe essere più sensibile, indirettamente, agli effetti dei ROS, cosa che potrebbe spiegare il suo coinvolgimento nel parkinsonismo (Graziewicz *et al.*, 2007). Infatti la polimerasi Y955C tende ad incorporare con maggiore frequenza la base ossidata 8-oxo-dG. In particolare, a parità di concentrazione di dGTP e 8-oxo-dGTP, la polimerasi wt ha un potere discriminante di circa 10000 volte, cioè incorpora 8-oxo-dGTP una volta su 10000, di cui l'80% delle volte opposto a C, e il 20% delle volte opposto ad A, attraverso un appaiamento di tipo Hoogsteen. La polimerasi mutata invece mostra un potere discriminante di sole 45 volte, e il 50% delle volte che incorpora 8-oxo-dG lo incorpora opposto ad A. Questo determina un incremento delle sostituzioni puntiformi, in quanto nei cicli successivi la 8-oxo-dG tenderà ad appaiarsi a C, causando transizioni CG→TA. Quando invece la 8-oxo-dG è

presente nel templatato, la polimerasi incorpora quasi il 5% delle volte C e quasi mai A, mentre il 95% delle volte la replicazione è bloccata. La polimerasi mutata incorpora il 39% delle volte C e, sebbene i valori siano bassi, essa incorpora A con una frequenza di circa 100 volte superiore a quella della polimerasi selvatica. Anche in questo caso perciò la polimerasi mutata favorisce le transizioni GC→AT. I fenomeni di parkinsonismo associati alla mutazione Y955C potrebbero essere dovuti ad un maggiore accumulo di 8-oxo-dG nel DNA mitocondriale. Infatti molti soggetti che presentano parkinsonismo presentano un accumulo di 8-oxodG nell'mtDNA (Nakapebbu *et al.*, 2007).

L'effetto della mutazione Y955C è stata studiata anche *in vivo* mediante l'utilizzo di sistemi modello. Mediante l'utilizzo di *S. cerevisiae* è stato dimostrato che la mutazione equivalente alla mutazione Y955C determina la perdita totale dell'mtDNA e rende il ceppo rho⁰. La mutazione è dominante, e ceppi eterozigoti per la mutazione equivalente mostrano un incremento di *petite* e un incremento del danno sul DNA (Stuart *et al.*, 2006).

L'espressione della polimerasi umana wt o mutata nel cuore di topi transgenici ha portato invece ad un aumento della mortalità nei topi recanti la versione mutata, accompagnata da un allargamento atriale del cuore, da una riduzione del numero di copie di mtDNA, da un'incorporazione 3 volte maggiore di 8-xo-dG nell'mtDNA, da variazioni della densità della matrice mitocondriale e dalla dissoluzione delle creste mitocondriali (Lewis *et al.*, 2007).

G1051R. La mutazione G1051R è stata riportata in una sola famiglia con pazienti affetti da SANDO con PEO, in associazione con la mutazione H932Y, di cui detto prima (Mancuso *et al.*, 2004). Il residuo G1051 è situato nel dominio polimerasico, fra i motivi PolB e PolC ed è conservato durante l'evoluzione. La storia dei pazienti affetti dalle mutazioni H932Y e G1051R in eterozigosi è stata riportata in precedenza. E' da notare che la mutazione G1051R è associata, nella famiglia, a diversi casi di problemi psichiatrici, ma poiché questi sono diffusi anche in soggetti non portatori di mutazioni, è probabile che la causa sia imputabile ad altri fattori. La mutazione sembra pertanto recessiva. La mutazione non è stata identificata in 120 controlli sani.

E1143G. La sostituzione E1143G viene classificata in banche dati come SNP, con una frequenza nella popolazione caucasica del 2-4% e assente nelle altre popolazioni (GeneSNP, <http://www.genome.utah.edu/genesnps/>). Il residuo E1143G, moderatamente conservato durante l'evoluzione, è situato nel dominio polimerasico, appena a valle del motivo PolC. Un "single nucleotide polymorphism", o SNP, è definito, in accordo con lo "Human Genome Project Information", come una variazione di sequenza che avviene quando un singolo nucleotide nella sequenza genomica è alterata. Una variazione può essere definita come uno SNP se è presente in almeno l'1% della popolazione. Inoltre, per definizione, uno SNP non causa direttamente una patologia, sebbene la presenza di uno SNP possa alterare l'effetto di mutazioni patologiche nonché, ad esempio, la risposta a farmaci.

Lo SNP E1143G è stato osservato in numerosi casi patologici, fra cui casi di PEO, di atassia-neuropatia e di Alpers (Di Fonzo *et al.*, 2003; Van Goethem *et al.*, 2004; Hisama *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2005; Davidzon *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005; Winterthun *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2006; Kollberg *et al.*, 2006). Nella maggior parte dei casi, lo SNP è stato

trovato *in cis* con la mutazione W748S e *in trans* con un'altra mutazione. La sostituzione W748S, una delle mutazioni maggiormente riscontrata nei casi di Alpers, è sempre presente *in cis* con lo SNP E1143G, probabilmente per un effetto del fondatore (Hakonen *et al.*, 2005). Nonostante la SNP sia stato riscontrato in vari casi patologici, esso non è patologico di per sé. Vari studi hanno identificato infatti soggetti sani omozigoti per lo SNP E1143G. Nonostante ciò, sulla base di diverse osservazioni di seguito riportate, è stato ipotizzato che lo SNP E1143G non sia neutrale, ma si comporti come modificatore fenotipico in grado di modulare gli effetti patologici di mutazioni *in cis* o *in trans*.

- 1) Come detto in precedenza, lo SNP E1143 è stato identificato *in cis* con la mutazione A889T in due fratelli affetti da adPEO (Hisama *et al.*, 2005). Poiché la mutazione A889T sembra essere recessiva, è stato ipotizzato che la dominanza della mutazione sia dovuta alla concomitante presenza dello SNP E1143G.
- 2) Lo SNP E1143G è stato riscontrato con una frequenza significativamente maggiore in soggetti malati rispetto a soggetti sani (Horvath *et al.*, 2006).
- 3) In una famiglia di tre generazioni i cui soggetti erano affetti da adPEO dovuta alla mutazione dominante G517V, il fenotipo più grave si osservava in una paziente che, *in trans* con questa mutazione, presentava lo SNP E1143G (Horvath *et al.*, 2006).
- 4) Lo SNP E1143G è stato identificato in pazienti recanti su un allele la mutazione patologica, A467T o S433C, e sull'altro lo SNP E1143G. Mentre non sono note le caratteristiche della mutazione S433C, che potrebbe essere dominante, è noto che la mutazione A467T è recessiva. Questa osservazione suggerisce che lo SNP E1143G possa contribuire in maniera decisiva al manifestarsi del fenotipo clinico. Non è però escluso che nel soggetto studiato la patologia fosse dovuta a mutazioni in altri geni (Horvath *et al.*, 2006).

Gli effetti dello SNP E1143G sono anche stati saggiati *in vitro* (Chan *et al.*, 2006). In questo studio sono state determinate le proprietà biochimiche della polimerasi umana wt, della polimerasi recante la mutazione E1143G (polimerasi E1143G), e delle polimerasi W748S e W748S-E1143G. La finalità dell'esperimento era determinare se la presenza della sola mutazione E1143G alterasse le proprietà biochimiche della polimerasi e se la mutazione alterasse le proprietà della polimerasi recante la mutazione W748S. È stato osservato che, sorprendentemente, la polimerasi E1143G ha un'attività catalitica di circa 1,3 volte superiore a quella della polimerasi wt, e questo incremento è dovuto ad una maggiore stabilità della polimerasi. Inoltre la polimerasi W748S-E1143G mostra una maggiore efficienza catalitica e una maggiore affinità per il DNA rispetto alla polimerasi W748S. D'altra parte la polimerasi W748S-E1143G risulta meno stabile rispetto alla polimerasi W748S. Questi dati dimostrano che, almeno *in vitro*, E1143G non si comporta come SNP neutrale, ma è in grado di comportarsi come modificatore fenotipico di una mutazione *in cis*.

1.4.8 DNA polimerasi γ di *S. cerevisiae*

La polimerasi γ di *S. cerevisiae* è costituita da una sola subunità catalitica, codificata dal gene *MIP1* (Mitochondrial DNA Polymerase). Il gene *MIP1* è situato sul cromosoma XV e

codifica per una proteina di 1254 aminoacidi. Mip1 mostra un'elevata identità di sequenza con le DNA polimerasi γ animali: in particolare, essa mostra un'identità di sequenza del 43% con la polimerasi umana. L'identità di sequenza non è distribuita uniformemente lungo la sequenza primaria, ma si concentra nelle regioni codificanti per il dominio polimerasico e il dominio esonucleasico, in particolare nei motivi ExoI, II e III, e nei motivi PolA, B e C. Rispetto alle polimerasi animali, la polimerasi γ di *S. cerevisiae*, e in generale le polimerasi γ fungine, posseggono una regione linker decisamente più corta rispetto a quella delle polimerasi animali. La Pol γ di *S. cerevisiae* possiede inoltre una lunga coda C-terminale, caratteristica del genere *Saccharomyces*, che è fondamentale per la stabilità della polimerasi stessa.

Il gene *MIP1* è stato clonato da Foury nel 1989 (Foury, 1989). In questo studio, un mutante termosensibile con una ridotta attività polimerasica mitocondriale è stato trasformato con una banca genomica di *S. cerevisiae*. Il mutante presentava una ridotta attività catalitica *in vitro* a 28°C e soprattutto a 37°C, fenomeno dovuto ad una mutazione di stop all'estremità C-terminale di Mip1 (Foury, comunicazione personale). Ne risultava, *in vivo*, un fenotipo termosensibile caratterizzato dalla perdita dell'mtDNA a 37°C e di conseguenza dall'incapacità di crescere su fonti ossidabili a questa temperatura. La trasformazione con una banca genomica derivante dal ceppo $\Sigma 1278b$ ha permesso di identificare un clone in cui era presente il gene *MIP1* in grado di complementare il fenotipo di crescita a 37°C. La successiva delezione del gene *MIP1* ha portato invece alla perdita totale dell'attività polimerasica mitocondriale e alla perdita dell'mtDNA.

Nel 1990 è stato dimostrato, per similarità di sequenza, che Mip1 appartiene alla famiglia A delle DNA polimerasi, a cui appartengono la polimerasi I di *E. coli* e la polimerasi del fago T7 (Blanco *et al.*, 1991).

Studi successivi hanno portato all'identificazione di alleli mutatori, cioè alleli mutati di *MIP1* che portavano all'incremento della frequenza di mutazioni puntiformi dell'mtDNA e, spesso, anche ad un aumento della mutabilità estesa dell'mtDNA (Foury and Vanderstraeten, 1992; Hu *et al.*, 1995). Nel primo di questi studi, mediante mutagenesi sito-specifica, sono stati creati mutanti con una ridotta attività 5'-3' esonucleasica, ai quali erano associati un aumento della frequenza di mutazioni puntiformi dell'mtDNA. In particolare la sostituzione di tre residui di aspartato conservati situati nei motivi ExoI, II e III con alanina o glicina portava all'incremento di centinaia di volte della frequenza di mutanti Ery^R. Le polimerasi mutate mostravano una attività 5'-3' esonucleasica *in vitro* 100-500 volte minore rispetto a quella del wt. Alla forte riduzione dell'attività esonucleasica era associata una blanda riduzione dell'attività polimerasica, di circa il 20%, e una notevole riduzione della processività, che ha portato ad ipotizzare che le due attività non siano completamente indipendenti, o meglio che mutazioni nel dominio esonucleasico possano portare ad una riduzione dell'attività catalitica e soprattutto della processività della polimerasi. Questo spiegherebbe perché le mutazioni nel dominio esonucleasico portavano ad un incremento di circa 5-10 volte della frequenza di *petite* a 30°C e alla ridotta crescita su glicerolo a 37°C. Nel secondo studio, mediante mutagenesi casuale sono stati identificati 10 alleli mutatori di *MIP1*. La maggior parte degli

alleli mutatori erano mutati nel dominio esonucleasico, mentre tre mutazioni mappavano nel dominio polimerasico. In questo modo è stato dimostrato che anche l'attività polimerasica è responsabile dell'accuratezza e dunque della fedeltà della replicazione. A tutte le mutazioni era inoltre associato un maggiore accumulo di *petite*, almeno a 37°C, ma l'accumulo di mutanti *petite* non correlava con l'aumento di mutazioni puntiformi. La maggior parte inoltre delle mutazioni aveva una carattere dominante. In uno studio successivo, mediante l'utilizzo di alleli mutatori mutati nel dominio esonucleasico, è stato dimostrato che l'attività esonucleasica della polimerasi corregge principalmente trasversioni, mentre l'attività di *mismatch repair* associata a Msh1 ripara principalmente transizioni (Vanderstraeten *et al.*, 1998).

E' stato inoltre dimostrato che la sintesi di mtDNA è notevolmente sensibile alla temperatura, fenomeno che spiega il motivo per cui ad alte temperature la frequenza di mutanti *petite* è più elevata. La riduzione della sintesi dell'mtDNA dopo *heat shock* a temperature superiori a 40°C è imputabile ad una inattivazione per denaturazione della DNA polimerasi γ (Duchniewicz *et al.*, 1999; Germaniuk *et al.*, 2002). In questi studi è stato dimostrato che l'incremento della temperatura inattiva la DNA polimerasi, determinandone un *misfolding*. La proteina è in grado di riattivarsi dopo inattivazione termica, ma la riattivazione necessita di chaperoni mitocondriali, in particolare il cochaperone Mdj1, il chaperone Hsp70, costituito dalle subunità Ssc1 e Mge1, e il chaperone Hsp78. Mutazioni in questi geni incrementano la frequenza di *petite* ad alte temperature, e inibiscono il *refolding* di Mip1 dopo *heat shock*.

E' inoltre stato dimostrato che una proteina del nucleotide, Sed1, situata nella membrana interna, è importante nel mantenimento dell'mtDNA. La proteina Sed1 infatti interagisce con Mip1, e questa interazione è fondamentale per la stabilità dell'mtDNA. La delezione in Sed1 riduce infatti la quantità di Mip1, e porta ad un incremento di circa 4 volte sia della mutabilità puntiforme che della mutabilità estesa dell'mtDNA (Phadnis and Sia, 2004). Infine è stato recentemente dimostrato che la parte prossimale al dominio polimerasico della coda C-terminale di Mip1 è fondamentale per la stabilità della proteina (Young *et al.*, 2006).

1.5 Il lievito *S. cerevisiae* come sistema modello

Il lievito *S. cerevisiae* è stato utilizzato in numerosissimi studi come sistema per studiare la biologia di base, la fisiologia e la patologia degli eucarioti superiori, in particolare dell'uomo. L'utilizzo di *S. cerevisiae* come sistema modello dello studio della fisiopatologia umana pone diversi vantaggi.

- 1) *S. cerevisiae* possiede una struttura molto simile a quella delle cellule di eucarioti superiori; in particolare possiede tutte le strutture intracellulari presenti anche negli eucarioti superiori, fra cui i mitocondri (Botstein, 1991).
- 2) Sebbene l'organizzazione sia simile a quella delle cellule degli eucarioti superiori, il lievito possiede alcuni vantaggi tipici degli organismi unicellulari. In primo luogo è in grado di crescere velocemente su terreni semplici, cosa che rende più veloce e più economico lo studio in questo sistema. In secondo luogo, il lievito esiste sia allo stato aploide che allo stato diploide, con l'evidente vantaggio di studiare l'effetto di

mutazioni sia dominanti che recessive. Inoltre, mediante la costruzione di ceppi emizigoti, cioè diploidi distrutti in uno solo dei due alleli, trasformati con un allele mutato, è possibile determinare la natura della dominanza, in particolare se la dominanza è dovuta ad un'aploinsufficienza oppure ad una acquisizione di funzione negativa. In terzo luogo, sono stati sviluppati semplici *tool* di ingegneria genetica applicabili sul lievito, fra cui la trasformazione con plasmidi monocopia o multicopia ad alta efficienza, e metodi di distruzione genica. In particolare la distruzione genica è facilitata, in *S. cerevisiae*, dall'alta frequenza di ricombinazione omologa, che favorisce l'inserimento della cassetta di distruzione al corretto *locus*. In quarto luogo, possono essere applicati sul lievito semplici protocolli di biologia molecolare, quali l'estrazione di acidi nucleici e di proteine.

- 3) Il lievito è il primo organismo eucariotico il cui genoma è stato completamente sequenziato e pubblicato (Goffeau *et al.*, 1996). Il cosiddetto “progetto genoma” ha portato alla identificazione di circa 6300 geni in lievito, un numero circa cinque volte più piccolo rispetto alla stima dei geni umani (Venter *et al.*, 2001). Il genoma si è dimostrato molto compatto, con poche sequenze intergeniche e la presenza di pochi introni. L'analisi comparativa delle sequenze aminoacidiche ricavate dal sequenziamento del genoma di *S. cerevisiae* ha suggerito che molte funzioni biologiche di base della cellula eucariotiche siano svolte da un set di proteine ortologhe; questi studi quindi indicano che l'analisi delle proteine di lievito possa fornire conoscenze utili alla comprensione degli eucarioti superiori (Barrientos, 2003). In particolare, è interessante notare che il 46% delle proteine umane note ha omologhi in lievito, fra cui principalmente proteine coinvolte nei meccanismi di base della vita cellulare, quali replicazione, ricombinazione e riparazione del DNA, trascrizione, traduzione, e enzimi del metabolismo basale, del traffico tra i compartimenti cellulari e della biogenesi mitocondriale (Venter *et al.*, 2001). La conoscenza completa del genoma, insieme all'efficacia dei sistemi di ingegneria genetica, ha permesso di portare a termine efficacemente l'analisi su larga scala del genoma e del proteoma (Foury and Kucej, 2001). Questo ha reso possibile a un consorzio internazionale la costruzione di una collezione di 5943 ceppi deletanti di lievito, in ciascuno dei quali un gene, nel contesto aploide o diploide, è stato distrutto (Winzeler *et al.*, 1999). Inoltre il lievito è il solo organismo nel quale l'efficienza delle nuove tecnologie (in particolare *two-hybrid*, chip di DNA e proteine, delezione sistematica) sia stata testata a livello dell'intero genoma (Foury and Kucej, 2001). Questi studi su scala genomica sono invece estremamente difficoltosi nell'uomo, a causa della maggiore dimensione del genoma e della presenza di introni.

1.5.1 Il lievito *S. cerevisiae* come sistema modello per lo studio delle patologie mitocondriali

Il lievito è un ottimo modello anche per studiare la biologia di base e la patofisiologia dei mitocondri. La similarità tra i mitocondri di lievito e umani ha permesso prima di tutto di

utilizzare studi di genomica funzionale di *S. cerevisiae* per identificare geni umani coinvolti in patologie; per esempio sono state individuate mutazioni in cinque geni nucleari responsabili di miopatie mitocondriali caratterizzate da deficienza della citocromo c ossidasi, grazie a studi che ne hanno prima dimostrato in lievito la funzione essenziale nel processo di assemblaggio (Barrientos, 2003). L'identificazione di vari ortologhi umani di proteine mitocondriali di lievito, ad esempio i geni *BCS1* e *COX10* necessari all'assemblaggio delle componenti della catena respiratoria e responsabili di sindromi ereditarie, è stata possibile mediante l'approccio della complementazione funzionale, ottenuta quando il prodotto genico di un organismo è in grado di compensare la mancanza di un gene di un altro organismo (Valnot *et al.*, 2000; De Lonlay *et al.*, 2001).

Un consorzio internazionale di laboratori ha svolto una *screening* sistematico funzionale utilizzando la collezioni di deletanti di lievito di cui detto prima per identificare proteine mitocondriali. Questo ha permesso l'identificazione di 466 geni la cui delezioni abbatte la respirazione mitocondriale, dei quali 265 non ancora noti. Invece, 255 geni associati a difetti di crescita in substrati non fermentabili possiedono ortologhi nell'uomo e di questi 21 sono geni noti per essere coinvolti in malattie mitocondriali ereditate come tratti mendeliani (Steinmetz *et al.*, 2002).

L'utilizzo di un modello per lo studio delle malattie mitocondriali ha diverse finalità. In primo luogo mediante l'utilizzo di un sistema modello è possibile "validare" una mutazione, cioè stabilire se una mutazione in un gene è responsabile effettivamente della patologia in questione. Il notevole incremento delle conoscenze relative a geni nucleari implicati in malattie classificate come patologie mitocondriali è il risultato dello sviluppo della tecnica del clonaggio posizionale, che prevede la mappatura della regione cromosomica contenente il gene associato alla malattia, mediante analisi di *linkage* condotte nelle famiglie dei pazienti (Collins, 1995). L'analisi di *linkage* è possibile solo se si hanno a disposizione famiglie numerose, con più membri affetti dalla malattia, e consiste nell'individuazione di polimorfismi vicini al *locus* patologico che pertanto vengano ereditati con il gene mutato. L'affidabilità dell'analisi dipende da quanto è stretta l'associazione tra polimorfismo e *locus* della malattia. L'identificazione di geni nucleari associati a patologie mitocondriali attraverso il clonaggio posizionale è limitata da vari problemi. Innanzitutto la maggior parte delle famiglie sono piccole e spesso solo un membro è colpito dalla malattia, e inoltre il fenotipo clinico è solitamente complesso. Mutazioni nello stesso gene possono generare sintomi diversi e mutazioni in differenti geni possono portare al medesimo fenotipo patologico, quindi anche quando è possibile trovare diverse famiglie con componenti che presentano i medesimi sintomi, non ci sono garanzie che essi presentino lo stesso difetto genetico (Chinnery, 2003). Secondariamente, il clonaggio posizionale identifica delle regioni cromosomiche che dovrebbero contenere il difetto genetico, le quali in generale contengono più geni. E' possibile dunque che vi sia un solo gene candidato, ad esempio un gene codificante un componente della catena respiratoria, o una proteina necessaria al mantenimento del DNA mitocondriale, ma è possibile che via siano più geni, di cui magari nessuno è noto codificare proteine mitocondriali (Chinnery, 2003). Pertanto al clonaggio posizionale segue, in generale, il

sequenziamento di uno o più geni per identificare mutazioni potenzialmente patologiche. L'identificazione di una mutazione patologica è complicata da due problemi. In primo luogo, fra diversi individui sono presenti polimorfismi, che rendono difficoltosa l'identificazione di una mutazione patologica. Anche qualora vi sia un solo polimorfismo, non è detto che questo sia effettivamente la mutazione patologica. In secondo luogo, anche qualora vi fosse una mutazione deleteria, quale la presenza di un codone di stop, non è detto che essa sia la vera causa della patologia, e non piuttosto una mutazione non correlata. Da qui nasce la necessità della validazione, definita come lo studio in un sistema modello degli effetti di una mutazione il cui ruolo patologico è ignoto. Se si dimostra che la mutazione, introdotta nel sistema modello, causa difetti del metabolismo mitocondriale, è possibile affermare che essa è una mutazione patologica. La validazione è inoltre ancora più necessaria nei casi sporadici, quando non è disponibile la storia familiare del paziente. Il lievito è un ottimo modello per studiare gli effetti di mutazioni recessive e per determinare la dominanza/recessività di una mutazione..

Un sistema modello è utile per la sola validazione ma può portare alla comprensione dei meccanismi molecolari attraverso cui la mutazione agisce. Anche in questo caso *S. cerevisiae* si dimostra un buon modello, grazie alla semplicità con cui possono essere effettuati esperimenti di biochimica e di biologia molecolare.

Infine, l'utilizzo di un sistema modello permette anche la ricerca e lo studio degli effetti di "molecole" in grado di riportare parzialmente il fenotipo patologico al fenotipo wt. In primo luogo, è possibile testare l'effetto di sostanze. *S. cerevisiae* si dimostra un buon modello in quanto la sostanza da testare può essere direttamente aggiunta al terreno di coltura e, se possiede opportune proprietà, è in grado di entrare nella cellula per diffusione o trasporto facilitato, e svolgere così la sua attività. In secondo luogo, è possibile cercare e valutare l'effetto di soppressori multicopia, mediante l'overespressione di un gene nel ceppo recante la mutazione patologica. Soppressori possono essere cercati mediante la trasformazione del ceppo con una banca multicopia, oppure mediante clonaggio in un plasmide multicopia di un gene che si pensi possa sopprimere il fenotipo attraverso meccanismi più o meno noti.

In particolare però, il grande vantaggio di *S. cerevisiae* nello studio delle patologie mitocondriali consiste nel fatto che fenotipi correlati alla disfunzione del metabolismo mitocondriale possono essere facilmente osservabili. Infatti, mutazioni che inibiscono la funzionalità mitocondriale possono determinare uno di questi semplici fenotipi:

- riduzione o inibizione della crescita su fonti ossidabili;
- alterazione dei degli spettri di assorbimento dei citocromi respiratori;
- alterazione dell'attività respiratoria.

In seconda istanza, indipendentemente dai fenotipi precedenti, è possibile determinare se ad una mutazione patologica è associata instabilità dell'mtDNA o un incremento della mutabilità puntiforme. Un eventuale incremento della mutabilità estesa dell'mtDNA, o mutabilità *petite*, può essere facilmente valutata grazie alla *petite* positività di *S. cerevisiae* di cui detto prima. Mediante crescita per un certo numero di generazioni su fonti fermentabili, è possibile quantificare l'accumulo di mutanti *petite*. Inoltre, mediante incrocio, è possibile determinare

se le colonie *petite* sono ρ^- oppure ρ^0 , dunque se alla mutazione patologica è associato un incremento della frequenza di delezioni e/o un aumento della perdita dell'mtDNA. Per quanto concerne la valutazione della mutabilità puntiforme dell'mtDNA, essa può essere determinata facilmente mediante la valutazione della frequenza di mutanti resistenti a antibiotici quali eritromicina.

Grazie all'utilizzo del lievito come sistema modello sono stati studiati gli effetti sul metabolismo mitocondriale di mutazioni in numerosi geni, sia mitocondriali che, soprattutto, nucleari. Un esempio, riportato in tabella 1.6, concerne lo studio di mutazioni in geni nucleari che determinano instabilità del DNA nucleare.

Gene umano	Gene ortologo di lievito	Funzione del prodotto genico	Bibliografia
ANT1	AAC2	ADP/ATP carrier, trasporto di ATP e ADP attraverso la membrana mitocondriale interna	Fontanesi <i>et al.</i> , 2004 Palmieri <i>et al.</i> , 2005 Lodi <i>et al.</i> , 2006
POLG	<i>MIP1</i>	DNA polimerasi mitocondriale, replicazione dell'mtDNA	Stuart <i>et al.</i> , 2006 Baruffini <i>et al.</i> , 2006 Baruffini <i>et al.</i> , 2007
MPV17	<i>SYM1</i>	Incognita	Spinazzola <i>et al.</i> , 2006
EFG1	<i>MEF1</i>	Fattore di elongazione mitocondriale G1, traduzione degli mRNA mitocondriali	Valente <i>et al.</i> , 2007
BCS1L	<i>BCS1</i>	Proteina coinvolta nell'assemblaggio del complesso III	Fernandez-Vizarra <i>et al.</i> , 2007

Tabella 1. 6: Geni umani e ortologhi di lievito che determinano instabilità dell'mtDNA. Mutazioni nei geni *MEF1* e *BCS1* causano una riduzione della stabilità dell'mtDNA solo in lievito.

1.6 Geni che influenzano l'accumulo di cloni *petite*

La frequenza dei cloni *petite* è influenzata da decine di geni, le cui mutazioni, delezione o overespressione influenzano notevolmente l'accumulo di *petite* (reviewed in Contamine and Picard, 2000). Fra i vari geni nucleari che influenzano l'accumulo di *petite* vale la pena di ricordare i geni *PET*, così chiamati perché, se mutati, rendono i ceppi *petite* (reviewed in Dujon, 1981). Fra i vari geni che influiscono sul mantenimento del DNA mitocondriale, verranno di seguito indicate le caratteristiche dei geni testati in questo studio. Come riportato, la maggior parte dei geni sono coinvolti nella ricombinazione e/o nella riparazione dell'mtDNA, essendo replicazione, ricombinazione e riparazione profondamente legati nel processo di trasmissione dell'mtDNA in *S. cerevisiae*.

1.6.1 Geni che influenzano la concentrazione dei deossinucleotidit trifosfato: *RNR1* e *SML1*

Il gene *RNR1* codifica per la subunità maggiore della ribonucleotide reductasi che catalizza lo step limitante nella sintesi dei dNTP.

Le ribonucleotide reductasi, presenti in tutti gli organismi, catalizzano, attraverso un processo di tipo radicalico, la riduzione del gruppo 2'-OH in gruppo 2'-H nei ribonucleosidifosfato o

nei ribonucleosiditri-fosfato, che così vengono ridotti, rispettivamente, a dNDP o dNTP. La reazione catalizzata dalla ribonucleotide reduttasi è pertanto fondamentale per la sintesi e la replicazione del DNA (Nordlund and Reichard, 2006). Dal punto di vista strutturale le ribonucleotide reduttasi sono eterotetrameri costituiti da due subunità maggiori R1 e due subunità minori R2.

S. cerevisiae possiede una ribonucleotide reduttasi di classe Ia (Nordlund and Reichard, 2006). *RNR1* e *RNR3* codificano per due versioni distinte della subunità R1 (Elledge and Davis, 1990). *RNR2* e *RNR4* codificano invece per due subunità minori R2 (Elledge and Davis, 1987; Hurd *et al.*, 1987; Huang and Elledge, 1997; Wang *et al.*, 1997a). *RNR3* è espresso scarsamente e il mutante nullo non ha fenotipo, neanche in seguito ad induzione del danno sul DNA quando *RNR3* è fortemente espresso (Domkin *et al.*, 2002). Al contrario, la distruzione di *RNR1* è letale, ma il fenotipo può essere salvato dall'overespressione di *RNR3*. *RNR2* e *RNR4* sono fondamentali entrambi per l'attività ribonucleotide reduttasica, come dimostrato dal fatto che la distruzione di un singolo gene è letale. In particolare Rnr4 e Rnr2 formano un eterodimero $\beta\beta'$ che, associato con due subunità R1, forma il tetrametro $\alpha_2\beta\beta'$ della ribonucleotide reduttasi di lievito.

La regolazione della concentrazione dei dNTP è fondamentale per il corretto progredire del ciclo cellulare. Alte concentrazioni costitutive di dNTP durante tutto il ciclo cellulare inibiscono il passaggio alla fase S, la sintesi del DNA e i *checkpoint* del danno al DNA (Chabes and Stillman, 2007). Di conseguenza la sintesi dei dNTP deve essere finemente regolata e poiché lo step limitante è la reazione reduttasica, la regolazione avviene a livello di *RNR1*. In primo luogo, *RNR1* è regolato durante il ciclo cellulare, in modo tale che l'attività massima si raggiunga nel passaggio dalla fase G1 alla fase S e venga mantenuta nella fase S (Elledge and Davis, 1990). In secondo luogo il gene *RNR1* è indotto in seguito al trattamento con agenti che danneggiano il DNA (Elledge *et al.*, 1993). La regolazione di *RNR1* avviene attraverso tre meccanismi.

- 1) *RNR1* è regolato a livello trascrizionale (Elledge and Davis, 1990; Huang *et al.*, 1998), attraverso il *checkpoint* Mec1/Rad53. In particolare, in condizioni di danno al DNA o di passaggio dalla fase G1 alla fase S, il *checkpoint* Mec1/Rad53, attraverso la chinasi Dun1, inattiva, mediante iperfosforilazione, la proteina Ctr1. Ctr1 è un fattore di trascrizione che, normalmente, lega una regione a monte di *RNR1*, inibendone la trascrizione attraverso il reclutamento del complesso inibitore Ssn6/Tup1. Durante il passaggio dalla fase G1 alla fase S o in seguito a danno sul DNA, attraverso un processo a cascata che coinvolge le chinasi Rad53 e Dun1, Ctr1 viene iperfosforilata e diventa incapace di legare la regione a monte di *RNR1*, permettendone così la trascrizione. In tal senso l'overespressione *RNR1* è in grado di sopprimere la letalità di un ceppo $\Delta mec1 \Delta rad53$ (Desany *et al.*, 1998).
- 2) L'attività di Rnr1p è regolata attraverso il legame con l'inibitore Sml1. *SML1* codifica per una proteina che si lega Rnr1, inibendone l'attività (Zhao *et al.* 2000a; Chabes *et al.*, 1999; Chabes *et al.*, 2003). *SML1* è stata identificata per la capacità di sopprimere la letalità in un ceppo $\Delta mec1$ (Suppressor of Mec Lethality) (Zhao *et al.*, 1998). In

particolare il deleto *Δsml1Δmec1* è vitale in quanto la proteina Rnr1, in assenza di Sml1, svolge la sua attività anche in assenza della cascata attivata dal *checkpoint* Mec1/Rad53. Come dimostrato da Chabes *et al.*, 1999, la proteina Sml1 lega *in vitro* la proteina Rnr1 in un rapporto molare 1:1, inibendone quasi completamente l'attività catalitica. In condizioni normali, la proteina Sml1 lega Rnr1, impedendo alla ribonucleotide reduttasi di catalizzare la sintesi di dNTP. Nel passaggio dalla fase G1 a S o in caso di danni al DNA, la proteina Sml1 viene fosforilata attraverso un processo a cascata che coinvolge il *checkpoint* Mec1/Rad53 e le proteine Rad9, Rad17, Rad54, Mec3 e Dun1 (Zhao *et al.*, 2001; Zhao and Rothstein, 2002). La fosforilazione inibisce il legame della proteina Sml1 a Rnr1 e ne induce la degradazione, in modo tale che durante la fase S la quantità di proteina è sei volte inferiore rispetto alla fase G1 e più di 10 volte inferiore in presenza di sostanze che danneggiano il DNA. Recentemente è anche stato dimostrato che la quantità di Sml1 è influenzata da una via Mec1-indipendente, che coinvolge il complesso Mre11/Rad50/Xrs2 e la proteina Rad9. In seguito a danni sul DNA, questo *pathway* converge col *pathway* Mec1/Rad53/Dun1 e porta alla degradazione di Sml1 (Corda *et al.*, 2005).

- 3) L'attività ribonucleotide reduttasi è regolata dalla localizzazione delle subunità Rnr2 e Rnr4 (Yao *et al.*, 2003). Infatti durante il ciclo cellulare Rnr1 e Rnr3 sono localizzati prevalentemente nel citoplasma, mentre Rnr2 e Rnr4 sono localizzati nel nucleo. In seguito a danno al DNA, Rnr2 e Rnr4 migrano nel citoplasma, dove possono legare le subunità Rnr1 e Rnr3 per formare il tetrametro della ribonucleotide reduttasi. Così come gli altri meccanismi di regolazione, la redistribuzione di Rnr2 e Rnr4 passa attraverso il *checkpoint* Mec1/Rad53/Dun1.

L'attività ribonucleotide reduttasi influenza profondamente la stabilità dell'mtDNA, essenzialmente incrementando la concentrazione dei dNTP, che, a seconda delle condizioni, aumenta di 2,5-8 volte overesprimendo *RNR1* o distruggendo *SML1* (reviewed in Nordlund and Reichard, 2006). La prima osservazione che *RNR1* influenza la stabilità dell'mtDNA è stata fatta da Lecrenier e Foury, che hanno identificato *RNR1* come soppressore multicopia di una mutazione termosensibile in *MIP1* (*mip1-1*) e di altri alleli mutanti *mip1*. Non solo *RNR1* in multicopia ripristinava la crescita a 37°C dei ceppi *mip1* termosensibili, ma riduceva del 50% la frequenza dei *petite* a 37°C di un ceppo diploide *MIP1/Δmip1* (Lecrenier and Foury, 1995). Studi successivi hanno dimostrato che l'overespressione di *RNR1* riduce la frequenza di mutanti *petite* in un ceppo selvatico, nonché in un ceppo *Apif* (O'Rourke *et al.*, 2005). *PIF1* codifica per una elicasi mitocondriale coinvolta nella riparazione e nella ricombinazione dell'mtDNA e la sua delezione, come noto, porta ad un accumulo del 60-70% di *petite* (Foury and Lahaye, 1987; Lahaye *et al.*, 1991). Inoltre è stato dimostrato che l'overespressione di *RNR1* in un contesto wt porta ad un incremento del numero di copie di mtDNA pari a circa 2,5 volte (Taylor *et al.*, 2005).

Effetti simili sono stati osservati mediante la distruzione di *SML1*. In particolare la distruzione di *SML1* sopprime il fenotipo termosensibile del mutante *mip1-1* e riduce di circa due volte la

frequenza dei *petite* (Zhao *et al.*, 1998). Inoltre la delezione di *SML1* riduce la frequenza dei *petite* e incrementa di circa 2 volte il numero di copie di mtDNA in un contesto wt o *Apif1*, in modo del tutto analogo all'overespressione di *RNR1* (Taylor *et al.*, 2005).

Da questi risultati emerge chiaramente come l'attività ribonucleotide reduttasica influisca profondamente, in lievito, sulla stabilità dell'mtDNA. Sulla base dei meccanismi di regolazione sopra riportati, la stabilità dell'mtDNA è dunque profondamente influenzata dal checkpoint Mec1/Rad53.

La ribonucleotide reduttasi è presente ovviamente anche nei mammiferi e dunque nell'uomo. Nei mammiferi è presente un gene codificante la subunità maggiore R1 e un gene codificante la subunità minore R2. Le due subunità interagiscono formando l'eterotetramero $\alpha_2\beta_2$. Il grado di conservazione delle subunità minori e maggiori è molto elevata: ad esempio l'identità di sequenza fra lievito e mammiferi è del 60-70%.

Per quanto concerne la regolazione, nei mammiferi così come nel lievito l'espressione della ribonucleotide reduttasi è indotta nel passaggio dalla fase G1 a S e in seguito a danni sul DNA (reviewed in Nordlund and Reichard, 2006). Mentre nel lievito è regolata essenzialmente la sintesi e l'attività di Rnr1, nei mammiferi è la subunità R2 ad essere regolata, essendo questa la subunità limitante per l'attività enzimatica. In primo luogo il gene R2 è regolato a livello trascrizionale, attraverso varie sequenze situate a monte del gene R2 (Chabes *et al.*, 2004). Una delle sequenze è legato dal repressore E2F4, che reprime la sintesi della subunità R2 durante la fase G1 (DeGregori *et al.*, 1995). In secondo luogo la subunità R2 è degradata durante la mitosi, attraverso un processo di ubiquitinazione seguito dalla proteolisi (Chabes and Thelander, 2000). In terzo luogo, in seguito a danni sul DNA, viene indotta la sintesi di una subunità R2 alternativa, la subunità p53R2, la cui sintesi è indotta dalla proteina p53, che induce anche l'overespressione della subunità R1, in seguito a danni sul DNA (Lin *et al.*, 2004). E' da notare che sebbene i meccanismi di regolazione mostrino alcune differenze, entrambi dipendono dal checkpoint Mec1/Rad53. Nei mammiferi infatti esistono le due proteine omologhe, ATM/ATR e CHK2, che agiscono come trasduttori del segnale e, come effetto finale, regolano la sintesi di numerosi geni coinvolti nella sintesi e nella riparazione del danno sul DNA (reviewed in Rotman and Shiloh, 1999). Ad esempio ATM/ATR e CHK2 stabilizzano p53, inducendo di conseguenza la sintesi di p53R2 e di R1 (Tanaka *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000b; reviewed in Caspari, 2000).

I mammiferi mancano invece di un omologo della proteina *SML1*. E' interessante notare che la proteina Sml1 di lievito è però in grado di inibire, legandosi ad essa, anche la subunità R1 di topo e uomo (Zhao *et al.*, 2000a), suggerendo come anche la struttura della subunità Rnr1 sia altamente conservata fra lievito e mammiferi.

1.6.2 Geni che influenzano la trasmissione dell'mtDNA: *CCE1*

Il gene *CCE1* codifica per la Cutting Cruciform Endonuclease, un enzima a localizzazione mitocondriale che catalizza la risoluzione delle giunzioni di Holliday durante i processi di ricombinazione.

Il gene *CCE1* è allelico a *MGT1* (da **Mitochondrial Genome Transmission**), identificato nel 1991 (Zweifel and Fangman, 1991). In questo studio venne dimostrato come mutazioni in *MGT1* influenzino la trasmissione dell'mtDNA, favorendo la trasmissione delle molecole ρ^+ in un diploide derivato dall'incrocio di un ceppo aploide ρ^+ e di un ceppo aploide ρ^- ipersoppressivo. Come detto precedentemente, un ceppo ρ^- ipersoppressivo è definito tale se, incrociato con un aploide ρ^+ , produce una progenie diploide al 95% ρ^- . In mutanti *mgt1* la percentuale scende sotto l'1%, dimostrando come la trasmissione di diverse specie di mtDNA sia influenzata da geni nucleari. Successivamente, il gene *CCE1/MGT1* è stato identificato con un approccio completamente differente come gene codificante una endonucleasi cruciforme (Kleff *et al.*, 1992). In questo studio è stato dimostrato come mutazioni nel gene *CCE1* rendano il ceppo resistente a ceppi ρ^- ipersoppressivi, e, parallelamente, come mutazioni nel gene *MGT1* riducano l'attività endonucleasica cruciforme, dimostrando che i due geni sono allelici. Successivamente è stato dimostrato che:

- la proteina Cce1 è situata nel mitocondrio ed è associata alla membrana mitocondriale interna (Ezekiel and Zausenhaus, 1993);
- la mancanza di Cce1 porta ad un incremento delle molecole associate tramite giunzioni di Holliday in modo tale da formare un numero minore di nucleoidi all'interno del mitocondrio rispetto ad ceppo wt (Lockshon *et al.*, 1995);
- l'overespressione di Cce1 riduce la frequenza di strutture ramificate fra diverse molecole di DNA e favorisce la trasmissione di genomi ρ^- non soppressivi rispetto a genomi ρ^+ (Lockshon *et al.*, 1995);
- la delezione di *CCE1* favorisce il trasferimento alla progenie di molecole di DNA ρ^+ che presentano delezioni nelle regioni intergeniche rispetto a molecole wt. Tuttavia, le due specie di molecole vanno ancora incontro a ricombinazione. (Piskur, 1997)
- la delezione del gene *CCE1* causa un incremento, seppure moderato, nell'accumulo di mutanti ρ^- (Kleff *et al.*, 1992)
- l'incremento di ρ^- in un mutante *cce1* è ulteriormente incrementato dalla delezione del gene *NUC1*, codificante la maggiore endonucleasi mitocondriale. La sola delezione di *NUC1* non ha effetto sulla produzione di *petite* (Zassenhaus *et al.*, 1988).

Studi circa la funzionalità di Cce1p hanno dimostrato che essa si trova sottoforma di dimero. Il dimero Cce1p è in grado di riconoscere diverse sequenze, probabilmente interagendo con strutture del *backbone* di DNA. Le sequenze devono però necessariamente essere organizzate come strutture a quattro-braccia, così come nelle giunzioni di Holliday. Strutture lineari o *loop* non vengono riconosciuti e tagliati da Cce1p, mostrando il suo coinvolgimento soltanto nei processi di ricombinazione. Da questi studi è emerso come Cce1p, legandosi al substrato, ne modifichi la struttura, che deve essere in una forma rilassata per poter essere tagliata dalla proteina. Infine, è emerso che Cce1p è in grado solo di tagliare strutture cruciformi che stanno andando incontro a *branch migration* (White and Lilley, 1996; White and Lilley, 1997; Schofield *et al.*, 1997; Schofield *et al.*, 1998).

Il gene *CCE1* non ha omologhi umani. In uno studio recente però è stato espresso il gene *CCE1* in colture di cellule umane contenente duplicazioni dell'mtDNA (Sembongi *et al.*,

2007). Lo scopo era di incrementare l'attività della ricombinazione omologa intramolecolare già presente a livello di cellule di mammifero, come descritto di seguito. In particolare la finalità era valutare se Cce1p promuovesse la ricombinazione intramolecolare della molecola parzialmente duplicata così da dare origine a molecole wt. Sembongi *et al.* hanno osservato che, in presenza di una bassa espressione di *CCE1*, tendono a formarsi molecole wt, che possono essere anche la popolazione prevalente. Un'elevata espressione di *CCE1* porta invece alla perdita irreversibile dell'mtDNA. Quest'ultimo fenomeno viene interpretato col fatto che un eccesso di mtDNA può distorcere l'mtDNA così da bloccare vari processi, fra cui la replicazione dell'mtDNA.

1.6.3 Gene *MHR1*, coinvolto nella ricombinazione e nella riparazione del DNA

Nel 1996 Ling *et al.* hanno identificato un mutante, chiamato *mhr1-1*, incapace di portare avanti il processo di ricombinazione fra due molecole ρ^+ a 30°C (Ling *et al.*, 1995). Nello studio veniva dimostrato anche come la mutazione incrementasse la frequenza di *petite* in seguito a trattamento con raggi UV a 30°C, e spontaneamente a 37°C. In particolare, la frequenza di *petite* raggiungeva valori elevati, pari all'80% a 37°C. Fra questi *petite* vi erano sia cloni ρ^- che cloni ρ^0 . Studi successivi hanno dimostrato come l'accumulo di specie ρ^- oppure ρ^0 sia dovuto a meccanismi diversi in cui è coinvolta la proteina Mhr1.

In particolare è stato dimostrato come l'accumulo di danni ossidativi sul DNA dovuti a ROS siano uguali a 30°C in un ceppo *MHR1* e in un ceppo *mhr1-1*, ma a 37°C il danno ossidativo è molto più esteso nel ceppo *mhr1-1* (Ling *et al.*, 2000). Inoltre il trattamento con acido malonico, un inibitore del ciclo di Krebs che ha come effetto finale la riduzione dello stress ossidativo spontaneo, a 37°C riduce di circa 2 volte la frequenza di *petite* nel ceppo *mhr1-1*.

In secondo luogo è stato dimostrato che l'attività di Mhr1 nel processo di ricombinazione è fondamentale per il trasferimento alla progenie di molecole di DNA intatte, spiegando così l'accumulo di ρ^0 a 37°C nei mutanti *mhr1* (Ling and Shibata, 2002). In particolare mutanti *mhr1*, a 37°C, non mostrano alcuna molecola di mtDNA nella gemma nascente.

In terzo luogo, mutanti *mhr1-1* mostrano a 30°C un ritardo della segregazione vegetativa che ha, come conseguenza, un ritardo nella comparsa di cellule omoplasmiche (Ling and Shibata, 2004). Al contrario l'overespressione aumenta di circa 2,5 volte la velocità di comparsa di cellule omoplasmiche. Questa osservazione dimostra come Mhr1 svolga un ruolo importante nella segregazione vegetativa delle varie forme di DNA mitocondriale in cellule eteroplasmiche così da formare cellule omoplasmiche. Questo fenomeno è legato alla formazione di concatameri, cioè di molecole lineari di mtDNA legate l'una all'altra che, nel mutante *mhr1-1*, sono ridotti, mentre nel ceppo overesprimente *MHR1* sono prodotti in quantità maggiori, suggerendo che Mhr1 svolga anche un ruolo nella formazione di concatameri, probabilmente promovendo un meccanismo di replicazione *rolling circle*. (Ling and Shibata, 2004)

Dal punto di vista funzionale, è stato osservato come la proteina Mhr1 favorisca l'appaiamento heteroduplex, almeno *in vitro*. In presenza di un DNA a singolo filamento e di

un DNA circolare a doppio filamento omologo, la proteina Mhr1 promuove l'appaiamento del DNA singolo filamento sul DNA a doppio filamento, così da formare un heteroduplex a doppia elica più una parziale regione a singolo filamento (Ling and Shibata., 2002). L'appaiamento heteroduplex è noto per essere un intermedio nei processi di ricombinazione. L'appaiamento heteroduplex è indipendente dalla sequenza, sebbene ovviamente le due sequenze debbano essere omologhe. La proteina mutata Mhr1-1 non presenta invece alcun appaiamento heteroduplex, e la mancanza è dovuta all'incapacità della proteina mutata di legare il DNA substrato.

Visto il ruolo di Mhr1 nel processo di ricombinazione, è stato creato un doppio mutante *mhr1 Δcce1* per valutare l'effetto sull'accumulo di *petite* (Ling and Shibata, 2002). Il doppio mutante è respiratorio deficiente e inoltre non mostra la presenza di mtDNA, risultando pertanto rho⁰. Questo risultato dimostra come i processi di ricombinazione dell'mtDNA di *S. cerevisiae* siano fondamentali per il mantenimento dell'mtDNA. Questo dato è supportato anche dall'osservazione che i ceppi distrutti in *PIF1*, come precedentemente detto, mostrano un forte accumulo di mutanti *petite* (Foury and Lahaye, 1987; Lahaye *et al.*, 1991).

Per quanto concerne l'uomo non è stato trovato alcun omologo alla proteina Mhr1, così come a Cce1. Questa osservazione non sorprende, visto che nei mitocondri un'attività di ricombinazione, sebbene presente, è comunque bassa rispetto all'attività di ricombinazione omologa presente in *S. cerevisiae*.

1.6.4 Gene *MSH1*, coinvolto nel *mismatch repair* e nella ricombinazione

Il gene *MSH1* codifica per l'unica proteina omologa a MutS presente nel mitocondrio (**MutS Homologue**). Come sottolineato in precedenza, la proteina MutS di *E.coli*, insieme alle proteine MutL e MutH, è coinvolta nella riparazione dei *mismatch* che si generano in seguito a errori di replicazione oppure durante ricombinazione. Nel lievito sono presenti sei geni omologhi a MutS coinvolti nella riparazione dei *mismatch* e di piccoli *loop* a singolo filamento (*MSH1-2-3-6*) e nel crossino over meiotico (*MSH4-5*) (Hollingsworth *et al.*, 1995).

MSH1 codifica per una proteina che presenta una similarità del 29% con *E. coli* MutS (Chi and Kolodner, 1994a). Strutturalmente, essa possiede due domini: un dominio di legame al DNA e un dominio ATPasico. Il dominio di legame al DNA si lega specificatamente a strutture che presentano uno o più *mismatch* e a strutture che presentano un *loop* a singolo filamento di 2-3 nucleotidi (Chi and Kolodner, 1994b). Msh1 lega qualsiasi tipo di *mismatch*, ma il legame è più forte per coppie pirimidina-purina, e più debole per coppie purina-purina e pirimidina-pirimidina. Per quanto concerne il dominio ATPasico, Msh1 è in grado di idrolizzare ATP e dATP (Chi and Koldner, 1994b). L'attività ATPasica è inoltre stimolata dal legame al DNA heteroduplex. Inoltre Msh1, come MutS, agisce come dimero (Mookerjee and Sia, 2006).

Mutazioni nel gene *MSH1* hanno effetti sulla mutabilità sia estesa che puntiforme del DNA mitocondriale. Per quanto concerne la mutabilità estesa, la delezione di *MSH1* induce in breve tempo la formazione di *petite* (Reenan and Kolodner, 1992). In particolare dopo sporificazione di un ceppo *MSH1/Δmsh1*, le due spore *Δmsh1* mostrano un fenotipo *petite* se

fatte crescere in terreno addizionato di glucosio, suggerendo che il fenotipo respiratorio deficiente subentri nel giro di poche generazioni. Su terreno massimo addizionato di glicerolo, alcune spore invece mantengono la capacità di crescere, sebbene molto lentamente, indicando che la delezione in *MSH1* non è incompatibile col mantenimento dell'mtDNA (Reenan and Kolodner, 1992). Inoltre, mentre la maggior parte dei *petite* spontanei che si formano in un contesto wt presentano soppressività intermedia, il 60-70% dei *petite* che si formano in un contesto *Amsh1* sono ipersoppressivi. La delezione in *MSH1* altera anche la morfologia e/o la distribuzione mitocondriale. Infatti ceppi *Amsh1* incubati in presenza di DAPI, anziché mostrare il caratteristico pattern costituito da strutture puntiformi nella periferia del citoplasma, presentano solo due-tre agglomerati che raggiungono una grandezza pari a circa il 20% del nucleo (Reenan and Kolodner, 1992). Anche l'overespressione di *MSH1* aumenta l'accumulo di *petite* (Koprowski *et al.*, 2002; Dzierzbicki *et al.*, 2004). L'aumento di *petite* sembra non essere però correlato all'attività di riparazione di *mismatch*, ma piuttosto alla capacità di Msh1 di influire sulla ricombinazione omologa (Dzierzbicki *et al.*, 2004).

Per quanto concerne la mutabilità puntiforme, essa è stata dapprima misurata in un contesto diploide *MSH1/Amsh1*. Questi diploidi producono mutanti Ery^R con una frequenza sette volte maggiore rispetto a ceppi wt, suggerendo non solo che Msh1 è coinvolto in processi di riparazione, ma che la proteina è presente in quantità limitanti (Chi and Kolodner, 1994b). Successivamente è stato dimostrato che ceppi che presentano mutazioni puntiformi in *MSH1* e mantengono il DNA mitocondriale presentano una frequenza di mutanti Ery^R dovuti a transizioni nel gene per il 21S rRNA e una frequenza di mutanti Oly^R dovuta a transizioni nel gene *OLI1* maggiore (Vanderstraeten *et al.*, 1998). Al contrario, mutazioni nel dominio esonucleasico di Mip1 incrementano la frequenza di mutazioni Ery^R e Oli^R per trasversione, suggerendo che l'attività di *proofreading* di Mip1 sia coinvolta nella riparazione soprattutto di trasversioni, mentre l'attività di riparazione di *mismatch* di Msh1 sia coinvolta soprattutto nella riparazione di transizioni. Questa osservazione è in accordo con l'osservazione che Msh1 lega preferenzialmente *mismatch* costituiti da un errato appaiamento pirimidina-purina. A conferma del fatto che la proteina Msh1 è presente in quantità limitanti, è stato dimostrato che una blanda overespressione di Msh1 in un contesto aploide riduce la frequenza di mutanti Ery^R (Koprowski *et al.*, 2002). La riduzione di mutanti Ery^R è dipendente dall'attività ATPasica, in quanto mutazioni nel dominio ATPasico che inibiscono l'idrolisi di ATP inibiscono la riduzione di mutanti Ery^R (Koprowski *et al.*, 2002; Mookerjee *et al.*, 2005). Inoltre, alcune mutazioni nel dominio ATPasico e altre nel dominio di legame di *mismatch* sono dominanti e incrementano in seguito a overespressione la frequenza di mutanti Ery^R (Koprowski *et al.*, 2002; Mookerjee *et al.*, 2005).

E' stato inoltre dimostrato che *MSH1* è coinvolto nella riparazione di danni ossidativi (Dzierzbicki *et al.*, 2004). Infatti mutazioni in *OGG1*, codificante la 8-oxo-dG DNA glicosilasi coinvolta nella riparazione mediante BER di 8-oxoG, induce un aumento della frequenza di mutanti Oli^R. L'overespressione di *MSH1*, anche in singola copia, riduce la frequenza di mutanti Oli^R in un contesto *ogg1*. Come la riparazione dei *mismatch*, l'attività di

riparazione di danni ossidativi ad opera di Msh1 dipende dall'attività ATPasica, in quanto mutazioni nel dominio ATPasico inibiscono il *rescue* da parte della proteina Msh1.

Recentemente è stato anche chiarito il ruolo di Msh1 nella ricombinazione (Moockerjee and Sia, 2006). In questo studio sono stati analizzati gli effetti di tre mutazioni differenti: la mutazione F105A, situata nel dominio di legame al DNA, inibisce l'interazione col DNA heteroduplex e ha come effetto la riduzione dell'affinità di legame col DNA e l'inibizione della riparazione di *mismatch*; la mutazione G776D, situata nel dominio ATPasico, inibisce il legame di ATP, l'idrolisi di ATP e la riparazione; la mutazione R813W, situata nel dominio ATPasico, inibisce l'idrolisi di ATP, ma non il legame al DNA. Mutazioni omologhe in *MSH2* e *MSH6* alterano il ruolo delle proteine nel processo di inibizione di ricombinazione fra heteroduplex. Le proteine mutate mostrano un aumento della frequenza di mutazioni puntiformi, ma allo stesso tempo un notevole aumento di delezioni mediate da ripetizioni mediante ricombinazione. Questa osservazione dimostra che Msh1 è coinvolta, in maniera *mismatch* indipendente, nell'inibizione della ricombinazione. E' stato dimostrato inoltre che Msh1 è coinvolto in un *pathway* diverso da quello in cui sono coinvolte le proteine Mhr1 e Cce1. La delezione di questi due geni non altera la frequenza di delezioni mediate da ripetizioni nell'mtDNA, suggerendo che ci sia un altro *pathway* coinvolto nella ricombinazione (Phadnis *et al.*, 2005). La delezione di *MHR1* o *CCE1*, in associazione con l'allele *msh1-G776D*, aumenta invece la frequenza di delezioni, indicando che i geni sono coinvolti in *pathway* diversi. Infine è stato dimostrato che Msh1, come Mhr1, svolge un ruolo importante nella segregazione vegetativa che porta all'omoplasma. Infatti i ceppi recanti gli alleli *msh1* mutati presentano un forte ritardo nella segregazione vegetativa dell'mtDNA (Phadnis *et al.*, 2005).

Dai risultati sopra esposti emerge chiaramente come Msh1 svolga diversi ruoli nel processo di mantenimento dell'mtDNA, e questo spiega perché singole mutazioni in *MSH1* presentano effetti pleiotropici.

Così come *CCE1* e *MHR1*, *MSH1* non ha omologhi che funzionano nei mitocondri di mammiferi.

1.6.5 Gene *CDC9*

Il gene *CDC9* codifica per una DNA ligasi I presente nel nucleo e nel mitocondrio. Le DNA ligasi I sono enzimi coinvolti nel processo di replicazione, nel quale hanno il ruolo di ligare i frammenti di Okazaki sul filamento ritardato, e in vari processi di riparazione (Petrini *et al.*, 1995; Prigent *et al.*, 1994, reviewed in Tomkinson *et al.*, 2006). *Cdc9* è un gene fondamentale per la sintesi di DNA, per cui la delezione è letale (Barker *et al.*, 1985). Mutanti condizionali *cdc9* sono deficienti nella ligazione dei frammenti di Okazaki, sono ipersensibili a sostanze che danneggiano il DNA e mostrano un'elevata frequenza di ricombinazione mitotica. Per quanto concerne la regolazione, *CDC9* è espresso in maniera ciclo dipendente e raggiunge la sua massima espressione durante il passaggio dalla fase G1 alla fase S (Peterson *et al.*, 1985). Inoltre l'espressione di *CDC9* è indotta da agenti che danneggiano il DNA (Johnson *et al.*, 1986).

Willer *et al.*, 1999 hanno dimostrato che *CDC9* codifica, a partire da due codoni di inizio diversi, due isoforme di DNA ligasi I. La forma più corta è presente nel nucleo, dove è anche presente l'altra DNA ligasi di *S. cerevisiae*, Dnl4, coinvolta nel processo di *non-homologous end joining*. La forma più lunga, recante anche una sequenza target mitocondriale, è presente nel mitocondrio, dove costituisce l'unica attività DNA ligasica. In particolare, la sostituzione del primo codone d'inizio inibisce la sintesi della forma mitocondriale e porta la cellula ad un fenotipo *petite*. La ligasi I mitocondriale è inoltre associata alla membrana, mentre la forma nucleare si trova in soluzione (Willer *et al.*, 1999).

Studi successivi hanno dimostrato come una forma termosensibile di Cdc9 mitocondriale determini una riduzione del numero di copie di mtDNA di circa il 50% (Donahue *et al.*, 2001), dimostrando come Cdc9 sia fondamentale per il mantenimento dell'mtDNA. Cdc9 è fondamentale per il mantenimento dell'mtDNA anche durante la fase stazionaria e pertanto sembra essere richiesta anche per stabilizzare mtDNA che non si sta replicando. Un'ipotesi è che Cdc9 sia coinvolta, come nel nucleo, nel BER, ad esempio legandosi ad estremità di DNA formate durante il BER al fine di proteggerle dall'immediata degradazione ad opera di endonucleasi mitocondriali. Inoltre è stato dimostrato come Cdc9 sia fondamentale per la riparazione di tagli a doppio filamento. In seguito infatti ad espressione transiente nel mitocondrio dell'endonucleasi *EcoRI*, la forma Cdc9 wt ripara i danni a doppio filamento indotti da *EcoRI*, mentre la forma termosensibile mitocondriale determina la comparsa di un fenotipo respiratorio deficiente (Donahue *et al.*, 2001).

Nell'uomo la DNA ligasi I omologa a Cdc9 è presente solo nel nucleo. Nel mitocondrio è però presente la ligasi III, l'unica DNA ligasi mitocondriale umana. La ligasi III umana e Cdc9, nonostante presentino differenze nella struttura, hanno molte caratteristiche in comune, in modo tale da poter considerare le due ligasi ortologhi funzionali. In primo luogo il gene *LIG3* codifica, come *CDC9*, per due isoforme di DNA ligasi III. L'isoforma più breve, tradotta dal secondo codone di inizio, localizza nel nucleo. La forma più lunga, tradotta dal primo codone di inizio, localizza nel mitocondrio (Lakshmipathy and Campbell, 1999). Per la funzionalità della ligasi nucleare è necessaria l'interazione con la proteina XRCC1, fondamentale per la stabilità e l'attività della ligasi III (Caldecott *et al.*, 1995). D'altra parte la proteina XCRR1 è assente nel mitocondrio, suggerendo che la ligasi III possa funzionare senza di essa (Lakshmipathy and Campbell, 2000). In secondo luogo, la ligasi III, come Cdc9, è fondamentale per il mantenimento dell'mtDNA (Lakshmipathy and Campbell, 2000; Lakshmipathy and Campbell, 2001). In particolare cellule con un ridotto contenuto di ligasi III mitocondriale hanno un ridotto numero di copie di mtDNA e presentano vari tagli a singolo filamento sull'mtDNA (Lakshmipathy and Campbell, 2001). In terzo luogo la ligasi III svolge un ruolo fondamentale nella riparazione dei tagli a singolo filamento e, come Cdc9, nel BER (Caldecott *et al.*, 1996).

Uno studio recente ha dimostrato come nel mitocondrio vi sia un'interazione fra DNA ligasi III e polimerasi γ fondamentale per la stabilità dell'mtDNA (De and Campbell, 2007). In questo studio è stato dimostrato che le due proteine interagiscono sia *in vitro* che *in vivo*. L'interazione coinvolge il dominio centrale della ligasi, in cui è situato il sito attivo, e il

dominio C-terminale della polimerasi contenente il sito catalitico. Inoltre forme mutate della ligasi III, non in grado di catalizzare la ligazione ma in grado di interagire con pol γ , diminuiscono di circa il 20% il numero di copie di mtDNA in cellule esprimenti solo la forma mutata o anche la forma selvatica di ligasi III. Questo risultato viene interpretato in termini di sequestro di pol γ : le DNA ligasi mutate legano pol γ e impediscono che questa possa replicare correttamente l'mtDNA. Inoltre l'interazione di ligasi III e pol γ è fondamentale affinché quest'ultima possa partecipare al BER. Infatti, mentre in presenza di ligasi III selvatica la polimerasi può legare DNA con tagli a singolo filamento, in presenza di DNA ligasi III priva del dominio di legame al DNA, il legame di pol γ al DNA viene meno. Pertanto il riconoscimento e il legame di pol γ al DNA a singolo filamento non sembra essere diretto, ma mediato dalla DNA ligasi III. Come conseguenza, in presenza della DNA ligasi mutata, l'attività BER è ridotta di circa il 50%.

1.6.6 Geni *REV3* e *REV7*

I geni *REV3* e *REV7* codificano rispettivamente per la subunità catalitica e la subunità accessoria della polimerasi zeta, una polimerasi ripartiva coinvolta nella sintesi translesione del DNA.

Come detto in precedenza, la sintesi translesione è fondamentale per la replicazione del DNA in presenza di una base danneggiata sul template. Normalmente danni sul template vengono riparati da opportuni meccanismi di replicazione quali la BER e la *nucleotide excision repair*. Qualora il danno non venga riparato, è necessaria una sintesi translesione in corrispondenza del danno, per impedire che la polimerasi venga rilasciata dalla forca replicativa e che la replicazione si arresti, cosa che porterebbe alla morte della cellula (Lawrence, 2004). In tal senso la sintesi translesione fa parte dei cosiddetti sistemi di tolleranza dell'errore, che si distinguono dai sistemi di riparazione in quanto non riparano il danno, ma permettono comunque che la replicazione possa procedere. In generale, alcuni danni sul template, quali basi ossidate, basi alchilate, dimeri di timina e siti apurinici, bloccano la replicazione, in quanto le polimerasi replicative non sono in grado di incorporare un nucleotide opposto alla lesione e soprattutto di estendere il DNA a partire da un *mismatch* costituito da una lesione opposta ad un nucleotide (reviewed in Murakumo, 2002). La sintesi translesione è invece affidata ad opportune polimerasi riparative, che sono in grado di portare a termine la sintesi di DNA in presenza di un danno sul template. Nel nucleo sono coinvolte diverse polimerasi nella sintesi translesione, fra cui Pol zeta, che è coinvolta nella sintesi translesione *errore-prone*, che è responsabile dell'incremento della mutabilità puntiforme spontanea e indotta.

Rev3 costituisce la subunità catalitica della polimerasi zeta, mentre Rev7 codifica per una subunità accessoria fondamentale per il mantenimento del complesso e che aumenta l'attività polimerasica di Rev3 di circa 200 volte (Morrison *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1996a; Torpey *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1996b). *REV3* codifica per una DNA polimerasi che appartiene alla famiglia B delle polimerasi, a cui appartengono anche le polimerasi replicative eucariotiche. Rispetto a queste ultime Rev3, come altre polimerasi riparative, manca di un dominio 3'-5' esonucleasico. Inoltre essa è scarsamente processiva, in quanto il 50% della polimerasi zeta

(compresa Rev7) si stacca dal templatato dopo l'incorporazione di 3 nucleotidi (Nelson *et al.*, 1996a).

Nella sintesi translesione Pol zeta ha due ruoli. Un ruolo minore, l'attività di *bypass*, consiste nell'incorporazione di un nucleotide opposto ad una lesione, ruolo che è svolto principalmente da altre polimerasi riparative. In particolare Pol zeta può incorporare nucleotidi, sebbene a bassa efficienza, opposti ad un dimero TT cis-syn ciclobutano e ad un dimero di timina (6-4) derivante dal trattamento con UV (reviewed in Prakash *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2000b; Guo *et al.*, 2001). Essa non è in grado invece di inserire nucleotidi in opposizione ad un sito apurinico e a 8-oxo-dG (Haracska *et al.*, 2001). Come detto, la polimerasi zeta svolge soltanto un ruolo minore nell'attività di *bypass*, in cui giocano un ruolo più importanti altre polimerasi replicative, quali la DNA polimerasi ϵ e Rev1p (reviewed in Prakash *et al.*, 2005; Gibbs *et al.*, 2005). Ad esempio, la polimerasi ϵ gioca un ruolo fondamentale nel *bypass* del dimero TT cis-syn ciclobutano, Pol32, una subunità della polimerasi delta, nel *bypass* del fotoaddotto (6-4), e Pol32, o Rev1, sono coinvolti nel *bypass* di un sito apurinico (Gibbs *et al.*, 2005).

Il maggior ruolo di Pol zeta consiste invece nell'estensione di *mismatch*. Dopo l'incorporazione opposta ad una base danneggiata di un nucleotide ad opera delle polimerasi sopra riportate, è necessario che una polimerasi replicativa estenda il *mismatch* costituito da un nucleotide opposto alla lesione. Le polimerasi replicative non sono in grado di svolgere questo compito, a causa della struttura distorta del templatato. Fra le polimerasi riparative, soltanto Pol zeta è in grado di catalizzare questa reazione. Grazie a Pol zeta, ciascuna copia nucleotide-lesione di cui detto prima, viene estesa efficacemente da Pol zeta (Nelson *et al.*, 1996a; Johnson *et al.*, 2000b; Haracska *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001). Da questo emerge che la translesione, necessita, in generale, di due polimerasi riparative, uno per il *bypass* della lesione e una per l'estensione del *mismatch*. In secondo luogo, la replicazione di Pol zeta è *error prone*. Essa infatti, qualora incorpori un nucleotide opposto alla lesione, incorpora spesso un nucleotide sbagliato. Allo stesso modo, a causa della distorsione del templatato, spesso inserisce basi non corrette a partire da un'estremità *mismatch*. L'effetto determina un aumento della frequenza di sostituzioni puntiformi o di *frameshift* (reviewed in Lawrence and Maher, 2001). A questo va aggiunta l'osservazione che la polimerasi zeta è in grado di estendere anche *mismatch* costituiti da due nucleotidi non complementari, con una frequenza da 2 alle 1000 volte superiore, a seconda del tipo di *mismatch*, rispetto all'estensione portata avanti dalla polimerasi alfa (Lawrence *et al.*, 2000). La capacità di estendere *mismatch*, dovuta anche al fatto Pol zeta non possiede un dominio esonucleasico, incrementa ulteriormente la frequenza di errori associati all'attività di Pol zeta stessa.

L'attività di Pol zeta necessita dell'attività di Rev1, identificata inizialmente come un deossicitidil trasferasi. La proteina è in grado di incorporare sul DNA in crescita uno o pochi residui di citidina. Esso tende ad incorporare preferenzialmente *in vitro* un residuo dC opposto ad un sito apurinico (circa 60%) rispetto ad un dG (20%), a un dA o un dU (10%) e a un dT o un dC (1%) (Nelson *et al.*, 1996b). In tal senso Rev1 gioca direttamente un ruolo fondamentale nella sintesi translesione di un sito apurinico, ovviamente in maniera *error prone*, in quanto incorpora sempre in opposizione al sito apurinico un residuo dC. Studi più

recenti hanno dimostrato che Rev1 svolge una seconda funzione, indipendente dalla prima, e che consiste nell'interazione con la subunità Rev7 di Pol zeta responsabile del mantenimento del complesso Rev3-Rev7 (Nelson *et al.*, 2000; Acharya *et al.*, 2005; D'Souza and Walker, 2006; Acharya *et al.*, 2006). Questa seconda funzione è indipendente dalla prima, in quanto mutazioni che inibiscono l'attività trasferrica permettono a Rev1 di partecipare comunque alla sintesi translesione (Haracska *et al.*, 2001). L'interazione coinvolge il dominio PAD (dominio associato alla polimerasi di Rev1) e, probabilmente, anche la regione C-terminale di Rev1 (Acharya *et al.*, 2005; D'Souza and Walker, 2006). L'interazione non è fondamentale solo per il mantenimento, ma la presenza di Rev1 rende Pol zeta più efficiente, sia nel processo di *bypass* di lesioni sia nel processo di estensione di *mismatch* (Acharya *et al.*, 2006). Per quanto concerne i fenotipi, mutazioni o delezione di *REV3* e di *REV7*, nonché di *REV1*, rendono il ceppo maggiormente sensibile al trattamento con UV e con agenti chimici che danneggiano il DNA, riducendo il numero di cellule sopravvissute al trattamento, conferendo d'altra parte un fenotipo reversionless, cioè in cui non si osservava reversione di specifiche mutazioni (Lawrence *et al.*, 1985; Lemontt, 1971). Infatti delezioni in questi geni, se da una parte aumentano la sensibilità a sostanze che danneggiano il DNA, dall'altra riducono notevolmente la frequenza di mutazioni del DNA, in quanto la sintesi translesione di Pol zeta e Rev1 è *error prone*. Diversi studi hanno dimostrato che l'attività di Pol zeta è responsabile del 98% delle mutazioni per sostituzione e del 95% delle mutazioni di *frameshift* indotte dal trattamento con UV, mentre l'attività di Rev1 è responsabile del 95% delle mutazioni per sostituzione sempre in seguito a trattamento con UV (reviewed in Lawrence and Maher, 2001). Pol zeta è anche responsabile del 50%-75% della mutabilità spontanea, non indotta da agenti esterni (Quah *et al.*, 1980).

Recentemente è stato dimostrato che Pol zeta, e Rev1, sono presenti e funzionano nel mitocondrio di *S. cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2006; Kalifa and Sia, 2007). Zhang *et al.* hanno dimostrato, mediante fusione dell'estremità N-terminale di Rev3, Rev7 e Rev1 con la proteina GFP, che le proteine localizzano nei mitocondri. Hanno inoltre dimostrato che la delezione di *REV3* e di *REV7* riduce notevolmente la frequenza reversioni per *frameshift* di un nucleotide nell'*mtDNA*, di circa 30-40 volte in assenza di trattamenti mutageni e di 5-6 volte in seguito a trattamento con UV. Inoltre queste frequenze non sono alterate dall'introduzione di mutazioni in *MIP1*, indicando che Pol γ e Pol zeta appartengono allo stesso gruppo epistatico e suggerendo che fra le due proteine, e fra le proteine e Rev1, vi siano complesse interazioni.

Kalifa and Sia, 2007 hanno dimostrato per la prima volta che la polimerasi zeta e Rev1 contribuiscono alla comparsa di mutanti *petite* in seguito a trattamento con UV. Il ceppo $\Delta rev1$ mostra una riduzione della frequenza di *petite* di 5 volte rispetto al wt in seguito a trattamento con UV, mentre i ceppi deleti in *REV3* o in *REV7* mostrano una riduzione di circa 60 volte rispetto al wt. In assenza di trattamento con raggi UV, però, le frequenze sono simili. Inoltre è stato dimostrato che la delezione di uno dei tre geni incrementa la frequenza di mutazioni puntiformi per sostituzione dell'*mtDNA*, come dimostrato da un aumento della frequenza di mutanti Ery^R, sia in presenza che in assenza del trattamento con UV. Questi risultati sono opposti a quelli osservati nel nucleo, e suggeriscono che Pol zeta e Rev1 siano

coinvolti nella riparazione dei danni indotti da UV, ma in maniera *error free*. D'altra parte pone in evidenza che nei mitocondri deve esserci un sistema di riparazione *error prone* che, in assenza di Pol zeta e Rev1, incrementa la frequenza di mutazioni puntiformi in seguito a trattamento UV. Questo sistema di riparazione *error prone* potrebbe essere costituito da Mip1 stesso.

Pol zeta è presente e conservata nella maggior parte degli eucarioti, e in tutti i mammiferi. In particolare sono state identificate nell'uomo le proteine omologhe Rev3 e Rev7 (Morelli *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999; Gibbs *et al.*, 2000; Murakumo *et al.*, 2000; Murakumo *et al.*, 2001). Come nel lievito, la polimerasi zeta umana, insieme a Rev1, è coinvolta nella sintesi translesione *error prone*. Anche in questo caso Rev1 è fondamentale per il mantenimento del complesso Rev3-Rev7 e per la funzionalità della polimerasi. Al contrario della polimerasi zeta umana di lievito, Pol zeta umana sembra non localizzare nel nucleo, sebbene la dimostrazione non si possa considerare definitiva (Zhang *et al.*, 2006).

2. Scopo della ricerca

Nel presente studio, mutazioni equivalenti a mutazioni nel gene umano POLG sono state introdotte nelle posizioni corrispondenti del gene *MIP1* di *Saccharomyces cerevisiae*. Gli alleli mutanti *mip1* sono stati inseriti in un ceppo aploide delevto in *MIP1* e in un diploide eterozigote (*MIP1/Δmip1*). La ricerca si propone un duplice scopo:

- 1) Studiare i fenotipi mitocondriali associati a mutazioni in *MIP1*. In particolare verrà studiata la crescita su fonti ossidabili, indicativa della respiratorio sufficienza del ceppo mutato, e verranno determinati i profili dei citocromi respiratori e l'attività respiratoria, indicativi della funzionalità mitocondriale. In secondo luogo, verrà determinato l'accumulo dei *petite*, indice della mutabilità estesa dell'mtDNA, e la frequenza dei rho⁰, indice della perdita dell'mtDNA. Le analisi verranno condotte a 28°C e a 36°C, per valutare un eventuale fenotipo termosensibile. In terzo luogo verrà determinata la frequenza dei mutanti Ery^R, misura della frequenza delle mutazioni puntiformi e dunque della fedeltà della polimerasi mutata. Verrà poi determinata la dominanza/recessività delle mutazioni, mediante analisi dei fenotipi prima elencati in ceppi eteroallelici recante una copia selvatica e una copia mutata di *MIP1*. Verrà inoltre studiato il fenotipo dovuto alla presenza di più mutazioni *in cis* o *in trans* come osservato nei pazienti umani. Infine, per alcune mutazioni, verranno determinati i livelli di espressione della polimerasi mutata, i livelli proteici solubili mitocondriali e l'attività catalitica *in vitro*.
- 2) Identificare e valutare l'effetto di sostanze o di soppressori genici multicopia su fenotipi mitocondriali dovuti alle mutazioni in *MIP1*. L'identificazione di molecole o soppressori ha una doppia finalità. In primo luogo, attraverso le proprietà di queste "molecole", si vogliono comprendere meglio i meccanismi attraverso cui le polimerasi mutate agiscono. In secondo luogo, si vogliono gettare le basi per studi *in vivo* e eventuali terapie basate sull'utilizzo di sostanze o geni in grado di ridurre il danno causato dalle mutazioni patologiche ripristinando almeno parzialmente, i fenotipi mitocondriali selvatici.

3. Materiali e metodi

3.1 Ceppi di lievito utilizzati

Nello studio sono stati utilizzati i seguenti ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*:

Ceppi aploidi

Ceppo	Genotipo	Origine
W303-1A	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100</i>	Thomas and Rothstein, 1989
W303-1B	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100</i>	Thomas and Rothstein, 1989
OF1	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R</i>	Questo lavoro: ceppo <i>mip1::KAN^R</i> derivato da W303-1B
DWM-5A	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R</i>	Questo lavoro: sporulazione del ceppo diploide DWM
DWM-1A	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R</i>	Questo lavoro: sporulazione del ceppo DWM
YG855	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 sml1::HIS3 adh4::URA3</i>	Rodney Rothstein
YO81-4B	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R sml1::HIS3</i>	Questo lavoro: sporulazione del ceppo diploide YO81
YO81-3A	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 sml1::HIS3</i>	Questo lavoro: sporulazione del ceppo diploide YO81
YO81-5D	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 sml1::HIS3</i>	Questo lavoro: sporulazione del ceppo diploide YO81
DYY-4C	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R sml1::HIS3</i>	Questo lavoro: sporulazione del ceppo diploide DYY
M9-94-4B	<i>Mata adel cox2</i>	Françoise Foury
M7-40-5B	<i>Mata adel cob</i>	Françoise Foury
M17-162-4D	<i>Mata adel cob</i>	Françoise Foury
M9-3-5B	<i>Mata adel cox3</i>	Françoise Foury
M9-94/A1	<i>Mata met cox2</i>	Françoise Foury
M9-3/A3	<i>Mata met cox3</i>	Françoise Foury
M7-40/A1	<i>Mata met cob</i>	Françoise Foury
M17-162	<i>Mata met cob</i>	Françoise Foury
S288c	<i>Mata gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1</i>	Mortimer and Johnston, 1986
BY4741	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4742	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
Σ1278b	<i>Mata</i>	Grenson <i>et al.</i> , 1966
FL100	<i>Mata</i>	Lacroute, 1968
D273-10B/A1	<i>Mata met6</i>	Sherman, 1964
D273-CD3	<i>Mata met6 ura3 mip1Δ::Kan^R</i>	Questo lavoro
K8-6c	<i>Mata ade2 leu2 trp5 mmc1</i>	Collezione di Parma
10022	<i>Mata met4 mmc1</i>	Collezione di Parma
5595/4c	<i>Mata phe2 met4</i>	Collezione di Parma
5595/8c	<i>Mata phe2 leu2</i>	Collezione di Parma
5594/4a	<i>Mata leu2-1</i>	Collezione di Parma

Ceppi diploidi

Ceppo	Genotipo	Origine
W303	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100/ Mataα ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100</i>	Thomas and Rothstein, 1989
DWW	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100/ Mataα ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100</i>	W303-1A X W303-1B
DWM	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100/ Mataα ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R</i>	W303-1A X OF1
YO81	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 sml1::HIS3 adh4::URA3/ Mataα ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R</i>	YG855 X OF1
DYY	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 sml1::HIS3/ Mataα ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R sml1::HIS3</i>	YO81-3A X YO81-4B
DMM	<i>Mata ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R/ Mataα ade2-1 leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 can1-100 mip1::KAN^R</i>	DWM-1A X DWM-5A
SK1	<i>Mata HO gal2 cup^S can1^R/ Mataα</i>	Kane and Roth, 1974

Ceppi naturali

Ceppo	Origine	
EM93	Isolato da fichi marci in California	Mortimer and Johnston, 1986
M28	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (Montalcino)	Cavalieri <i>et al.</i> , 2000
M12	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (Montalcino)	Townsend <i>et al.</i> , 2003
M57	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (Montalcino)	Townsend <i>et al.</i> , 2003
SGU60	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (San Giovese)	Duccio Cavalieri
SGU 89	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (San Giovese)	Duccio Cavalieri
SGU90	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (San Giovese)	Duccio Cavalieri
SGU114	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (San Giovese)	Duccio Cavalieri
SGU406	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (San Giovese)	Duccio Cavalieri
SGU407	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana (San Giovese)	Duccio Cavalieri
1014	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna toscana	Duccio Cavalieri
M25	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna sarda	Budroni <i>et al.</i> , 2005
A43	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna sarda	Budroni <i>et al.</i> , 2005
V19	Isolato da un grappolo d'uva in una vigna sarda	Budroni <i>et al.</i> , 2005
IT512	Ceppo enologico commerciale	Collezione INTEC srl Verona
NWS Sauvignon	Ceppo enologico commerciale	Collezione INTEC srl Verona
NWS Merlot	Ceppo enologico commerciale	Collezione INTEC srl Verona
NWS Chardonnay	Ceppo enologico commerciale	Collezione INTEC srl Verona

L2056	Ceppo enologico commerciale	Collezione Lallemant, Montreal (Canada)
B150	Ceppo per panificazione	Collezione di Parma

3.2 Ceppi batterici utilizzati

Per i clonaggi sono stati utilizzati i seguenti ceppi di *Escherichia coli*:

Ceppi	Genotipo
DH10B	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d DlacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galKλ-rpsL hupG</i>
XL10-Gold®	<i>TetR Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR) Amy CamR]</i>
JM109	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>

3.3 Terreni di crescita

Per la crescita di *S. cerevisiae* sono stati utilizzati i seguenti terreni:

- **Terreno massimo YP:** bacto-peptone (DIFCO) 2%, estratto di lievito (DIFCO) 1%.
- **Terreno massimo YPA:** terreno YP addizionato di adenina 75 mg/l.
- **Terreno massimo N1:** bacto-peptone (DIFCO) 1%, estratto di lievito 1%, etanolo 2%, tampone K-fosfato pH 6,3 50 mM, eritromicina (SIGMA) 4 g/l.
- **Terreno massimo YPAGE-Ery:** bacto-peptone (DIFCO) 2%, estratto di lievito (DIFCO), 1%, adenina 100 mg/l, glicerolo 3%, etanolo 3%, tampone K-fosfato pH 6,5 25 mM, eritromicina (SIGMA) 3 g/l.
- **Terreno minimo sintetico definito (SD):** Yeast Nitrogen Base without aminoacids (DIFCO) 0,67%, eventuali aminoacidi e basi necessari per complementare le auxotrofie (adenina 25 mg/l, istidina 50 mg/l, leucina 100 mg/l, triptofano 50 mg/l, uracile 50 mg/l, metionina 50 mg/l).
- **Terreno sintetico completo (SC):** terreno minimo sintetico SD addizionato di dropout, secondo la formula di Kaiser (Kaiser *et al.*, 1994).
- **Terreno minimo 5-FOA:** terreno minimo sintetico YNB addizionato di acido 5-fluoroorotico (Melford) 1 g/l, uracile 50 mg/l, eventuali aminoacidi e basi per complementare le auxotrofie.
- **Terreno di sporificazione:** acetato di potassio 2%, yeast extract (DIFCO) 0,25%.

Se non specificato altrimenti, ogni terreno veniva addizionato di una o più fonti di carbonio (glucosio 2%, etanolo 2%, glicerolo 3%, glucosio 0.3% più etanolo 2%, galattosio 2%, raffiniosio 2%)

I terreni venivano all'occorrenza solidificati aggiungendo Bacto-Agar (DIFCO) 2%, Agar (SIGMA) 2% o Agar (FORMEDIUM) 2%.

Se non specificato altrimenti, le colture di lievito venivano fatte crescere in condizioni di aerazione a 28°C.

Per la crescita di *E. coli* sono stati utilizzati i seguenti terreni:

- **Terreno LB:** bacto-triptone (DIFCO) 1%, estratto di lievito (DIFCO) 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7,2-7,5
- **Terreno LBA:** terreno LB addizionato di ampicillina (SIGMA) 100 mg/l.
- **Terreno SOB:** bacto-triptone (DIFCO) 2%, estratto di lievito (DIFCO) 0,5%, NaCl 0,5 g/l, KCl 186 mg/l, acqua distillata.
- **Terreno SOC per elettroporazione:** terreno SOB addizionato di MgCl₂ 20 mM e glucosio 20 mM.

I terreni venivano all'occorrenza solidificati aggiungendo Bacto-Agar (DIFCO) 2%, Agar (SIGMA) 2% o Agar (FORMEDIUM) 2%.

Le colture di *E. coli* venivano fatte crescere in condizioni di aerazione a 37°C.

3.4 Vettori plasmidici

In questo studio sono stati utilizzati i seguenti vettori plasmidici:

Plasmide	Marcatori in <i>S. cerevisiae</i>	Tipo e numero di copie	Origine	Figura
pUC19	-	Vettore di <i>E. coli</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985	3.1
pFL38	<i>URA3</i>	Vettore shuttle, centromerico	Bonneaud <i>et al.</i> , 1991	3.2 A
pFL39	<i>TRP1</i>	Vettore shuttle, centromerico	Bonneaud <i>et al.</i> , 1991	3.2 B
pRS425	<i>LEU2</i>	Vettore shuttle, multicopia	Christianson <i>et al.</i> , 1992	3.3 A
pWJ841	<i>LEU2</i>	pRS425 contenente il gene <i>RNR1</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2001	3.3 B
YEplac195	<i>URA3</i>	Vettore shuttle, multicopia	Gietz and Sugino, 1988	3.4
pLGALZ3	<i>leu2D</i> , <i>URA3</i>	Vettore multicopia d'espressione di <i>S. cerevisiae</i>	Foury and Vanderstraeten, 1992	3.5 A
pLGALMIP1	<i>leu2D</i> , <i>URA3</i>	pLGALZ3 contenente il gene <i>MIP1</i> (ceppo $\Sigma 1278b$)	Foury and Vanderstraeten, 1992	3.5 B

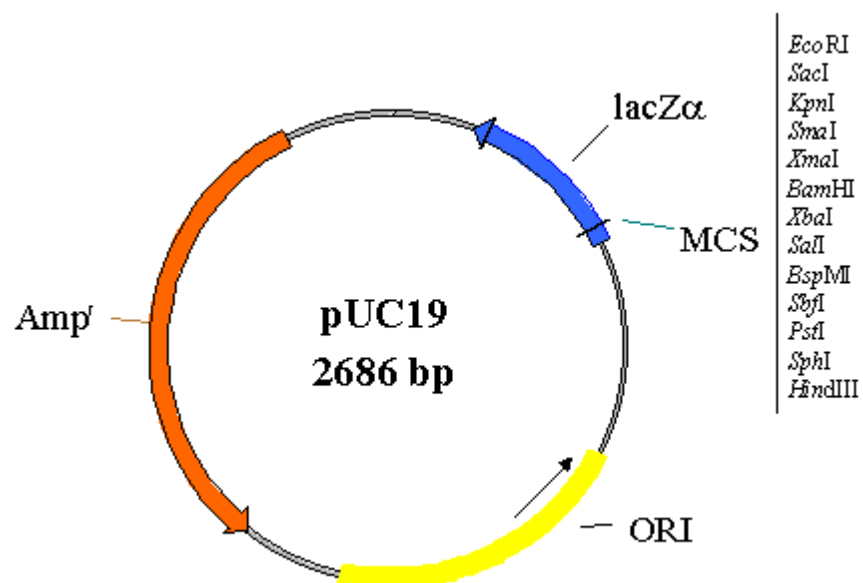


Figura 3. 1: Plasmide pUC19.

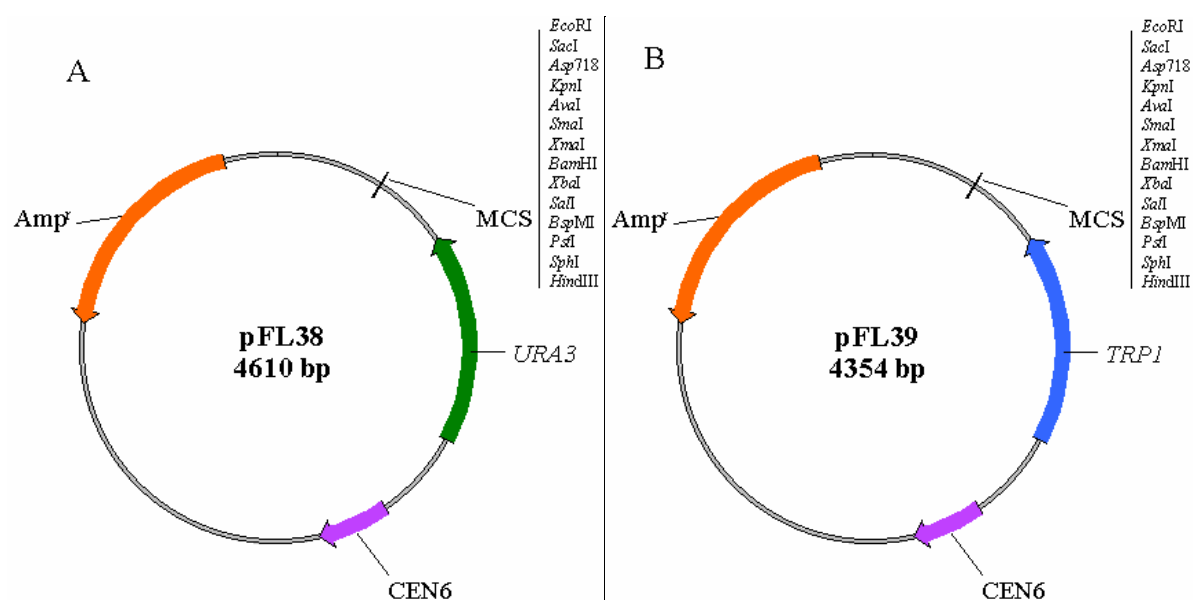


Figura 3. 2: (A) Plasmide pFL38; (B) Plasmide pFL39.

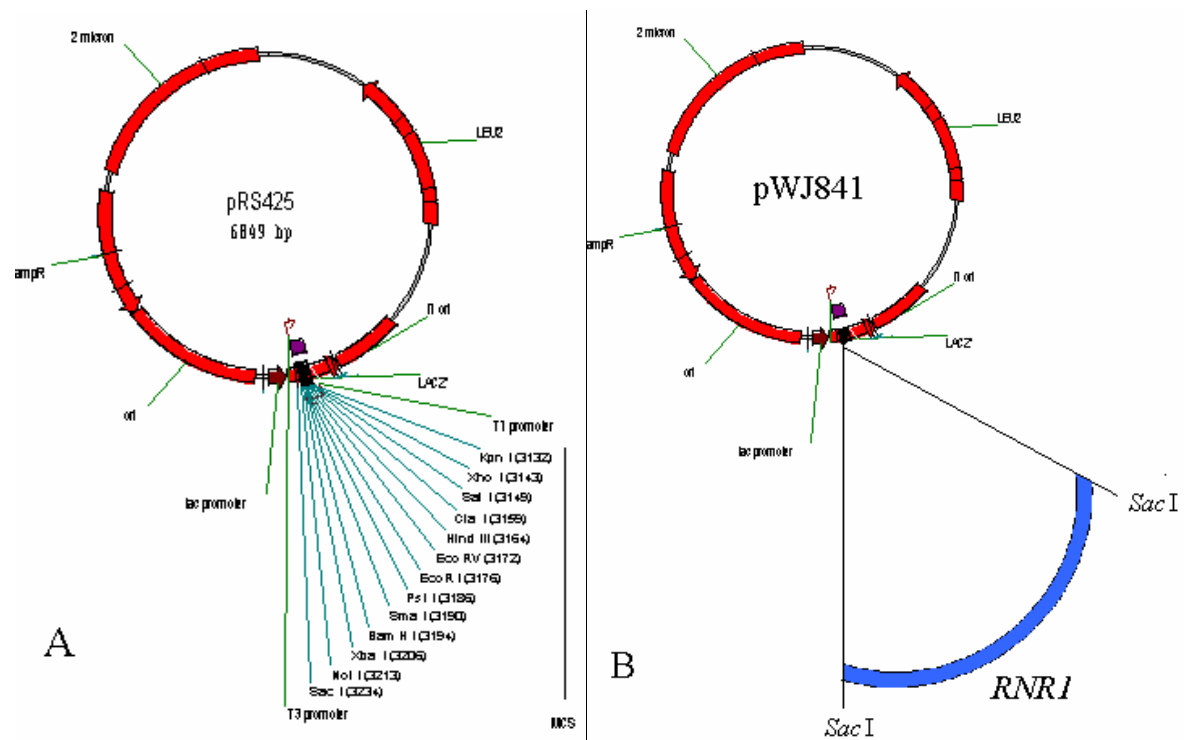


Figura 3. 3: (A) Plasmide pRS425; (B) Plasmide pWJ841, derivante dall'inserzione in pRS425 del frammento digerito con *Sac*I contenente il gene *RNR1*.

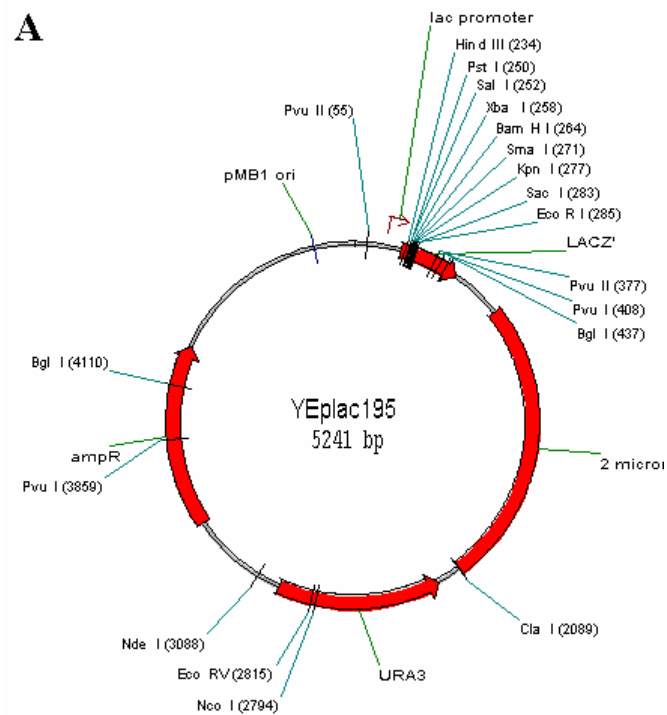


Figura 3. 4: Plasmide YEplac195.

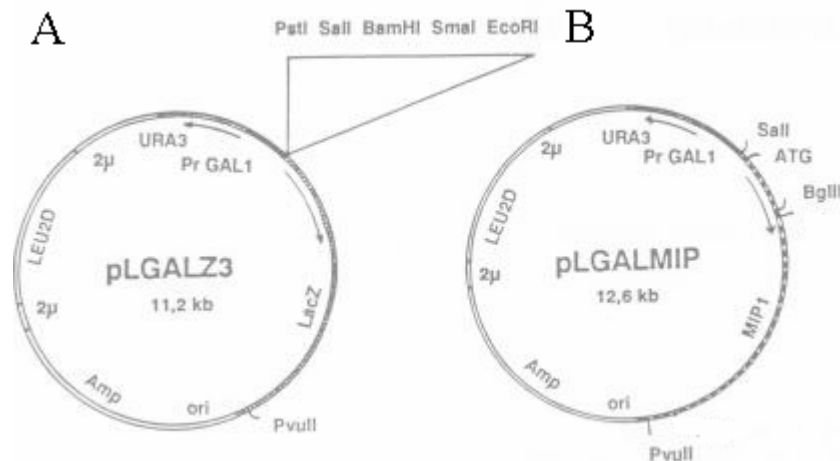


Figura 3. 5: (A) Vettore d'espressione pLGALZ3. Il plasmide contiene il promotore del gene *GAL1* inducibile da galattosio, sotto il cui controllo si trova il gene *LacZ*. (B) Vettore d'espressione pLGALMIP1. Il vettore deriva dal plasmide pLGALZ3, in cui il gene *LacZ* è stato sostituito dal gene *MIP1* del ceppo $\Sigma 1278b$. La regione codificante del gene *MIP1* è situato 45 bp a valle del sito *SalI*, sotto il controllo del promotore *GAL1*.

3.5 PCR

Tutte le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando un termociclatore "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400".

3.5.1 Amplificazione di *MIP1*

Per l'amplificazione di *MIP1* è stata utilizzata la "Platinum[®] Pfx DNA polymerase" (Invitrogen) e i primer MIPC e MIPE (vedere allegato 1). La PCR è stata condotta seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice, utilizzando 500 ng di DNA genomico estratto dal ceppo W303-1B e 1 unità di Pfx in un volume totale di 50 μ l. Per l'amplificazione sono state usate le seguenti condizioni:

- 94°C per 2'
- 30 cicli:
 - 94°C per 15''
 - 55°C per 30''
 - 68°C per 10'

3.5.2 PCR per la distruzione di *MIP1*

Per la distruzione del gene *MIP1* nel ceppo W303-1B con la cassetta *KAN^R*, è stata utilizzata la "Platinum[®] Pfx DNA polymerase" (Invitrogen) e i primer S1MIP e S2MIP (vedere allegato 1). Sono stati utilizzati 300 ng di DNA template (plasmide con cassetta KanMX4) e 1 unità di Pfx in un volume totale di 100 μ l. Per l'amplificazione sono state usate le seguenti condizioni:

- 94°C per 2'
- 30 cicli:
 - 94°C per 30''

- 54°C per 30''
- 72°C per 3'20''
- 72°C per 7'

Per la distruzione del gene *MIPI* nel ceppo D273-10B/A1 con la cassetta *KAN^R*, è stata utilizzata la “*Biotools Taq*” (Biotools) e i primer MIPF e NgoRv (vedere allegato 1 e 2). Sono stati utilizzati circa 10 ng di DNA templato (DNA genomico del ceppo DWM-5A) e 2,5 unità di *Taq* in un volume totale di 100 µl. Per l'amplificazione sono state usate le seguenti condizioni:

- 94°C per 2'
- 30 cicli:
 - 94°C per 30''
 - 52°C per 40''
 - 72°C per 3'
- 72°C per 7'

3.5.3 Mutagenesi sito-specifica

Le mutazioni G224A e Y757C sono state introdotte in *MIPI* utilizzando il kit “*QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit*” (Stratagene), utilizzando come templato 12 ng del plasmide pUC19-*MIPI*. Rispetto al protocollo fornito dalla casa produttrice, sono state apportate delle modifiche:

- la denaturazione iniziale è stata condotta per 1 minuto;
- sono stati condotti 16 cicli di amplificazione con le seguenti condizioni:
 - 95°C per 50''
 - 55°C per 1'
 - 68°C per 14'

Per la mutazione G224A sono stati utilizzati i primer mutagenici G249A1 e G249A1, mentre per la mutazione Y757C sono stati utilizzati i primer mutagenici Y783C1 e Y783C2 (vedere allegato 1)

Le mutazioni G651A, A661T, A692T, H734Y G807R e E900G sono state ottenute mediante la tecnica “*overlap extension PCR*” (Ho *et al.*, 1989; Aiyar *et al.*, 1996). Nella prima PCR è stato usato il primer AVRfw come primer *forward* e i primer mutagenici G651ARv, A661TRv, A692TRv, H734YRv G807Rv o E900GRv come primer *reverse* (vedere allegato 2), nella seconda i primer mutagenici G651AFw, A661TFw, A692TFw, H734YFw, G807Fw o E900GFw e il primer BsrRv come primer *reverse*, eccetto per la mutazione H734Y per il quale è stato utilizzato il primer NgoRv (vedere allegato 2). Le PCR sono state condotte utilizzando la “*PfuUltra[™] High-Fidelity DNA Polymerase*” (Stratagene), utilizzando 5 ng di templato (pUC19-*MIPI* linearizzato con *SalI*) e 2,5 unità di *PfuUltra[™]*, in un volume di 50 µl. Sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- 95°C per 2'
- 30 cicli:
 - 95°C per 30''

- 52°C per 30''
- 72°C per 1'30''
- 72°C per 10 minuti

La terza reazione di PCR è stata condotta utilizzando la precedente coppia di amplificati sia come primer che come template. La PCR è stata condotta utilizzando la “*PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase*” (Stratagene), utilizzando circa 100 ng di ciascun amplificato (dopo purificazione mediante escissione da gel) e 5 unità di *PfuUltra™*, in un volume di 100 µl. Sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- 95°C per 2'
- 10 cicli:
 - 95°C per 30''
 - 62°C per 1'
 - 72°C per 2'
- pausa, durante i quali ad ogni reazione sono stati aggiunti i primer esterni AvrFw e BsrRv (o NgoRv)
- 25 cicli:
 - 95°C per 30''
 - 52°C per 30''
 - 72°C per 2'20''
- 72°C per 10'

3.5.4 Amplificazione di *REV7*, *REV3*, *CCE1*, *MHR1*, *MSH1* e *CDC9*

Il gene *REV7* è stato amplificato mediante l'utilizzo dei primer REV7-Fw e REV7-Rv, situati rispettivamente a -609 a +994 rispetto al codone di inizio, così da ottenere un amplificato di circa 1600 bp. Il gene *REV3* è stato amplificato mediante l'utilizzo dei primer REV3-Fw e REV3-Rv, situati rispettivamente a -304 a +4734 rispetto al codone di inizio, così da ottenere un amplificato di circa 5000 bp. Il gene *CCE1* è stato amplificato mediante l'utilizzo dei primer CCE1-Fw e CCE1-Rv, situati rispettivamente a -372 a +1223 rispetto al codone di inizio, così da ottenere un amplificato di circa 1600 bp. Il gene *MHR1* è stato amplificato mediante l'utilizzo dei primer MHR1-Fw e MHR1-Rv, situati rispettivamente a -628 a +1365 rispetto al codone di inizio, così da ottenere un amplificato di circa 2000 bp. Il gene *MSH1* è stato amplificato mediante l'utilizzo dei primer MSH1-Fw e MSH1-Rv, situati rispettivamente a -323 a +3189 rispetto al codone di inizio, così da ottenere un amplificato di circa 3500 bp. Il gene *CDC9* è stato amplificato mediante l'utilizzo dei primer CDC9-Fw e CDC9-Rv, situati rispettivamente a -504 a +2393 rispetto al codone di inizio, così da ottenere un amplificato di circa 2900 bp.

L'amplificazione dei geni inferiori a 3000 bp è stata effettuata mediante l'utilizzo della “*Pwo DNA Polymerase*” (Roche), utilizzando circa 40 ng di DNA genomico del ceppo W303-1B in 100 µl e utilizzando il seguente programma di PCR:

- 94°C per 2'
- 10 cicli:

- 94°C per 15''
- 51°C per 30''
- 72°C per 45''/Kb
- 20 cicli:
 - 94°C per 15''
 - 51°C per 30''
 - 72°C per 45''/Kb più 5''/ciclo
- 72°C per 7'

L'amplificazione dei geni superiori a 3000 bp è stata effettuata mediante l'utilizzo della "*PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase*" (Stratagene), utilizzando circa 20 ng di DNA genomico del ceppo W303-1B in 50 µl e utilizzando il seguente programma di PCR:

- 95°C per 2'
- 30 cicli:
 - 95°C per 20''
 - 51°C per 30''
 - 72°C per 20''/Kb
- 72°C per 3'

3.5.5 PCR da colonia di lievito

Le PCR da colonia di lievito su DNA plasmidico sono state condotte utilizzando la "*Biotoools Taq*" (Biotoools). Per l'amplificazione del frammento di *MIPI* compreso fra i primer AvrFw e BsrRv, cellule cresciute overnight in terreno minimo selettivo SC sono state sospese in 25 µl di acqua milliQ e bollite a 95°C per 6 minuti. A freddo sono stati aggiunti i vari componenti (1,2 unità di *Taq*), fino ad arrivare ad un volume di 50 µl. Per l'amplificazione sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- 94°C per 3'
- 30 cicli:
 - 94°C per 30''
 - 50°C per 40''
 - 72°C per 2''
- 72°C per 6'

Le PCR da colonia di lievito su DNA genomico sono state condotte utilizzando la "*Platinum® Taq DNA polymerase*" (Invitrogen), utilizzando 1 unità di polimerasi in 50 µl. Cellule di lievito da testare cresciute in terreno SC o YPD sono state risospese in 10 µl di acqua. 3 µl sono stati addizionati a 42 µl di mix di reazione contenente tutto tranne la polimerasi. La mix è stata bollita a 95°C per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 5 µl di acqua addizionati di polimerasi a freddo. La miscela è stata sottoposta al seguente programma di PCR:

- 95°C per 2'
- 35 cicli:

- 94°C per 30''
- 50-52°C per 1'
- 72°C per 2'-5'
- 72°C per 7'

3.5.6 Primer

I primer utilizzati per la distruzione di *MIP1*, la mutagenesi sito-specifica di *MIP1* e le PCR analitiche sono riportati negli allegati 1, 2 e 3. Per l'amplificazione dei geni *REV7*, *REV3*, *CCE1*, *MHR1*, *MSH1* e *CDC9* sono stati utilizzati gli oligonucleotidi riportati nella seguente tabella:

Gene	Primer
<i>REV7</i>	REV7-Fw gcgccgctcgacgatgaatgggaaaagaagtgc REV7-Rv gcgcgggtacccatggaaccagacagaagacc
<i>REV3</i>	REV3-Fw gcgcgggtaccggatccaagaatccctgtgg REV3-Rv gcgccgaattccttagaggatacgaagattcc
<i>CCE1</i>	CCE1-Fw cgccgggatccgtgttaaagcatgctgaagatgg CCE1-Rv gcccgagctcctgcaaacttaacgttgacc
<i>MHR1</i>	MHR1-Fw cgggcggatccgaaattgggttagcgttacagg MHR1-Rv cgggggaattcgcagttgcattcgatgttacg
<i>MSH1</i>	MSH1-Fw ggccggcatgcgtggagcacctaattgtaaagg MSH1-Rv cccgcggatcccactcatggacgaaagatgc
<i>CDC9</i>	CDC9-FW cgggcgctcgacccctttcaccaaattcttcg CDC9-RV cggcgggtaccgtaaggttagacagagaaacg

3.6 Sequenziamento

Il sequenziamento di *MIP1* e delle sue varianti alleliche è stato condotto esternamente utilizzando il servizio di sequenziamento della MWG-Biotech oppure internamente utilizzando il sequenziatore CEQ-8000, secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Per il sequenziamento venivano utilizzati i primer riportati nell'allegato 1, 2 e 3.

Il sequenziamento dei geni *REV7*, *REV3*, *CCE1*, *MHR1*, *MSH1* e *CDC9* è stato effettuato mediante il servizio MWG-Biotech utilizzando i primer universali M13-Uni e M13-Rv, più eventualmente specifici primer, come riportato nella seguente tabella:

Gene	Primer
<i>REV3</i>	REV3S1 ggatgttcattggataaacgtg
	REV3S2 cttagatcatctgtttctgc
	REV3S3 gacattgtcagggaaacttg
	REV3S4 gaatgtcacctacggttatac
	REV3S5 ggttctgctctatggctcttc
	REV3S0 gttaccacgttggtggaatc
<i>MSH1</i>	MSHS1 cagagaaatgcctgaaaacac
	MSHS2 ctcttgaaacctctagtgaac
	MSHS3 ctcccattcactacttctag
<i>CDC9</i>	CDC9S1 gacggctgttacacatactg
	CDC9S2 gttatctgagtcgcgtattg

3.7 Manipolazione del DNA

3.7.1 Digestione con endonucleasi di restrizione

Le digestioni analitiche di DNA venivano condotte digerendo 100-2000 ng di DNA in presenza di 5-10 unità di endonucleasi di restrizione specifica (Amersham, NEB, Fermentas o Roche) in un volume totale di 20 µl, per 2 ore a 37°C.

Per il clonaggio di *MIPI*, 2 µg di amplificato (sezione 3.5.1) e 3 µg di vettore sono stati digeriti dapprima con *SacI* (Fermentas) e *SalI* (Roche) per 3 ore a 37°C. I subclonaggi di *MIPI* o delle sue varianti alleliche da un vettore ad un altro venivano condotte come nel caso precedente, utilizzando 2,5-3 µg di vettore.

Per le reazioni di mutagenesi mediante “*overlap extension PCR*”, 500 ng di amplificato di PCR e 2 µg di vettore (pFL39-*MIPI*) venivano digeriti con *AvrII* (NEB) e con *BsrGI* (NEB) o con *NgoMIV* (NEB) per 3 ore a 37°C.

Per i subclonaggi delle varianti alleliche di *MIPI* in pLGAL*MIPI*, 2,5-3 µg di DNA venivano dapprima digeriti con *NotI* (Roche) per 3 ore a 37°C e, dopo purificazione mediante kit “*High Pure PCR Product Purification Kit*”, con *NgoMIV* (NEB) per 3 ore a 37°C.

Per il clonaggio dei geni *REV7*, *REV3*, *CCE1*, *MHR1* e *CDC9* in YEplac195, sono state condotte le seguenti digestioni, sia dell’amplificato che del plasmide:

- *REV7*: *KpnI* e *SalI*;
- *REV3*: *KpnI* e *EcoRI*;
- *CCE1*: *SacI* e *BamHI*;
- *MHR1*: *SacI* e *EcoRI*;
- *CDC9*: *KpnI* e *SalI*.

Dopo digestione i prodotti venivano purificati.

2-3 µg di vettore YEplac195 è stato digerito allo stesso modo.

REV7 è stato subclonato nel plasmide YEplac195*REV3* digerendo YEplac195*REV7* e YEplac195*REV3* con *KpnI* e *SalI*.

CCE1 è stato subclonato in pFL38 digerendo YEplac195*CCE1* e pFL38 con *SacI* e *BamHI*.

Il gene *MSH1* è stato clonato in pFL38 digerendo amplificato e plasmide con *SphI* e *BamHI*.

3.7.2 Elettroforesi su gel d'agarosio e escissione da banda

L'elettroforesi dei frammenti di DNA veniva eseguita su gel d'agarosio 0,8%-1,2% in tampone TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) ed etidio bromuro 0,5 µg/ml. Ai campioni veniva aggiunto 1/10 di volume di tampone di caricamento (glicerolo 30%, bromo fenolo blu 0,25%, xilene cianolo 0,25%).

Per l'escissione da banda, 100-500 mg di gel venivano escissi con una lama. L'estrazione da gel veniva condotta col kit "*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*" (Promega) o col kit "*High Pure PCR Product Purification Kit*" (Roche), risospendendo in un volume finale di acqua pari a 40-50 µl.

3.7.3 Purificazione del DNA

Se necessario, i prodotti di PCR e i prodotti di digestione venivano purificati col kit "*High Pure PCR Product Purification Kit*" (Roche) o col kit "*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*" (Promega).

3.7.4 Defosforilazione del DNA

La defosforilazione dell'estremità 5' dei vettori digeriti veniva condotta utilizzando la fosfatasi alcalina (Roche). 0,5-1 pmol di DNA venivano digeriti con 2 unità di enzima in un volume totale di 100 µl, per 1 ora a 37°C, dopodiché la fosfatasi alcalina veniva inattivata scaldando 20 minuti a 65°C. Il DNA defosforilato veniva poi purificato col kit "*High Pure PCR Product Purification Kit*".

3.7.5 Ligazione

Le reazioni di ligazione venivano condotte mantenendo un rapporto molare vettore:inserto pari a 1:5 per ligazioni "*sticky ends*" e 1:6-1:8 per ligazioni "*blunt ends*" e utilizzando la T4 DNA ligasi (NEB) o la T4 DNA ligasi (Invitrogen), secondo i protocolli forniti dalla casa produttrice.

3.8 Trasformazioni

3.8.1 Trasformazione di *E. coli* mediante elettroporazione

I ceppi di *E. coli* venivano resi elettrocompetenti secondo il protocollo di Dower *et al.*, 1988.

Le cellule elettrocompetenti venivano trasformate aggiungendo all'eppendorf 1-3 µl di DNA plasmidico (1-10 ng) o di ligazione. L'elettroporazione veniva condotta utilizzando una cuvetta da 2 mm, settando i valori di 2 KV, 25 µF e 200 Ω, oppure utilizzando una cuvetta da 1 mm, settando i valori di 1,75 KV, 25 µF e 200 Ω.

3.8.2 Trasformazione di *S. cerevisiae*

La trasformazione di *S. cerevisiae* veniva condotta con la tecnica del litio acetato (Gietz and Woods, 2002). Le cellule venivano trasformate con 100-1000 ng di DNA. In alternativa,

veniva utilizzato il protocollo per la trasformazione rapida di *S. cerevisiae* (Gietz and Woods, 2002).

Per la distruzione, prima del piastramento le cellule venivano fatte rigenerare in 2 ml di YPAD per 4 ore e piastrate successivamente su piastre YPD addizionate di geneticina 200 µg/ml. La conferma della distruzione veniva condotta per crescita fenotipica, per PCR e per *Southern blot*.

3.8.3 Plasmid shuffling in *S. cerevisiae*

I ceppi DWM-5A recanti il plasmide pFL38MIP1 e un allele mutato su pFL39 sono stati sottoposti a *plasmid shuffling* per selezionare ceppi privi di pFL38MIP1.

Cellule di ciascun ceppo sono stati inoculate in terreno SD addizionato di glucosio 2% e uracile, ma non triptofano, in modo che le cellule potessero perdere il plasmide pFL38MIP1 ma non il plasmide derivato da pFL39. Dopo 16 ore di crescita, 1000 cellule sono state piastrate su piastre di acido 5-fluororotico (5-FOA), su cui potevano crescere solo le cellule che avevano perso il plasmide pFL38MIP1, essendo il 5-FOA tossico in presenza del prodotto genico del gene *URA3*. In alternativa il medesimo *plasmid shuffling* è stato fatto in solido mediante repliche successive, dapprima in terreno SC addizionato di uracile, due volte in terreno contenente 5-FOA e infine su terreno SC privo di uracile.

3.9 Estrazione di DNA

3.9.1 Minipreparazione di DNA plasmidico da *E. coli*

L'estrazione di DNA plasmidico da *E. coli* veniva eseguito col metodo della lisi alcalina partendo da 1,5 ml di coltura in fase stazionaria, come descritto da Sambrook and Russel, 2001. Il DNA veniva risospeso in 20-30 µl di acqua più RNasi 20 µg/ml.

In alternativa il DNA plasmidico veniva estratto da 5 ml di coltura col kit “*Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System*” (Promega) o col kit “*High Pure Plasmid Isolation Kit*” (Roche), risospendendo il DNA in 100 µl di acqua.

3.9.2 Estrazione di DNA genomico da lievito

Il DNA usato come template nelle PCR per i clonaggi veniva estratto da lievito secondo il protocollo di Nasmyth and Reed, 1980, partendo da 10 ml di coltura di lievito in YPD e risospendendo il DNA estratto in 50-100 µl di acqua.

3.9.3 Estrazione rapida di DNA totale da lievito

Per le PCR analitiche, per le trasformazioni di *E. coli* con DNA plasmidico totale e per i *Southern blot*, il DNA totale veniva estratto col metodo di Hoffman and Winston, 1987. Il materiale di partenza era costituito da 8 ml di terreno YPD per ceppi privi di DNA plasmidico o contenente un plasmide monocopia, o 10 ml di terreno minimo SC addizionato di glucosio e di opportuni aminoacidi per ceppi contenenti plasmidi multicopia. Il DNA veniva risospeso in 50 µl di acqua più RNasi.

3.9.4 Estrazione di DNA mitocondriale da lievito

Il DNA mitocondriale veniva estratto secondo il metodo rapido di estrazione dei mitocondri dopo crescita in terreno SC addizionato di glucosio 2%, e risospendendo il DNA in 100 µl di TE più RNasi (Defontaine *et al.*, 1991).

3.10 Southern blot

I *Southern blot* su DNA genomico sono stati condotti digerendo 3 µg di DNA totale estratto col protocollo di Hoffman and Winston, 1987 in 100 µl di reazione con 60 unità di enzima (NEB). Dopo 6 ore di digestione, il DNA veniva precipitato, risospeso in 15 µl di acqua, caricato su gel d'agarosio 0,8% e lasciato correre overnight a 15 volt. I lavaggi del filtro e il blot sono stati condotti utilizzando metodi standard (Sambrook and Russell, 2001). Il trasferimento veniva condotto su filtro di nylon *Hybond-N+* (Amersham). L'ibridazione radioattiva è stata condotta marcando 100 ng di sonda mediante il kit "Rediprime II DNA Labeling System" (GE Healthcare) e 5 µl di "Redivue deoxycytidine 5'-[α -³²P]triphosphate 370 MBq/ml" (GE Healthcare). Dopo i lavaggi, il filtro veniva esposto per un tempo variabile su lastre Kodak. Per la quantificazione, il filtro veniva esposto per 15 minuti al PhosphorImager (Molecular Dynamics) e le bande venivano quantificate mediante il software fornito dalla casa produttrice.

I *Southern blot* su DNA mitocondriale sono stati condotti digerendo 1 µg di DNA mitocondriale estratto col protocollo di Defontaine *et al.*, 1991 in 100 µl con 60 unità di enzima *EcoRV* (NEB). Dopo 6 ore di digestione, il DNA veniva precipitato, risospeso in 15 µl di acqua, caricato su gel d'agarosio 0,8% e lasciato correre overnight a 15 volt. I lavaggi del filtro e il blot sono stati condotti utilizzando metodi standard (Sambrook and Russell, 2001). L'ibridazione radioattiva è stata condotta marcando 2 pmol di sonda 5'-CTCCTTTCGGGGTTCGGCTCCCGTGGCCGGGCCCCGG-3' mediante l'utilizzo della T4 chinasi (NEB) e 5 µl di "Redivue adenosine 5'-[γ -³²P]triphosphate 370 MBq/ml" (GE Healthcare) (Ausubel *et al.*, 1994).

3.11 Estrazione di RNA da lievito e Northern blot

Gli RNA totali venivano preparati mediante estrazione con fenolo acido (Ausubel *et al.*, 1994).

Per l'analisi *Northern* venivano utilizzati 30 µg di RNA, che venivano caricati su gel d'agarosio denaturante e fatti correre per circa tre ore a 100 V. Il *blot* veniva condotto come descritto precedentemente da Sherman *et al.*, 1986. L'ibridazione radioattiva veniva condotta in maniera analoga all'ibridazione per i *Southern blot*. Come controllo, veniva ibridato l'mRNA del gene *ACT1*, codificante per i monomeri della actina.

3.12 Estrazione di proteine da lievito

3.12.1 Estrazione totale di proteine mediante TCA

I ceppi trasformati con gli alleli *mip1* clonati in pLGALZ3 venivano fatti crescere in 5 ml di terreno SC addizionato di raffinoso 2% per circa 24 ore. Dopo conteggio, 10^8 cellule venivano inoculate in 10 ml totali di terreno SC addizionato di galattosio 2% per permettere l'induzione del gene *mip1*. Dopo 6, 9 e 15 ore di crescita le cellule venivano raccolte e al pellet venivano aggiunti 2 ml di NaOH 2M e β -mercaptoetanololo 8%. Dopo incubazione in ghiaccio per 10 minuti, le proteine venivano precipitate mediante aggiunta di 1 ml di acido tricloroacetico 50% e incubazione di 10 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione, il pellet veniva lavato 2 volte con etanolo 100% e una volta con etanolo/etere 1:1, e asciugato mediante *speed-vac*. Il pellet veniva risospeso in 400 μ l di *loading buffer* (Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS 6%, glicerolo 30%, blu di bromo fenolo 0,125%).

3.12.2 Estrazione di proteine solubili mitocondriali

I ceppi trasformati con gli alleli *mip1* clonati in pLGALZ3 venivano fatti crescere in 5 ml di terreno SC addizionato di raffinoso 2% per circa 24 ore. Dopo conteggio, le cellule venivano inoculate in terreno SC addizionato di galattosio 2% alla concentrazione finale di 5×10^6 per permettere l'induzione del gene *mip1*. Dopo 15 ore di crescita le cellule venivano raccolte, e gli estratti solubili venivano estratti come riportato in precedenza (Foury, 1989; Foury and Vanderstraeten, 1992).

3.13 Western blot

Il *Western blot* veniva condotto con tecniche classiche (Sambrook and Russell, 2001). La corsa elettroforetica veniva condotta su gel di poliacrilammide all'8%. Il trasferimento era condotto mediante *elettroblotting*, per 75 minuti a 60-70 V. L'ibridazione con l'anticorpo primario veniva fatto mediante l'utilizzo di 5 μ l di anticorpi policlonali anti Mip1 di coniglio (forniti da F. Foury) in un volume complessivo di 5 ml, a temperatura ambiente per due ore e *overnight* a 4°C. L'ibridazione secondaria veniva condotta con 4 μ l di anticorpi secondari legati a perossidasi di rafano in un volume complessivo di 50 ml, per un'ora a temperatura ambiente. La reazione di chemiluminescenza veniva condotta mediante aggiunta del kit per chemiluminescenza Amersham.

3.14 Saggio di *gap filling*

L'attività di *gap filling* sugli estratti solubili mitocondriali è stata condotta in una reazione contenente 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM ditiotreitolo, 50 mM $MgCl_2$, 25 μ M di ogni dNTP (dATP, dCTP, dGTP), 6 μ M [3H]-dTTP, 150 mg/ml *calf thymus* DNA attivato e gli estratti mitocondriali, come descritto in Foury and Vanderstraeten, 1992. I campioni venivano prelevati dopo sei minuti a 30°C. L'attività veniva espressa come nanomoli di dTTP

incorporato nel materiale precipitabile con acido tricloroacetico e per milligrammo di proteina presente nell'estratto.

3.15 Analisi fenotipiche

3.15.1 Spettri dei citocromi respiratori

200 ml di cellule cresciute in terreno minimo addizionato di glucosio 0,5% ad esaurimento venivano raccolte, lavate due volte con acqua bidistillata e risospese in acqua in un volume complessivo di circa 3 ml, in modo tale che la concentrazione cellulare fosse almeno del 50%. Gli spettri sono stati condotti utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio Cary 219 (Varian) e misurando l'assorbanza fra 540 e 630 nm.

3.15.2 Misurazione dell'attività respiratoria

L'attività respiratoria veniva determinata mediante l'utilizzo dell'ossigrafo Hansatech, diluendo 100 µl di cellule ottenute come nel paragrafo precedente in 1 ml di tampone di respirazione (0,1M ftalato-NaOH, pH 5,0) saturo di ossigeno e addizionato di glucosio 2%. Su 1 ml della sospensione originale veniva misurato il peso secco, che doveva essere attorno ai 40-60 mg. I valori venivano espressi come microlitri di ossigeno consumato per ora per milligrammo di cellule.

3.15.3 Determinazione della frequenza dei *petite*

Nella prima fase degli esperimenti (capitolo 4) la frequenza dei *petite* era misurata inoculando dapprima cellule da testare in 10 ml di terreno SC addizionato di etanolo 2% per controselezionare le cellule respiratorio deficienti. Dopo 48 ore, le cellule venivano inoculate in 10 ml di SC addizionato di glucosio 2% ad una concentrazione finale di 2×10^5 cell/ml e fatte crescere a 28°C o a 36°C. Dopo circa 7-8 generazioni, le cellule venivano reinoculate in 10 ml di terreno SC addizionato di glucosio 2% ad una concentrazione finale di 2×10^5 cell/ml e fatte crescere a 28°C o a 36°C. Dopo 7-8 generazioni, le cellule venivano diluite e 200 cellule venivano piastrate su terreno SC addizionato di etanolo 2% e glucosio 0,3%. Le cellule venivano contate dopo 5 giorni.

In una seconda fase degli esperimenti (capitolo 5, 6 e 7) le cellule da testare venivano strisciate su terreno solido addizionato di etanolo 2%. Dopo 48-60 ore, le cellule venivano replicate su terreno SC addizionato di glucosio 2% e fatte crescere a 28°C o a 36°C. Dopo circa 24 ore, le cellule venivano replicate su terreno SC addizionato di glucosio 2% e fatte crescere a 28°C o a 36°C. Dopo circa 24 ore, le cellule venivano recuperate in acqua e diluite, e 200 cellule venivano piastrate su terreno SC addizionato di etanolo 2% e glucosio 0,3%. Le cellule venivano contate dopo 5 giorni. Per testare la capacità di varie sostanze di ridurre la frequenza dei *petite*, l'analisi veniva condotta in liquido come nei casi precedenti.

3.15.4 Determinazione della natura dei *petite*

Per discriminare se i cloni *petite* erano ρ^- o ρ^0 , i cloni sono stati incrociati con quattro cloni mit^- di sesso opposto che presentavano mutazioni *cox2*, *cox3*, e due distinte mutazioni *cob*. L'analisi era condotta strisciando 100 cloni *petite* su terreno YPAD. Dopo 24 ore, i cloni erano replicati su terreno YPAD su cui erano stati distribuiti circa 10^7 cellule del ceppo tester cresciuto anch'esso in YPAD. Dopo tre giorni, i cloni erano replicati su terreno YPAG. La percentuale di cloni ρ^0 è definita come rapporto fra il numero di diploidi respiratorio sufficienti e il numero di diploidi ottenuti.

3.15.5 Determinazione della frequenza dei mutanti Ery^R

Nella prima fase degli esperimenti la frequenza dei mutanti Ery^R è stata determinata facendo crescere, per ogni ceppo da testare, 10 cloni in terreno liquido SC addizionato di glucosio 2%. Dopo circa 24 ore di crescita, le cellule erano lavate due volte con acqua bidi, e circa 5×10^7 cellule erano piastrate su terreno N1. Per determinare il numero esatto di cellule piastrate, un'opportuna diluizione di cellule veniva piastrata su terreno YPAE. La frequenza di mutanti è definita come il rapporto di colonie Ery^R rispetto al numero totale di cellule piastrate.

Nella seconda fase degli esperimenti la frequenza dei mutanti Ery^R è stata determinata facendo crescere, per ogni ceppo da testare, 10 cloni in terreno liquido YPAG. Dopo circa 48 ore di crescita, circa $6-8 \times 10^7$ cellule erano piastrate su terreno YPAEG-ery. Per determinare il numero esatto di cellule piastrate, un'opportuna diluizione di cellule veniva piastrata su terreno YPAEG. Nel caso di ceppi contenenti due plasmidi, la crescita iniziale veniva condotta in terreno SC addizionato di etanolo 2%.

3.16 Marcatura dell'mtDNA con DAPI

Dopo circa 36 ore di crescita in terreno solido SD addizionato di glucosio 2%, le cellule venivano stemperate in 200 μl di Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e sottoposte a separazione fisica mediante sonicazione per 5 s ad ampiezza del 30% con sonicatore VibraCell. Successivamente veniva aggiunto il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) ad una concentrazione finale di 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e le cellule venivano incubate in ghiaccio per 15 minuti. 20 μl di sospensione cellulare venivano posti sopra uno strato di agarosio *low melting point* 1,5% e osservate con un microscopio ottico Leica DMR con un obiettivo 100X in immersione.

4. Risultati (I parte):

Rescue genetico e chimico del fenotipo di *Saccharomyces cerevisiae* indotto da mutazioni nella DNA polimerasi mitocondriale associate a casi di oftalmoplegia esterna progressiva umana*

*I risultati discussi in questa sezione sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

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

La pubblicazione è riportata come allegato 1.

4.1 Costruzione di un ceppo *Δmip1* e clonaggio del gene *MIP1*

Al fine di poter introdurre e studiare l'effetto di mutazioni equivalenti a mutazioni patologiche umane nel gene *MIP1* di *Saccharomyces cerevisiae*, è stato necessario costruire un ceppo di lievito recante l'allele *mip1* nullo. D'altra parte, come sottolineato nell'introduzione, un ceppo deletato in *MIP1* è rho⁰, dunque privo di DNA mitocondriale. Un ceppo rho⁰ sarebbe inutile ai fini del lavoro, in quanto la DNA polimerasi mitocondriale, mutata o meno, non avrebbe substrato su cui agire. Come conseguenza, non sarebbe possibile studiare l'effetto delle varie mutazioni sul processo di replicazione dell'mtDNA. La costruzione di un ceppo deletato in *MIP1*, ma rho⁺, ha reso necessario la costruzione di un diploide eterozigote al locus *MIP1* (*MIP1/Δmip1*) così da preservare il mantenimento del DNA mitocondriale.

Come sottolineato nell'introduzione, uno dei vari vantaggi offerti da *S. cerevisiae* consiste nell'aver a disposizione una collezione di deletanti, una collezione di ceppi in cui tutti i geni non vitali di *S. cerevisiae* sono stati deleti singolarmente (collezione EUROSCARF). La collezione EUROSCARF è stata costruita utilizzando i ceppi aploidi BY4741 e BY4742 e il ceppo diploide BY4743, che presentano lo svantaggio di avere un trasposone Ty1 nel gene *HAP1* (Gaisne *et al.*, 1999). Il gene *HAP1* codifica per un fattore di trascrizione eme-dipendente che attiva la trascrizione di numerosi geni coinvolti nel metabolismo di tipo ossidativo, fra cui il citocromo c (Zitomer and Lowry, 1992). I mutanti *hap1* presentano pertanto alterazioni del metabolismo ossidativo, fra cui una riduzione di circa due volte del citocromo c, che rappresentano una situazione assolutamente svantaggiosa per lo studio di fenotipi/genotipi legati alla funzionalità mitocondriale (Gaisne *et al.*, 1999). Sulla base di questi dati, è stato deciso di non utilizzare il *background* BY47 per lo studio degli effetti di mutazioni in *MIP1*, ma il *background* W303 (Thomas and Rothstein, 1989). Il ceppo diploide W303 e la progenie aploide W303-1B e W303-1A, fra loro isogenici, presentano un'efficiente competenza respiratoria.

4.1.1 Costruzione del ceppo W303-1B *Δmip1*

Il gene *MIP1* è stato distrutto nel ceppo aploide W303-1B, mediante la tecnica “*gene disruption*”, che consiste nell'interruzione della ORF del gene mediante l'inserzione del marcatore di selezione Kan^R che conferisce resistenza alla geneticina (vedi Materiali e metodi).

La selezione dei potenziali distrutti è avvenuta su terreno addizionato di geneticina 200 µg/ml. I 16 cloni crescenti sono stati replicati su terreno addizionato di glicerolo 2% come unica fonte di carbonio. Sei dei 16 cloni sono risultati incapaci di crescere su glicerolo, ed erano dunque probabili deleti in *MIP1*. Come conferma sono state eseguite due reazioni di PCR da colonia, ciascuna delle quali è stata condotta utilizzando un primer interno al costrutto usato per l'integrazione e un primer esterno al costrutto. Solo se il costrutto si era integrato al locus *MIP1* si sarebbe ottenuto un amplificato (figura 4.1). Tutti e sei i cloni analizzati presentavano il corretto pattern di bande.

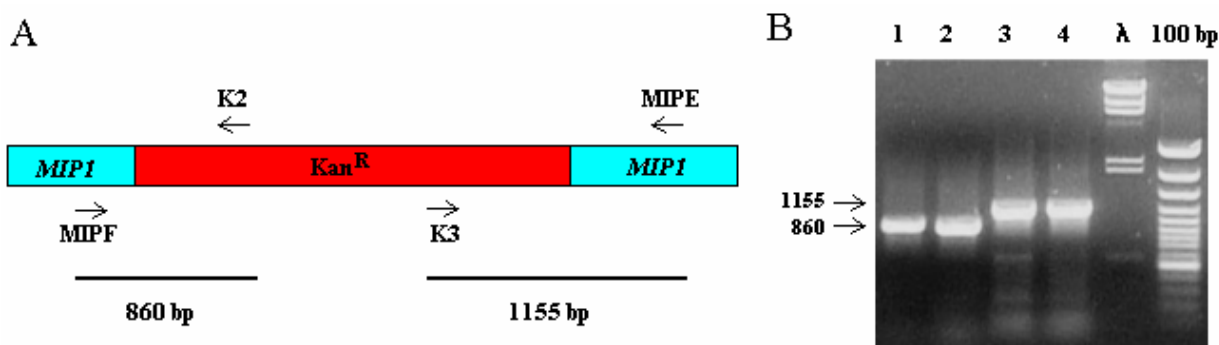


Figura 4. 1: (A) Schema dell'amplificazione mediante i primer MIPF e K2 (amplificato 1), o MIPE e K3 (amplificato 2); (B) Amplificati di due cloni deleti in *MIP1*: amplificato 1 (lane 1 e 3) e amplificato 2 (lane 2 e 4).

Come ulteriore conferma sul clone 1 è stato condotta un'analisi *Southern*, digerendo il DNA genomico estratto da questo ceppo e da W303-1B con l'enzima di restrizione *HindIII*. La digestione con questo enzima produce una banda di circa 14400 bp sul DNA non distrutto, mentre se la distruzione è avvenuta correttamente al *locus* la banda attesa è di circa 1200 bp (figura 4.2 A). Come sonda è stato utilizzato un frammento di circa 800 bp a monte della ORF *MIP1*, in grado di ibridare il DNA indipendentemente dall'avvenuta distruzione. Il clone 1 mostrava la banda attesa di 1200 bp (figura 4.2 B) ed è stato rinominato OF1.

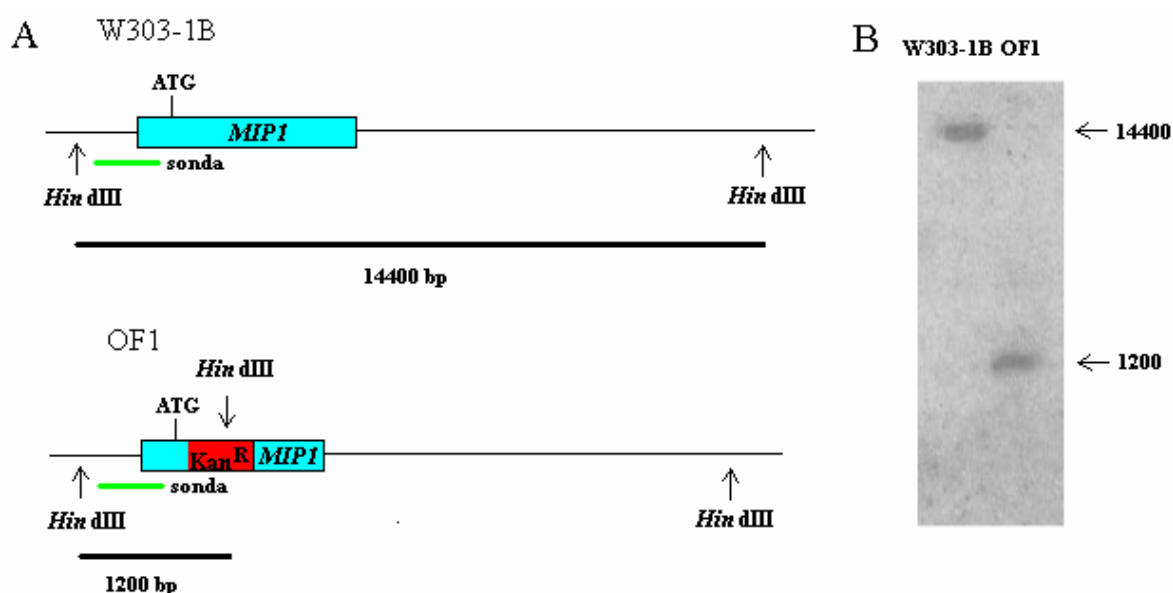


Figura 4. 2: (A) Schema del *Southern blot* sul DNA di W303-1B e OF1; (B) *Southern blot* sui ceppi W303-1B e OF1.

4.1.2 Costruzione e analisi fenotipica del diploide *MIP1/Δmip1*

Il ceppo diploide *MIP1/Δmip1* è stato ottenuto mediante incrocio del ceppo OF1 con il ceppo W303-1A. Il diploide ottenuto è stato chiamato DWM. In contemporanea è stato anche ottenuto il ceppo isogenico non deleto mediante incrocio di W303-1B e W303-1A, chiamato DWW.

Sui ceppi DWW (*MIP1/MIP1*) e DWM (*MIP1/Δmip1*) è stata condotta un'analisi fenotipica per valutare la funzionalità mitocondriale. In particolare, sono stati determinati gli spettri di assorbimento dei citocromi respiratori (figura 4.3) e l'attività respiratoria (tabella 4.1), una misura diretta della capacità delle cellule di respirare.

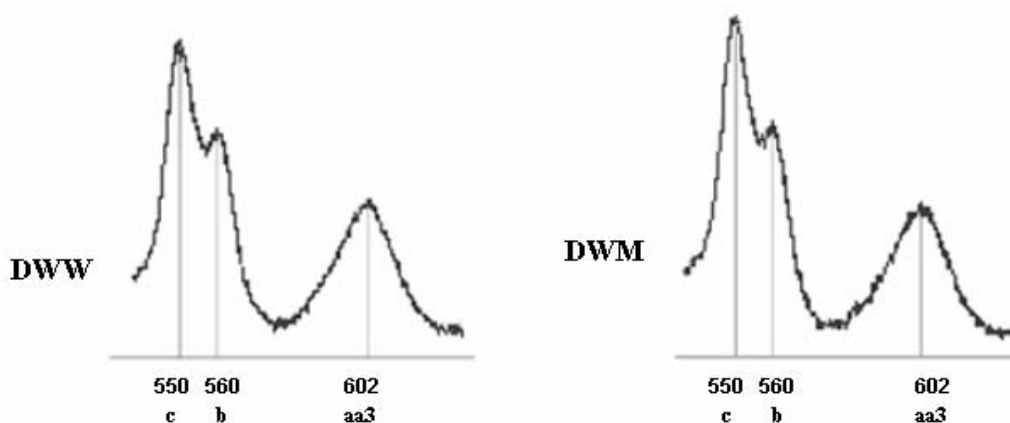


Figura 4. 3: Spettri dei citocromi respiratori dei ceppi DWW e DWM dopo crescita in terreno YP addizionato di glucosio 0,5% dopo esaurimento di quest'ultimo. Il picco a 602 nm rappresenta i citocromi aa3, facenti parte della citocromo c ossidasi, il picco 560 rappresenta il citocromo b e il picco a 550 nm rappresenta il citocromo c.

Ceppo	Attività respiratoria (μl/h/mg)
DWW	28,8
DWM	29,0

Tabella 4. 1 Attività respiratoria dei ceppi DWW e DWM. L'attività è espressa per microlitro di ossigeno consumato per ora per milligrammo di peso secco di cellule. I valori sono le medie di due esperimenti indipendenti.

Come mostrato, i due ceppi non presentano differenze per quanto riguarda la struttura e la funzione respiratoria.

La polimerasi γ è presente in quantità limitante nel mitocondrio in quanto è stato osservato che la corretta replicazione del mtDNA dipende dal dosaggio genico di *MIP1*. E' stato infatti rilevato un accumulo di circa il 45% di mutanti *petite* in un ceppo diploide *MIP1/Δmip1* cresciuto a 37°C (Lecrenier and Foury, 1995). Per stabilire se anche a 28°C la corretta replicazione del mtDNA dipendesse dal *gene dosage*, è stata determinata la frequenza di *petite* dopo quindici generazioni in terreno YPD a questa temperatura. Mentre il ceppo DWW presenta una frequenza pari allo 0,5%, il ceppo DWM presenta una frequenza pari all'1,6%, indicativa di una maggiore instabilità del DNA mitocondriale e pertanto di una dipendenza dal dosaggio genico.

4.1.3 Clonaggio del gene *MIP1*

Per introdurre le mutazioni equivalenti alle mutazioni patologiche in *MIP1*, nonché per ottenere un ceppo aploide deleta in *MIP1* ma ρ^+ , è stato necessario clonare il gene *MIP1*. Il gene è stato clonato nel plasmide centromerico di *S. cerevisiae* pFL38, che ha come marcatore

il gene *URA3*. Il clonaggio è stato condotto amplificando una regione di 5110 bp comprendente la regione codificante di *MIP1* più la regione a monte e inserendo il frammento entro i siti *SacI-SalI* di pFL38.

4.1.4 Isolamento del ceppo aploide $\Delta mip1$ ρ^+

Per ottenere un ceppo aploide delevto in *MIP1* e ρ^+ è stato dapprima necessario trasformare il ceppo diploide DWM con pFL38*MIP1*, ottenendo così il ceppo DWM/pFL38*MIP1*. Dopo sporificazione e dissezione di 10 tetradi, la tetrad 5 era costituita da tre spore vitali, di cui una sicuramente con il genotipo desiderato. Sui tre aploidi sono state condotte due PCR da colonia utilizzando i primer MIPF e K2 oppure MIPE e K3 (figura 4.4).

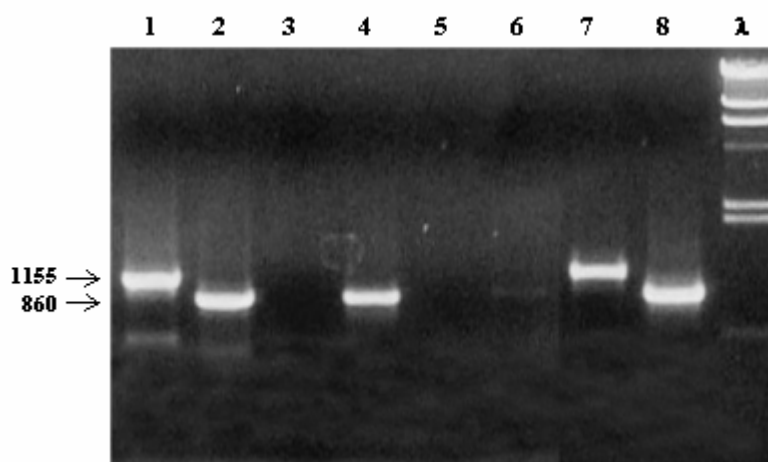


Figura 4. 4: Profilo elettroforetica dei prodotti di amplificazione con i primer MIPE e K3 (lane 1, 3, 5, 7) e MIPF e K2 (lane 2, 4, 6, 8) delle spore DWM-5A (lane 1, 2), DWM-5B (lane 3, 4) e DWM-5C (lane 5, 6) e del diploide DWM (lane 7, 8). Tutti i ceppi contenevano il plasmide pFL38/*MIP1*.

Come mostrato, uno dei ceppi, DWM-5A/pFL38*MIP1*, mostrava il pattern di bande atteso, uguale a quello del diploide parentale DWM. Come ulteriore controllo, è stato osservato che, dopo perdita plasmidica, i singoli cloni del ceppo DWM-5A erano respiratorio deficienti, indicando che la presenza di *MIP1* portato dal plasmide pFL38 è fondamentale per il mantenimento del DNA mitocondriale.

4.2 Analisi *in silico* e scelta delle mutazioni

Come detto, il fine dello studio è quello di inserire nel gene *MIP1* di *S. cerevisiae* alcune mutazioni del gene umano *POLG* che determinano una o più patologie mitocondriali, e di utilizzare il lievito come sistema modello, *in vivo*, per analizzare le eventuali alterazioni dei fenotipi legati alla stabilità del DNA mitocondriale.

4.2.1 Allineamento di Polg e Mip1p

Per potere introdurre mediante mutagenesi sito-specifica mutazioni in *MIP1* equivalenti alle mutazioni in *POLG*, si è proceduto inizialmente con l'allineamento delle due sequenze proteiche, utilizzando il programma ClustalW (figura 4.5).

Polg	MSRLLWRKVAGATVGGPVPAPGRWVSSVPASDPSDGQRRRQQQQQQQQQQQQPQQPQ	60
Mip1	MTKLMVR-----SECMLRMVRRRLRVQFCARWFS	30
	::: * : : : : * : .	
Polg	VLSSEGGQLRHNPLDIQMLSRGLHEQIFGQGG-----MPGEAAVRRSVEHLQKHGLWGQP	116
Mip1	TKKNTAEAPRINPVGIQYLGESLQRQVFGSCGGKDEVEQSDKLMELSKKSLKDHGLWGKK	90
	. . . * *:.*:.*:.*:.*:.*: * : : . * : :.*:*****:	
Polg	AVPLPDVELRLPLYGDNLDQHFRLLAQKQSLPYLEAANLLLQAQLPPKPPAWAWAEGWT	176
Mip1	TLITDPISFPLPPLQGRSLDEHFQKIGRFNSEPYKSFCEDKFTEMVAR-PAEWLRKPGWV	149
	:: : : * : * * . * : * : * : : : : * * . : : : . * . * * *	
Polg	RYGPEGEAVPVAIPEERALVFDVEVCLAEGTCPTLAVAIISPSAWYSWCSQRLVEERYSWT	236
Mip1	KYVPGMAPVEVAYPDEELVFDVETLVNVS DYPTLATALSSTAWYLWCSPFICGG-----	204
	:* * . * * * :.*: :*****. * : * : * : * : * : * : * : *	
Polg	SQLSPADLIPLEVPTGASSPTQRDWEQQLVGHNVSFDRAHIREQYLIQGSRMFLDTMS	296
Mip1	--DDPAALIPLNTLN-----KEQVIGHNVAYDRARVLEEYNFRDSKAFFLDTQS	252
	. ** * : : . : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : *	
Polg	MHMAISGLSSFQRSLWIAAKQGKHVKQPPTKQGQKSQRKARRGPAISSWDWLDISSVNSL	356
Mip1	LHIASFGLCSRQPMFMKNNKKKEAEVESEVHPEISIEDYDDP-----WLNVSALNSL	305
	:* * * * . * * : : : * . : : * . : : * . : : * : : * : *	
Polg	AEVHRLYVGGPPELEKEPRELFVKGTMKDIRENFQDLMQYCAQDWATHEVFQQQLPLFLE	416
Mip1	KDVAKFCHK-IDLDKTD R DFFASTDKSTIENFQKLVNYCATDVTATSQVFDEIFPVFLK	364
	: * : : * * * : * : * . * * * : * : * * * * : * : : * : * : *	
Polg	RCPHPVTLAGMLEMGVSYLPVNQN-WERYLAEAQGTYEELQREMKKSLMDLANDACQLLS	475
Mip1	KCPHPVSFAGLKSLSKCILPTKLNWDNDYLNSSSESLYQQSKVQIESKIVQIKDIVLLKD	424
	:*****:.*: : . * : : * * * * . : . * : : : : : : : : * *	
Polg	G-ERYKEDPWLWDLEWDLQEFKQKAKKVKKEPATASKLPIEGAGAPGDPMDQEDLGPCS	534
Mip1	KPDFYLKDPWLSQLDWTTKPLRLTKKG-----	451
	: * : * * * : * : * : : . *	
Polg	EEEEFQQDVMARACLQKLKGTTLELPKRPQHLPGHPGWYRKLCPRLDDPAWTPGPSLLSL	594
Mip1	-----VPAKCQKLPGFPEWYRQLFPSKDT-----VEPKITI	482
	: * : * : * * . * * : * * * * . : :	
Polg	QMRVTPKLMALTWDGFPLHYSERHGWGYLVPGRDNLAKLPTGTTLESAGVVCPYRAIES	654
Mip1	KSRIIPILFKLSWENSPVIWSKESGWCFNVP-----	513
	: * : * * : * : . * : : . * * : *	
Polg	LYRKHCCLEQKGQQLMPQEAGLAEFFLLTDNSAIWQTVEELDYLEVEAEAKMENLRAAVPG	714
Mip1	-----HEQVETYKAKNYVLADS-----VSQEEEEIRTHNLGLQCTG	549
	* : * : : * : . : * * : . * * *	
Polg	QPLALTARGGPKDTQPSYHHGNGPYNDVDIPGCWFFKLPKHDGNSCNVGSPPFAKDFLPKM	774
Mip1	-----VLFKVPHPNGPTFNCTNLLTKSYNHFF	576
	: * : * * : * : * . : * : :	
Polg	EDGTLQAGPGGASGPRALEINKMISFWRNAHKRISSQM VV--WLPRSALPRAVIRHPDY	831
Mip1	EKGVLKSES--ELAHQALQINSSGSYMSARERIQSQFVVPSCKFPNEFQSLSAKSSLNN	634
	* . * : : . : * : * . * * . * : * : * : * : * : * . . : . :	
Polg	DEEGLYGAILPQVVTAGTITRRAVEPTWLTASNARPDVSGSELKAMVQAPPGYT	891
Mip1	EKTNDLAIIIPKIVPMGTITRRAVENAWLTASNANRIGSELKTQVKAPPGYC	694
	: : . * : : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Polg	DSQELWIAAVLGDAHFAGMHGCTAFGWMTLQGRKSRGTDLHSKTATTVGISREHAKIFNY	951
Mip1	DSEELWIASLVGDSIFN-VHGGTAIGWMCLEGTNEGTDLHTKTAQILGCSRNEAKIFNY	753
	* : * * : * : : * * . * * * : * * * . * * . * : * * : * : *	
Polg	GRIYGAGQPF AERLLMQFNHRLTQEEAAEK AQMYAATKGLRWYRLSDEGEWL VRELNLP	1011
Mip1	GRIYGAGAKFASQLLRKFNPSLTDEETKKIANKLYENTKKG-----	794
	* : *	
Polg	VDRTEGGWISLQDLRKVQRETARKSQWKKEVVAERAWKGGTESEMFNKLESIA TSDIPR	1071
Mip1	-----TKRSKLFKFWYGGSESLFNKLESIAEQETPK	827
	. * . : : * * : * : * : * : * : * : *	
Polg	TPVLGCCISRALEPS-AVQEEFMTSRVNVVQSSAVDYHLMLVAMKWLFEFAIDGRFC	1130
Mip1	TPVLGCGITYSLMKKNLRANSFLPSRINWAIQSSGV DYHLHLLCCSMEYI IKKNLEARLC	887
	* * * * * * : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Polg	ISIHDEVRYLVREEDRYRAALALQITNLLTRCMFAYKGLNDLPQSVAFFSAVDIDRCLR	1190

Dall'allineamento emerge che le due sequenze hanno una identità del 31% e una similarità del 43%. L'allineamento è stato necessario per individuare il residuo di Mip1p che occupa la posizione corrispondente al residuo mutato di Pol γ umana. E' necessario che i residui siano conservati nelle due polimerasi, e, in secondo luogo, cadano in uno *stretch* conservato, per garantire così la correttezza dell'allineamento.

- validare la mutazione, cioè dimostrare che il fenotipo é dovuto alla mutazione G268A;
- verificare che la mutazione sia effettivamente recessiva, poiché avendo a disposizione solo casi sporadici di pazienti questo non può essere determinato;
- avere a disposizione una mutazione nel dominio esonucleasico al fine di testare soppressori o sostanze in grado di ridurre l'eventuale mutabilità *petite* e/o puntiforme.

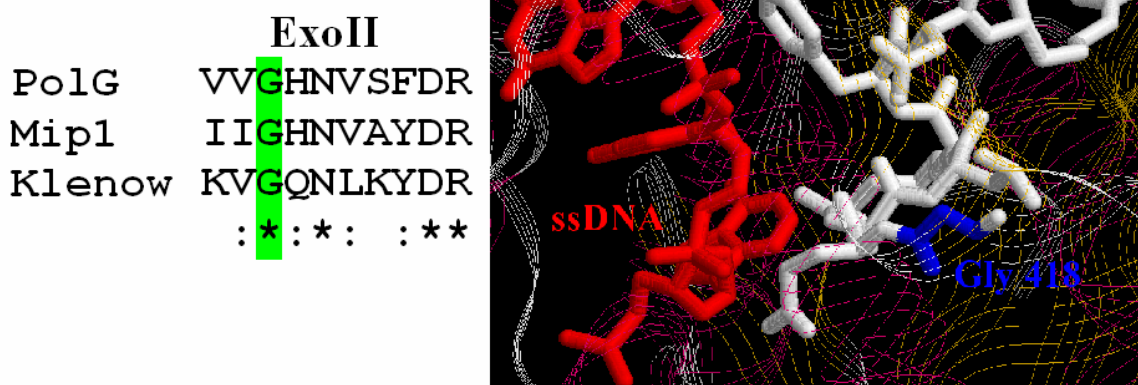


Figura 4. 6: A sinistra l'allineamento del motivo ExoII di Polg umana, di Mip1 e del Klenow fragment. In verde la glicina 224 di Mip1, corrispondente a Gly418 sul Klenow fragment. A destra la struttura del motivo ExoII del Klenow fragment, in bianco, associato con DNA a singolo filamento, in rosso; in blu la glicina 418. La figura è stata elaborata con Rasmol utilizzando la struttura 1kfs del Protein Data Bank.

La mutazione Y757C corrisponde alla mutazione umana Y955C, situata nel dominio polimerasico. Come detto precedentemente, la mutazione si trova nel motivo PolB, coinvolto nel riconoscimento e nel legame del dNTP entrante (figura 4.7), ed è associato ad una forma grave di adPEO. La sostituzione, data la gravità del fenotipo, è una di quelle maggiormente caratterizzate, in particolare a livello biochimico, come sottolineato nell'introduzione.

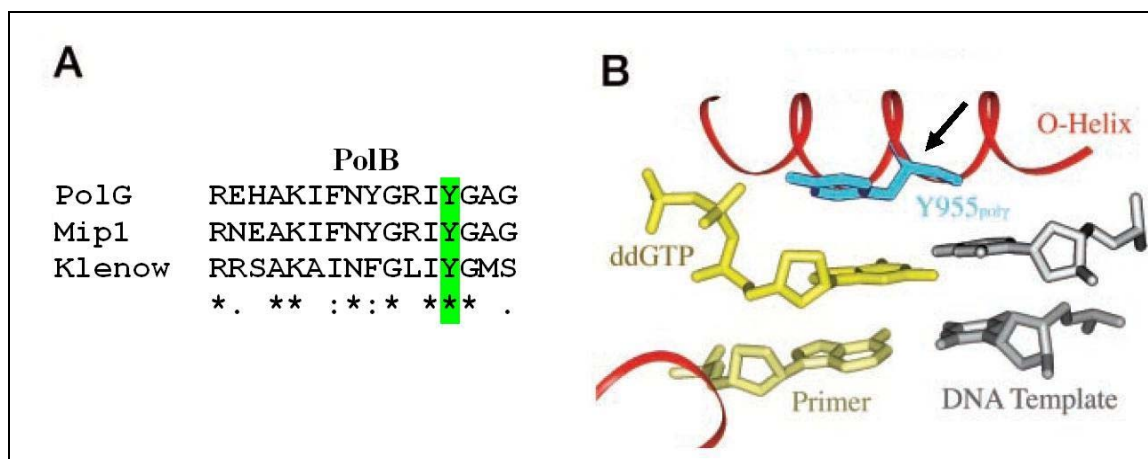


Figura 4. 7: A sinistra l'allineamento del motivo PolB di Polg umana, di Mip1 e del Klenow fragment. In verde la tirosina 757 di Mip1, corrispondente a Tyr955 su hPolg. A destra la struttura predetta del motivo PolB di hPolg, associato con DNA template a singolo filamento, col primer e con ddGTP; in blu la tirosina 955 (da Ponamarev *et al.*, 2002).

4.3 Introduzione delle mutazioni in *MIP1* e trasformazione di *Saccharomyces cerevisiae*

Le mutazioni G224A e Y757C sono state introdotte nel gene *MIP1* mediante mutagenesi sito-specifica, utilizzando il kit “QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit”. Come template è stato utilizzato il plasmide pUC19*MIP1*, ottenuto mediante subclonaggio in pUC19 del gene *MIP1* precedentemente clonato in pFL38. I plasmidi ottenuti sono stati chiamati

rispettivamente pUC19*mip1*^{G224A} e pUC19*mip1*^{Y757C}. Successivamente i due alleli sono stati subclonati in pFL38, ottenendo i plasmidi pFL38*mip1*^{G224A} e pFL38*mip1*^{Y757C}, e in pFL39, avente come marcatore *TRP1*, ottenendo i plasmidi pFL39*mip1*^{G224A} e pFL39*mip1*^{Y757C}.

Per studiare l'effetto delle mutazioni nel gene *MIP1*, è necessario l'utilizzo di un *background* in cui l'allele selvatico sia assente. Come detto in precedenza, è stato creato il ceppo DWM-5A/pFL38*MIP1*, in cui il *locus MIP1* è stato deletato, ma in cui il mantenimento del DNA mitocondriale è garantito dalla presenza del gene *MIP1* sul plasmide pFL38. D'altra parte lo studio degli effetti delle mutazioni implica che l'allele selvatico venga perso, non prima di aver inserito nel ceppo l'allele mutato *mip1*, al fine di evitare la perdita irreversibile dell'mtDNA. Per l'inserimento degli alleli mutati *mip1*^{G224A} e *mip1*^{Y757C} è stata perciò usata una tecnica di *plasmid shuffling*, descritta in Materiali e metodi e rappresentata schematicamente in figura 4.8.

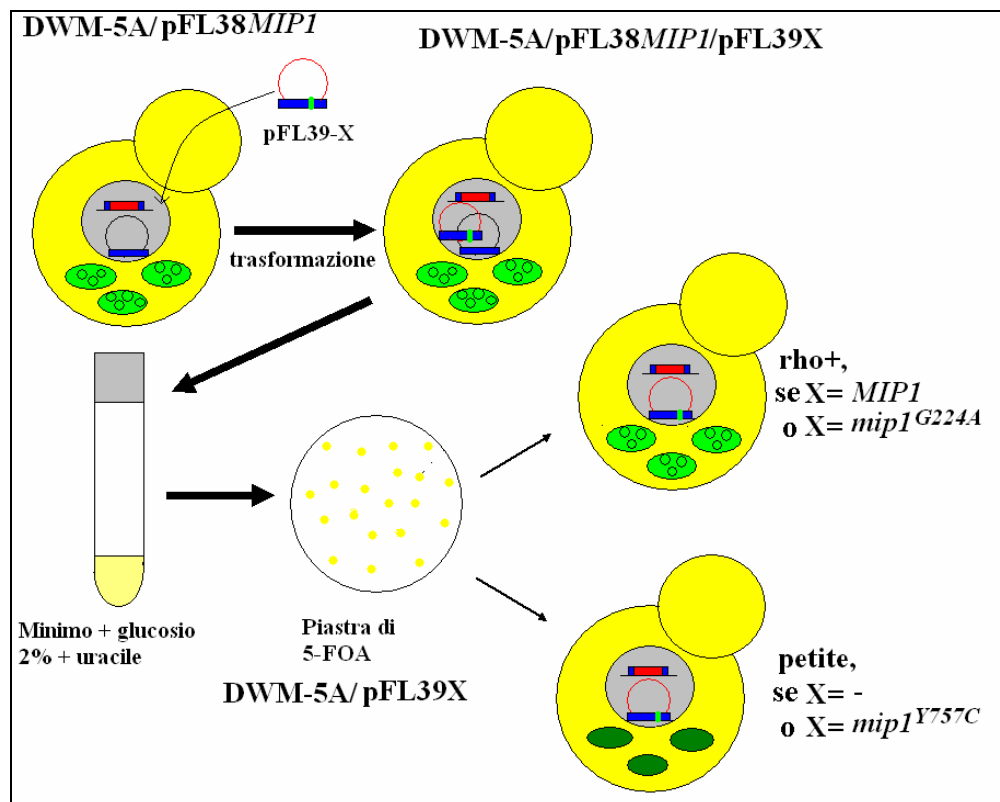


Figura 4. 8: Rappresentazione schematica del *plasmid shuffling* sul ceppo DWM-5A/pFL38MIP1. X indica gli alleli *MIP1*, *mip1*^{G224A}, *mip1*^{Y757C} o il plasmide pFL39 vuoto. In grigio il nucleo, contenente il plasmide pFL38MIP1, in nero, e/o il plasmide pFL39X, in rosso. In verde chiaro i mitocondri contenenti il DNA mitocondriale wt, in verde scuro i mitocondri privi di DNA mitocondriale wt.

Dapprima il ceppo DWM-5A/pFL38MIP1 è stato trasformato con i vari alleli su pFL39, ottenendo rispettivamente i ceppi DWM-5A/pFL38MIP1/pFL39MIP1, DWM-5A/pFL38MIP1/pFL39mip1^{G224A}, DWM-5A/pFL38MIP1/pFL39mip1^{Y757C} e DWM-5A/pFL38MIP1/pFL39, che sono stati privati del plasmide pFL38MIP1 dopo *plasmid shuffling*. Dopo la perdita di pFL38MIP1, per quanto concerne lo stato del DNA mitocondriale, come riportato in figura 4.8 due condizioni erano possibili. Se la polimerasi mutata fosse stata in grado di replicare correttamente il DNA mitocondriale, le cellule

sarebbero state ρ^+ . Al contrario, se la polimerasi mutata non fosse stata in grado di replicare correttamente il DNA mitocondriale le cellule sarebbero state *petite*. Pertanto le colonie sono state saggiate per la crescita su fonte ossidabile. Mentre le colonie contenenti pFL39MIP1 e pFL39mip1^{G224A} erano respiratorio sufficienti, tutte le colonie contenenti pFL39mip1^{Y757C} e pFL39 erano respiratorio deficienti. Già dal *plasmid shuffling* è pertanto emerso che la polimerasi mutata Mip1^{Y757C} non era in grado di replicare correttamente il DNA mitocondriale e dunque di mantenere lo stato ρ^+ delle cellule. Per tutti i ceppi, chiamati DWM-5A/pFL39MIP1, DWM-5A/pFL39mip1^{G224A}, DWM-5A/pFL39mip1^{Y757C} e DWM-5A/pFL39, sono stati analizzati successivamente due cloni.

Per quanto concerne lo studio della dominanza/recessività delle mutazioni, il ceppo diploide DWM, che possiede una sola copia MIP1, è stato trasformato con i plasmidi pFL38MIP1, pFL38mip1^{G224A}, pFL38mip1^{Y757C} e pFL38, ottenendo rispettivamente i ceppi eteroallelici DWM/pFL38MIP1, DWM/pFL38mip1^{G224A}, DWM/pFL38mip1^{Y757C} e DWM/pFL38.

4.4 Analisi fenotipica dei ceppi DWM-5A

L'analisi della funzionalità mitocondriale è stata condotta mediante un'analisi fenotipica al fine di determinare la capacità dei mitocondri di respirare, la capacità della polimerasi mutata di mantenere lo stato ρ^+ delle cellule e di replicare correttamente il DNA mitocondriale.

4.4.1 Spettri dei citocromi e attività respiratoria

Sono stati dapprima determinati gli spettri dei citocromi respiratori dei ceppi DWM-5A trasformati con i vari alleli *mip1* dopo crescita in terreno SC addizionato di glucosio 0,5% ad esaurimento (allegato 1, figura 1). Come mostrato, il ceppo DWM-5A/pFL39mip1^{G224A} mostrava uno spettro indistinguibile rispetto a quello del ceppo DWM-5A/pFL39MIP1. Al contrario il ceppo DWM-5A/pFL39mip1^{Y757C} presentava uno spettro privo dei citocromi aa3 e b, codificati parzialmente (aa3) o totalmente (b) dal DNA mitocondriale, mentre il picco del citocromo c, codificato dal DNA nucleare, era normale.

E' inoltre stata misurata l'attività respiratoria dei diversi ceppi DWM-5A (tabella 4.2)

Ceppo DWM-5A/	Attività respiratoria (μl/h/mg)	% rispetto a pFL39MIP1
pFL39MIP1	26,4	100
pFL39mip1 ^{G224A}	26,1	98,9
pFL39mip1 ^{Y757C}	0,61	2,3
pFL39	0,68	2,6

Tabella 4. 2: Attività respiratoria dei ceppi DWM-5A/pFL39MIP1, DWM-5A/pFL39mip1^{G224A}, DWM-5A/pFL39mip1^{Y757C} e DWM-5A/pFL39. L'attività è espressa per microlitro di ossigeno consumato per ora per milligrammo di peso secco di cellule. I valori sono le medie di due esperimenti indipendenti su due cloni indipendenti.

Come mostrato in tabella, il ceppo DWM-5A/pFL39mip1^{G224A} possiede un'attività respiratoria non significativamente differente rispetto al ceppo DWM-5A/pFL39MIP1. Al contrario il ceppo DWM-5A/pFL39mip1^{Y757C} presenta un'attività respiratoria quasi nulla. Il

consumo di ossigeno residuo è dovuto ad altre attività, ad esempio ossigenasiche, come dimostrato dal fatto che il consumo residuo si osservava anche nel ceppo DWM-5A/pFL39 sicuramente ρ^0 e dunque privo di attività respiratoria.

4.4.2 Determinazione della frequenza dei *petite*

In lievito, è facile valutare se mutazioni patologiche inserite in *MIP1* causano la delezione dell'mtDNA, misurando la frequenza dei *petite*. In particolare abbiamo determinato la frequenza dei *petite* dei ceppi DWM-5A/pFL39*MIP1* e DWM-5A/pFL39*mip1*^{G224A} a 28°C (tabella 4.3) e a 36°C (tabella 4.3 e allegato 1, figura 2 A). La determinazione a 36°C è stata condotta per amplificare le differenze, poiché è noto che ad alte temperature i ceppi producono una maggiore percentuale di cloni *petite*.

Ceppo DWM-5A/	Frequenza dei <i>petite</i> a 28°C		Frequenza dei <i>petite</i> a 36°C	
	%	Incremento	%	Incremento
PFL39 <i>MIP1</i>	1,9	1,0	9	1,0
pFL39 <i>mip1</i> ^{G224A}	4,2	2,2	21	2,3

Tabella 4. 3: Frequenza e incremento dei *petite* nei ceppi DWM-5A/pFL39*MIP1* a DWM-5A/pFL39*mip1*^{G224A} a 28°C e a 36°C. La deviazione standard è inferiore in tutti i casi al 15%.

A entrambe le temperature la presenza della mutazione G224A ha causato un incremento della frequenza dei *petite* di circa 2,2 volte rispetto al wt. Le frequenze risultavano, come atteso, più alte a 36°C (tabella 4.3).

4.4.3 Determinazione della natura dei *petite*

I *petite* ottenuti possono essere ρ^- oppure ρ^0 . Fra le varie tecniche a disposizione per determinare la natura dei *petite* è stata utilizzata la tecnica dell'incrocio con mutanti tester mit⁻ di sesso opposto, come descritto nell'introduzione. Incrociando un ceppo *petite* e un ceppo mit⁻ si ottiene un diploide che può essere respiratorio sufficiente o deficiente, come riportato in figura 4.9. In particolare se il ceppo *petite* da testare è ρ^- , in seguito a fusione dei mitocondri derivanti dai due ceppi e ricombinazione, molto frequente nel DNA mitocondriale di lievito, si otterrà un diploide respiratorio sufficiente, purché la regione di mtDNA presente nel ρ^- comprenda la regione che, nel mit⁻, è mutata. Al contrario, se il ceppo *petite* da testare, è ρ^0 , non avverrà alcuna ricombinazione e il ceppo diploide sarà respiratorio deficiente. Per avere un'elevata confidenza che un ceppo sia effettivamente ρ^- è necessario incrociarlo con diversi mit⁻, così da avere un'elevata garanzia che venga coperto gran parte del DNA mitocondriale.

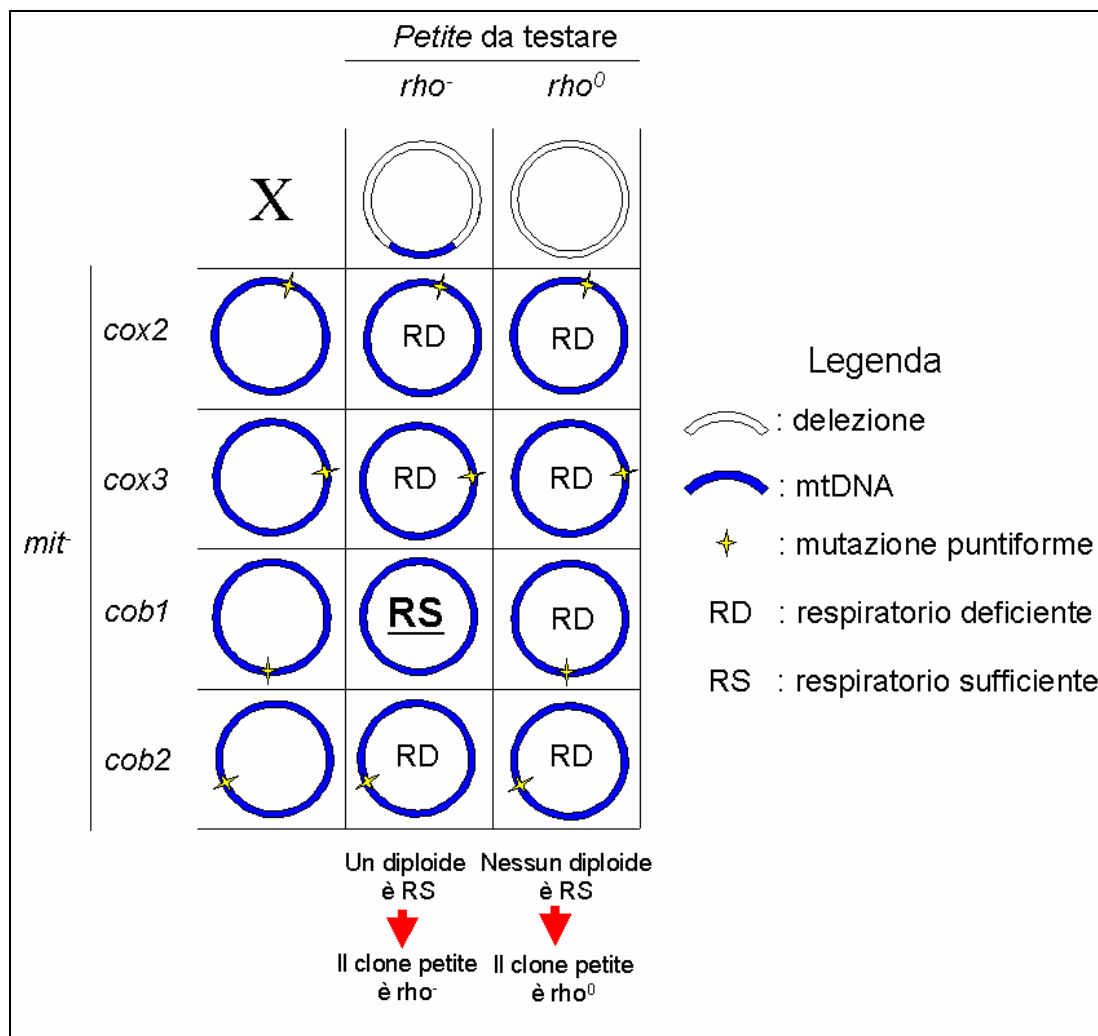


Figura 4. 9: Rappresentazione schematica dell'incrocio fra ceppi *rho⁻* e ceppi tester *mit⁻*.

In particolare, i cloni *petite* precedentemente ottenuti sono stati incrociati con quattro ceppi *mit⁻* di sesso opposto, mutati rispettivamente in due esoni del gene *COB* (chiamate *cob1* e *cob2*), nel gene *COX2* e nel gene *COX3* e scelti perché queste regioni sono maggiormente conservate mantenute nei *rho⁻* originatisi spontaneamente (Fukuhara and Wesolowski, 1977; Mathews *et al.*, 1977). Per ogni ceppo sono stati saggiati almeno 200 cloni fra quelli cresciuti a 36°C. Sono stati anche testati 200 cloni del ceppo DWM-5A/pFL39*mip1*^{Y757C} ottenuti direttamente dopo perdita plasmidica su 5-FOA del gene *MIP1* selvatico (tabella 4.4 e allegato 1, tabella 1).

Ceppo DWM-5A/	Frequenza dei <i>rho⁰</i> tra i <i>petite</i>
PFL39 <i>MIP1</i>	46%
pFL39 <i>mip1</i> ^{G224A}	44%
pFL39 <i>mip1</i> ^{Y757C}	100%

Tabella 4. 4: Frequenza dei *rho⁰* tra i *petite*. L'esperimento è stato condotto incrociando almeno 200 cloni per ceppo.

Dalla tabella emergono due chiare evidenze:

- la polimerasi mutata Mip1^{Y757C} non è in grado di replicare il DNA mitocondriale, essendo tutti i cloni *petite* privi di mtDNA
- la presenza della mutazione G224A non incrementa la frequenza dei ρ^0 tra i *petite*, dimostrando che la mutazione G224A non è associata ad un aumento della deplezione di mtDNA.

Per confermare che i cloni valutabili come ρ^0 in base agli esperimenti di incrocio con in mutanti mit^- fossero effettivamente privi di mtDNA, i cloni *petite* precedentemente ottenuti sono stati analizzati mediante altre due tecniche che permettono la distinzione fra ρ^- e ρ^0 , il DAPI *staining* dell'mtDNA e il *Southern blot* sul DNA mitocondriale. Per quanto concerne il DAPI *staining*, 50 cloni *petite*, dei quali 10 risultati ρ^- e 40 risultati ρ^0 , sono stati incubati in presenza di DAPI, che si lega preferenzialmente, soprattutto a basse concentrazioni, al DNA mitocondriale. Mentre i cloni ρ^+ di controllo presentavano cellule per lo più contenenti DNA mitocondriale e i cloni ρ^0 mostravano un segnale solo proveniente dal nucleo, i cloni ρ^- mostravano una percentuale variabile fra il 10% e il 50% in cui il DNA mitocondriale era visibile (figura 4.10).

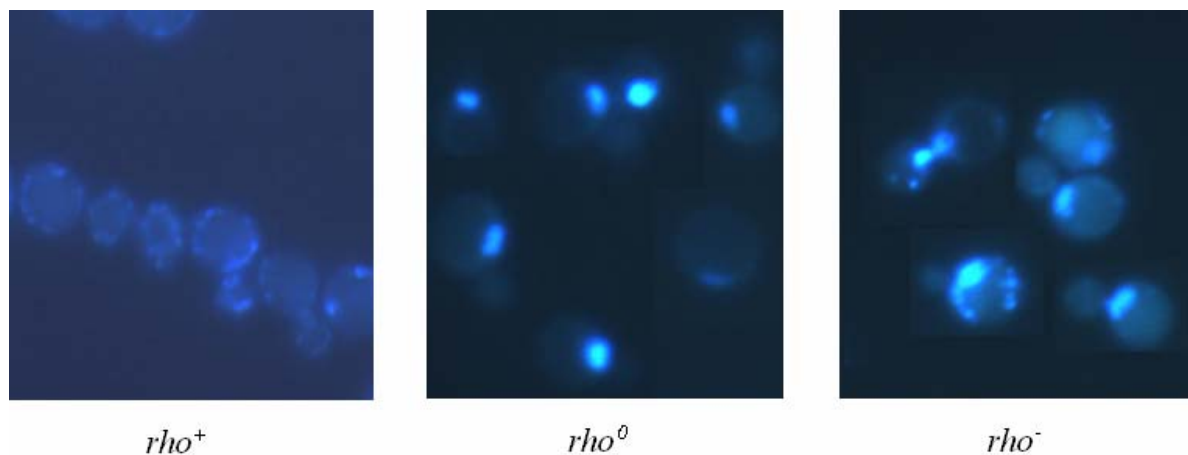


Figura 4. 10: DAPI *staining* di un clone ρ^+ (a sinistra), ρ^0 (al centro) e ρ^- (a destra).

Dei 40 cloni presunti ρ^0 , una percentuale del 92% non mostrava effettivamente la presenza di DNA mitocondriale, dimostrando che l'incrocio con i ceppi mit^- utilizzati era stato efficace per distinguere la natura dei *petite*.

Come ulteriore controllo, su 20 cloni ρ^0 è stato condotto un'analisi *Southern* sul DNA mitocondriale digerito con *EcoRV*. Come sonda è stato utilizzato un oligonucleotide situato all'interno delle origini di replicazione dell'mtDNA di *S. cerevisiae*. La maggior parte dei ρ^- possiede almeno un'origine di replicazione, su cui può ibridare la sonda. Una percentuale pari al 90% (18 cloni su 20) si è dimostrata effettivamente essere ρ^0 , confermando ulteriormente la bontà del test precedentemente utilizzati. Il *Southern blot* su 10 dei 25 cloni e su opportuni controlli è riportato nell'allegato 1, figura 3.

4.4.4 Determinazione della mutabilità puntiforme del DNA mitocondriale

Successivamente è stato determinato se la mutazione G224A incrementasse la mutabilità puntiforme del DNA mitocondriale. La mutabilità puntiforme è stata determinata mediante misurazione della frequenza di mutanti resistenti all'antibiotico eritromicina (mutanti Ery^R). La resistenza all'eritromicina è dovuta a specifiche mutazioni in tre posizioni del gene mitocondriale codificante l'RNA ribosomale 21S (GAA, nucleotidi 59965-59967 sulla mappa dell'mtDNA dell'SGD database <http://www.yeastgenome.org/>) (Sor and Fukuhara, 1984). In particolare è stato osservato che la presenza della mutazione G224A incrementava la frequenza Ery^R di circa 10 volte (allegato 1, tabella 2).

4.5 Studio della dominanza/recessività delle mutazioni G224A e Y757C

Per stabilire la dominanza/recessività delle mutazioni sono stati costruiti i ceppi eteroallelici DWM/pFL38MIP1, DWM/pFL38mip1^{G224A}, DWM/pFL38mip1^{Y757C} e DWM/pFL38 e su di essi è stata condotta la stessa analisi fenotipica condotta sui ceppi aploidi DWM-5A.

I ceppi non mostravano alcuna differenza per quanto concerneva la crescita su fonti ossidabili, i profili dei citocromi respiratori e l'attività respiratoria (dati non mostrati).

E' stata misurata la frequenza dei *petite*, riportata in tabella 4.5 e in allegato 1, figure 2 B e 4 B. La misurazione è stata condotta anche sul ceppo contenente una sola copia di MIP1 per stabilire il tipo di recessività.

Ceppo DWM/	28°C		36°C	
	%	Incremento	%	Incremento
pFL38MIP1	0,9	1,0	1,5	1,0
pFL38mip1 ^{G224A}	1,0	1,1	2,0	1,3
pFL38mip1 ^{Y757C}	8,1	9,0	32,1	21,4
pFL38	2,5	2,8	8,0	5,3

Tabella 4. 5: Frequenza dei *petite* a 28°C e a 36°C nei ceppi DWM/pFL38MIP1, DWM/pFL38mip1^{G224A}, DWM/pFL38mip1^{Y757C} e DWM/pFL38. L'incremento si riferisce al ceppo DWM/pFL38MIP1.

Dai dati sono emerse diverse osservazioni:

- 1) Il ceppo recante due copie di MIP1 produceva meno *petite* rispetto al ceppo con una sola copia di MIP1, sia a 28°C che a 36°C, a . Questo conferma che la polimerasi mitocondriale è prodotta in quantità limitante.
- 2) Il ceppo eteroallelico DWM/pFL38mip1^{G224A} presentava una frequenza di *petite* non significativamente diversa dal ceppo DWM/pFL38MIP1, indicando che la mutazione G224A è recessiva e che inoltre la polimerasi mutata mantiene gran parte della sua attività, essendo i valori inferiori a quelli del ceppo DWM/pFL38.
- 3) La mutazione Y757C è dominante. La frequenza dei *petite* del ceppo DWM/pFL38mip1^{Y757C} non solo è superiore a quella del ceppo DWM/pFL38MIP1,

ma anche a quella del ceppo DWM/pFL38, mostrando così una chiara interferenza della polimerasi mutata con la polimerasi selvatica nella replicazione dell'mtDNA.

- 4) La mutazione Y757C determina termosensibilità, essendo l'incremento della frequenza dei *petite* superiore a 36°C rispetto a 28°C.

Per quanto concerne la determinazione della natura dei *petite*, in questo caso non può essere utilizzata direttamente la tecnica dell'incrocio con i mit⁻, in quanto i ceppi DWM sono diploidi. Per ovviare a questo problema, l'analisi dei *petite* è stata condotta su ceppi aploidi W303-1B trasformati con i plasmidi pFL38MIP1 e pFL38mip1^{Y757C}. La determinazione della frequenza dei *petite* è stata fatta solo per la mutazione Y757C in quanto la mutazione G224A si è dimostrata recessiva.

In primo luogo i ceppi aploidi W303-1B/pFL38MIP1 e W303-1B/pFL38mip1^{Y757C} presentavano frequenze di *petite* del tutto simili a quelle, rispettivamente, dei ceppi diploidi DWM/pFL38MIP1 e DWM/pFL38mip1^{Y757C}, segno che la frequenza dei *petite* è scarsamente influenzata dalla ploidia, cioè dalla presenza di una copia oppure di due copie di genomi (allegato 1, figura 2 B e tabella 1). Si è potuto procedere pertanto alla analisi dei rho⁰, incrociando almeno 200 cloni *petite* dei ceppi W303-1B/pFL38MIP1 e W303-1B/pFL38mip1^{Y757C} ottenuti in precedenza dopo analisi a 36°C con ceppi mit⁻. I valori sono riportati in tabella 4.6 e in allegato 1, tabella 1.

Ceppo W303-1B/	Frequenza dei rho ⁰ tra i <i>petite</i>
PFL38MIP1	26%
pFL38mip1 ^{Y757C}	51%

Tabella 4. 6: Frequenza dei rho⁰ tra i *petite*. L'esperimento è stato condotto incrociando almeno 200 cloni per ceppo.

Come è possibile osservare dalla tabella, la presenza della mutazione Y757C non solo portava ad un incremento delle delezioni, ma induceva anche una maggiore perdita dell'mtDNA, mostrando un valore doppio di colonie rho⁰ rispetto al ceppo contenente l'allele selvatico. Infine sui ceppi DWM è stata determinata la frequenza dei mutanti Ery^R. I valori sono riportati in allegato 1, tabella 2. Come è possibile osservare, la mutazione G224A si comporta come una mutazione recessiva, in quanto il ceppo eteroallelico DWM/pFL38mip1^{G224A} mostrava una frequenza simile a quella del ceppo contenente due copie di MIP1. Al contrario la mutazione Y757C si comporta come una mutazione dominante, in quanto il ceppo eteroallelico DWM/pFL38mip1^{Y757C} mostrava una frequenza di mutanti Ery^R 11 volte superiore al ceppo contenente due copie di MIP1 e 3,5 volte superiore al ceppo contenente una sola copia di MIP1.

4.6 Rescue genetico del fenotipo: incremento dei dNTP pool

La seconda parte di questo studio si è concentrata sulla ricerca di geni o di sostanze in grado di ridurre gli effetti deleteri sulla stabilità mitocondriale delle mutazioni G224A e Y757C. Questi esperimenti di *rescue* hanno una doppia finalità:

- 1) Aiutare, attraverso i meccanismi con cui agiscono i geni o le sostanze saggiate, a comprendere i meccanismi con cui le mutazioni patologiche portano a delezioni e/o deplezione dell'mtDNA.
- 2) Gettare le basi per successivi esperimenti di *rescue* in organismi superiori, con la finalità di progettare opportuni trattamenti delle malattie.

In particolare è stato saggiato se l'aumento dei dNTP *pool* mitocondriali portasse ad una riduzione della mutabilità *petite* o puntiforme. L'incremento dei dNTP *pool* è stato ottenuto in due modi complementari: overesprimendo il gene *RNR1* e distruggendo il gene *SML1*. Come riportato nell'introduzione, il gene *RNR1* codifica per la subunità catalitica della ribonucleotide reductasi, che catalizza lo step limitante nella sintesi dei dNTP. In particolare è stato precedentemente dimostrato che l'overespressione di *RNR1* incrementa il *pool* nucleotidico, sia citosolico che mitocondriale. Un effetto analogo è stato ottenuto mediante la delezione del gene *SML1*, codificante un inibitore della proteina Rnr1.

4.6.1 Effetto dell'overespressione del gene *RNR1*

Dapprima i ceppi DWM-5A trasformati con gli alleli *MIP1* wt e *mip1*^{G224A} sono stati trasformati col plasmide pWJ841, un plasmide multicopia derivante dal plasmide pRD425 al cui interno è stato clonato il gene *RNR1*. Sui ceppi trasformati è stata determinata, utilizzando come controlli gli stessi ceppi contenenti il plasmide pRS426 vuoto, la frequenza di *petite* e di rho⁰ a 36°C (allegato 1, tabella 1 e figura 1.4 A). Come mostrato in figura, l'overespressione di *RNR1* ha ridotto di circa 6 volte la percentuale dei *petite* in entrambi i ceppi. Inoltre l'overespressione di *RNR1* ha ridotto la frequenza di rho⁰ dal 44% al 32% nel ceppo contenente l'allele selvatico e dal 44% al 34% nel ceppo contenente l'allele *mip1*^{G224A}.

Inoltre sono stati trasformati col plasmide pWJ841 i ceppi diploidi DWM recanti i diversi alleli *mip1* e, per la determinazione della frequenza dei rho⁰, i ceppi aploidi W303-1B recanti i diversi alleli mutanti (come nel caso precedente le differenze fra le frequenze dei *petite* nei ceppi diploidi e aploidi sono risultate non significative). La frequenza di *petite* e di rho⁰ a 36°C per i vari ceppi sono riportati in allegato 1, tabella 1 e figura 4 B. Come mostrato, l'overespressione di *RNR1* ha ridotto la frequenza dei *petite* di circa 3 volte, indipendentemente dalla presenza, sul plasmide pFL38, dell'allele selvatico, o delle due varianti mutate. Invece, l'overespressione di *RNR1* ha ridotto dal 51% al 35% la frequenza di rho⁰ tra i *petite* nel ceppo W303-1B/pFL38*mip1*^{Y757C}, mentre la riduzione non è significativa nel ceppo W303-1B/pFL38*MIP1*.

4.6.2 Effetto della delezione del gene *SML1*

Come ulteriore conferma che l'incremento dei dNTP *pool* sia responsabile di una riduzione della frequenza di delezioni nell'mtDNA, sono stati analizzati gli effetti sulla mutabilità mitocondriale della delezione del gene *SML1*.

Dapprima è stato necessario creare un ceppo aploide deleto in *MIP1* e in *SML1*, ma rho⁺. Il ceppo è stato ottenuto incrociando il ceppo OF1 (Δ *mip1*) con un ceppo isogenico a W303-1A, ma deleto in *SML1* con la cassetta *HIS3*, gentilmente messoci a disposizione da Rodney

Rothstein. Dalla sporificazione del diploide YO81 è stata ottenuta una spora $\Delta mip1 \Delta sml1$ (ρ^0), chiamata YO81-4B, e due spore $MIP1 \Delta sml1$, chiamata YO81-3A e YO81-5D.

Il ceppo YO81-4B era deleto in entrambi i geni, ed era ρ^0 , per cui non poteva direttamente essere utilizzato per l'analisi della funzionalità mitocondriale. Per ottenere un ceppo $\Delta mip1 \Delta sml1 \rho^+$, il ceppo YO81-3A è stato trasformato col plasmide pFL38MIP1 e incrociato con YO81-4B. Il diploide così ottenuto, DYY/pFL38MIP1 è stato fatto sporificare, ottenendo la spora DYY-4C/pFL38MIP1 ($\Delta mip1 \Delta sml1 \rho^+$).

Il ceppo è DYY-4C/pFL38MIP1 è stato trasformato con i plasmidi pFL39 contenenti i vari alleli e, come controllo, col plasmide pFL39, ottenendo i ceppi DYY-4C/pFL38MIP1/pFL39MIP1, DYY-4C/pFL38MIP1/pFL39mip1^{G224A}, DYY-4C/pFL38MIP1/pFL39mip1^{Y757C} e DYY-4C/pFL38MIP1/pFL39. Come per i corrispettivi ceppi DWM-5A, è stata indotta la perdita del plasmide pFL38MIP1, ottenendo i ceppi DYY-4C/pFL39MIP1, DYY-4C/pFL39mip1^{G224A}, DYY-4C/pFL39mip1^{Y757C} e DYY-4CpFL39. In primo luogo è stato osservato che tutte le colonie del ceppo DYY-4C/pFL39mip1^{Y757C} erano *petite*, da cui è emerso che l'attività della polimerasi Mip1^{Y757C} non era sufficiente a replicare l'mtDNA neanche in presenza di un aumento del *pool* nucleotidico.

Sui ceppi DYY-4C/pFL39MIP1 DYY-4C/pFL39mip1^{G224A} sono state determinate le frequenze dei *petite* e dei ρ^0 a 36°C, riportate in allegato 1, tabella 1 e figura 4 A. Come mostrato, si osserva nuovamente una riduzione della frequenza dei *petite* e dei ρ^0 , del tutto paragonabile a quella ottenuta per i ceppi che overesprimevano *RNR1*.

L'analisi sui ceppi eteroallelici è stata ottenuta utilizzando il ceppo DYY ($MIP1/\Delta mip1 \Delta sml1/\Delta sml1$) trasformato con i plasmidi pFL38 recanti i diversi alleli *mip1* e il plasmide vuoto. La frequenza dei *petite* a 36°C, riportata in allegato 1, figura 4 B, è risultata essere paragonabile a quella ottenuta per i ceppi diploidi overesprimenti *RNR1*. Un'eccezione è costituita dal ceppo recante l'allele *mip1*^{Y757C}, che, in presenza della delezione del gene *SML1*, presenta una riduzione doppia rispetto a quella ottenuta con l'overespressione di *RNR1*. Anche la frequenza dei ρ^0 , condotta nel ceppo aploide YO81-5D ($MIP1 \Delta sml1$), non ha mostrato differenze rispetto ai ceppi W303-1B overesprimenti *RNR1*.

Sui ceppi deleti in *SML1* è stata anche determinata la frequenza dei mutanti Ery^R. Come è possibile osservato in allegato 1, tabella 2, la delezione del gene *SML1* non riduceva la frequenza dei mutanti Ery^R. L'unica eccezione è rappresentata dal ceppo DYY recante l'allele *mip1*^{Y757C}, per il quale si osserva una riduzione di circa due volte della mutabilità puntiforme.

4.7 Rescue chimico del fenotipo: trattamento con l'antiossidante acido diidrolipoico

E' noto che il DNA mitocondriale è soggetto all'azione di agenti ossidanti, in particolare specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali l'acqua ossigenata, l'anione superossido e il radicale ossidrilico che si formano come prodotti della riduzione parziale dell'ossigeno durante la respirazione a livello della membrana interna. Il DNA mitocondriale, essendo attaccato alla membrana interna tramite proteine del nucleotide, è molto vulnerabile all'azione dei ROS,

come sottolineato nell'introduzione. In particolare, danni ossidativi sull'mtDNA hanno come conseguenza finale riarrangiamenti dell'mtDNA o la perdita dell'mtDNA (reviewed in Stuart and Brown, 2006). Per valutare se l'incremento delle delezioni dell'mtDNA in presenza degli alleli mutati *mip1* fosse in parte dovuta all'azione dei ROS, ceppi aploidi e diploidi contenenti i vari alleli sono stati trattati con l'acido diidrolipoico. L'acido diidrolipoico è uno *scavenger* dei ROS, è in grado cioè di ridurre, ossidandosi, le specie reattive a specie ridotte non tossiche.

L'acido diidrolipoico è formato da una catena di otto atomi di carbonio, fra cui il carbonio 6 e 8 legano gruppi tiolici. L'acido diidrolipoico è coinvolto in processi di ossidoriduzione. Infatti i gruppi tiolici dell'acido diidrolipoico, donando due elettroni e due protoni, possono ossidarsi formando un legame disolfuro e di conseguenza un anello a cinque termini chiamato anello ditiolato. La forma ossidata dell'acido diidrolipoico è chiamata acido α -lipoico, o acido lipoico (figura 4.11).

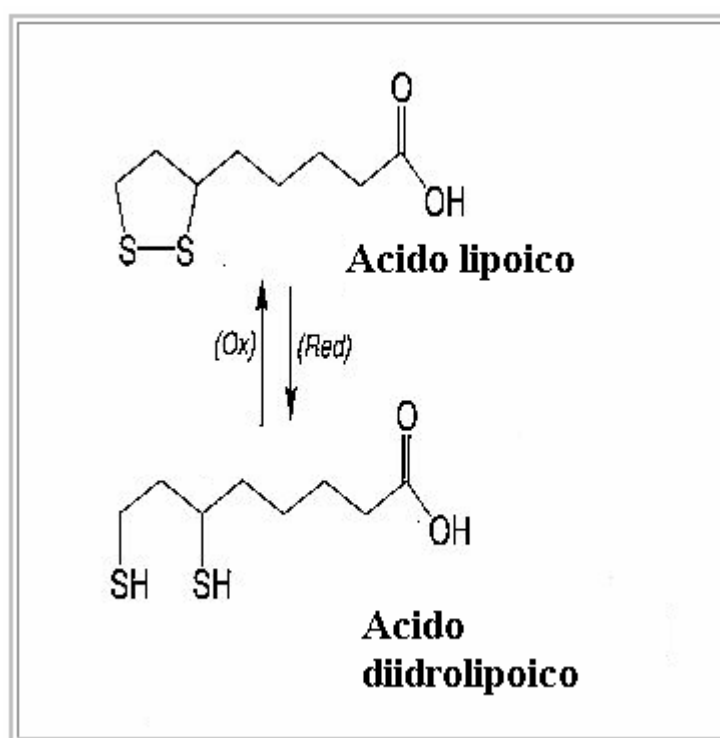


Figura 4. 11: struttura dell'acido lipoico e diidrolipoico.

Il processo è ciclico, infatti, in presenza di un agente meno ossidante, l'acido lipoico può ossidare il composto accettando due atomi di idrogeno, e ritornare alla forma ridotta acido diidrolipoico. Come *scavenger* dei ROS, l'acido diidrolipoico può ridurre diverse specie radicaliche, fra cui radicali perossidi, idrossilici, superossidi e idroperossidi.

Per testare la capacità dell'acido diidrolipoico di ridurre la mutabilità *petite*, durante la crescita per 15 generazioni in terreno SC addizionato di glucosio 2%, i vari ceppi recanti gli alleli mutati *mip1* sono stati trattati con acido diidrolipoico 30 μ M.

Nei ceppi aploidi, si è osservato che la presenza di acido diidrolipoico riduceva di circa 6 volte la frequenza di *petite* nel ceppo recante l'allele mutato *mip1*^{G224A}. Anche nel ceppo

recante l'allele selvatico si osservava una riduzione della frequenza di *petite*, ma soltanto di circa 3 volte (allegato 1, figura 5 A).

Anche nei ceppi diploidi si osservava, in tutti i casi, una riduzione della frequenza dei *petite*. La riduzione maggiore, pari a circa 6 volte, si osservava per il ceppo recante l'allele *mip1*^{Y757C}.

4.8 Discussione

Nel presente lavoro sono state introdotte in *MIP1* due mutazioni equivalenti a mutazioni patologiche in POLG causanti forme di PEO.

La mutazione G224A equivale alla mutazione umana G268A. L'allele G268A è stato trovato per la prima volta in un soggetto omozigote per questo allele, che presentava un fenotipo caratterizzato da PEO con retinopatia pigmentosa e amenorrea, e da delezioni multiple e mutazioni puntiformi nell'mtDNA (Del Bo *et al.*, 2003). Nei fibroblasti isolati dal paziente si riscontrava un numero di mutazioni puntiformi significativamente più alto sia nel D-loop che nelle regioni codificanti dell'mtDNA. Il carico di mutazioni inoltre era superiore non solo ai controlli recanti un allele selvatico, ma anche a cellule di pazienti recanti mutazioni nel dominio polimerasico di Polg. Sulla base di questa osservazione i ricercatori concludevano che, almeno per mutazioni nel dominio esonucleasico, riarrangiamenti e delezioni dell'mtDNA erano mediati da un incremento di mutazioni puntiformi, secondo il modello dello *strand slippage* descritto nell'introduzione (Ponamarev *et al.*, 2002). Il soggetto era omozigote per l'allele G268A, facendo supporre che la mutazione fosse recessiva, sebbene non ve ne fosse la certezza visto che non era disponibile la storia familiare del paziente. Inoltre tale mutazione è stata osservata in un paziente, con PEO sporadica, eterozigote G268A/A467T, facendo supporre nuovamente che la mutazione fosse recessiva (Di Fonzo *et al.*, 2003). Infine, la mutazione è stata identificata in un paziente affetto da PEO, che, contrariamente ai casi precedenti, era caratterizzato dalla presenza della mutazione G268A in eterozigoti senza altre mutazioni (Gonzalez-Vioque *et al.*, 2006).

Dal nostro studio emerge chiaramente che la sostituzione equivalente in *MIP1*, G224A, incrementa sia la frequenza di delezioni sia la frequenza di mutazioni puntiformi dell'mtDNA. In particolare si osserva un aumento della frequenza di mutanti Ery^R rispetto al wt di circa 10 volte. Questo incremento può essere attribuito a una ridotta attività esonucleasica della polimerasi Mip1^{G224A}. In primo luogo la mutazione cade in uno *stretch* molto conservato del dominio esonucleasico, il motivo ExoII. Questo motivo è presente e conservato anche negli altri membri della classe A delle polimerasi, come ad esempio la polimerasi I di *E. coli*. In secondo luogo, la sostituzione G224D è stata identificata come mutazione che conferisce un fenotipo alto mutatore, incrementando la frequenza di mutanti Ery^R di circa 270 volte (Hu *et al.*, 1995).

Alla mutazione G224A è associato inoltre un incremento di circa 2,5 volte della frequenza di mutanti *petite* sia a 28°C che a 36°C, cui peraltro non è associato un incremento della perdita dell'mtDNA. Sulla base di precedenti osservazioni, è possibile ipotizzare che l'accumulo di

delezioni sia mediato dall'incremento delle mutazioni puntiformi, in accordo con il modello dello *strand slippag*, come precedentemente ipotizzato. Questa ipotesi è però contrastata dal fatto che un incremento del *pool* nucleotidico riduce in maniera altamente significativa l'accumulo di delezioni mentre non riduce la frequenza di mutazioni puntiformi. I nostri risultati pertanto sono in accordo con i dati di Wanrooij e collaboratori che mostrano chiaramente che non vi è correlazione fra mutazioni puntiformi e delezioni, ma che piuttosto le delezioni siano mediate da altri meccanismi, quali ad esempio uno stallo della polimerasi durante la replicazione (Wanrooij *et al.* 2004).

Le delezioni indotte dalla presenza della mutazione G224A sono ridotte sia da un incremento dei dNTP *pool* che dal trattamento con l'antiossidante acido diidrolipoico. Nel primo caso, la riduzione delle delezioni può essere interpretato come un aumento dell'attività cinetica, cioè della velocità con cui la polimerasi catalizza l'allungamento del DNA, dovuto ad un aumento del suo substrato. Il trattamento con acido diidrolipoico riduce di circa 6 volte la frequenza dei mutanti *petite*, contro le circa 3 volte in presenza dell'allele *MIP1* selvatico, mostrando come il danno ossidativo sia importante nella comparsa di delezioni.

La mutazione G224A è recessiva, per quanto concerne sia la mutabilità puntiforme che quella estesa. In particolare le frequenze dei mutanti nel diploide eteroallelico *MIP1/mip1*^{G224A} risultano uguali a quelle del diploide omoallelico *MIP1/MIP1* e inferiori a quello del diploide *MIP1/Δmip1*. La ridotta frequenza dei mutanti *petite* rispetto al ceppo emizigote dimostra come la polimerasi mutata Mip1^{G224A} mantenga gran parte della sua attività. La frequenza ridotta dei mutanti Ery^R è indicativa di una complementazione ad opera dell'allele selvatico ed è dovuto probabilmente alla capacità della polimerasi selvatica di correggere gli errori non corretti dalla polimerasi mutata.

La mutazione Y757C equivale alla mutazione umana Y955C, cui è associato il fenotipo più grave di PEO autosomica dominante. La mutazione Y955C è stata la prima mutazione in POLG identificata come causa di patologie mitocondriali (Van Goethem *et al.*, 2001). Successivamente è stata identificata in cinque famiglie i cui soggetti presentavano un grave fenotipo di adPEO (Lamantea *et al.*, 2002). Studi recenti hanno dimostrato che la mutazione Y955C è associata ad altre patologie, fra cui PEO associata a parkinsonismo, menopausa prematura e ipogonadismo in quattro famiglie di diversa origine (Luoma *et al.*, 2006; Melberg *et al.*, 2005; Pagnamenta *et al.*, 2006).

Sono stati condotti diversi esperimenti per chiarire i meccanismi attraverso cui agisce la mutazione Y955C, sia *in silico* sia *in vitro* sia *in vivo*, come già riportato nell'introduzione. Il residuo Y955 è situato nel motivo PolB e studi di *modeling* hanno dimostrato come questa regione formi una tasca idrofobica a livello della quale avviene il riconoscimento e il legame del dNTP entrante (Ponamarev *et al.*, 2002; Graziewicz *et al.*, 2004). I risultati degli studi *in vitro* sono già stati discussi nell'introduzione (Ponamarev *et al.*, 2002; Graziewicz *et al.*, 2004). I nostri risultati, in accordo con quelli di Stuart *et al.*, 2006 hanno dimostrato chiaramente che la mutazione Y757C in Mip1 è incompatibile con una corretta replicazione dell'mtDNA: la presenza della sola polimerasi Mip1^{Y757C} determina infatti la deplezione

totale dell'mtDNA. Questo risultato non è sorprendente vista la ridotta attività catalitica della polimerasi umana mutata. Ovviamente la perdita totale dell'mtDNA impedisce ogni ulteriore analisi sugli effetti della mutazione in un contesto aploide. Gli effetti della mutazione sono stati pertanto studiati in un contesto eteroallelico, da cui è emerso chiaramente come la mutazione sia dominante, per quanto concerne sia la frequenza di delezioni e la perdita di mtDNA, sia la frequenza di mutazioni puntiformi.

In primo luogo, il diploide eteroallelico *MIP1/mip1*^{Y757C} mostra un incremento di circa 12 volte della mutabilità Ery^R rispetto al diploide selvatico e di circa 3 volte rispetto al diploide emizigote. Sulla base delle osservazioni precedenti, questo incremento è dovuto probabilmente ad un effetto diretto. La polimerasi mutata, pur avendo un'attività ridotta, potrebbe inserire nucleotidi sbagliati, incrementando così la frequenza delle sostituzioni. In particolare, l'incremento potrebbe essere così elevato da non essere complementato, come per la polimerasi Mip1^{G224A}, dalla polimerasi selvatica, spiegando così la dominanza del fenotipo. Le mutazioni potrebbero essere però dovute anche ad un effetto indiretto causato da danni ossidativi. Stuart *et al.*, 2006 hanno infatti osservato in lievito che la mutazione Y757C determina in eterozigosi un forte incremento del danno ossidativo sull'mtDNA. Inoltre, utilizzando il topo come sistema modello, è stato dimostrato che la polimerasi recante la mutazione Y955C determina un incremento di tre volte del contenuto di 8-oxodeossiguanidina (8-oxo-dG) nell'mtDNA (Lewis *et al.*, 2007). Danni ossidativi sul DNA vengono spesso convertiti in mutazioni puntiformi dai processi di riparazione *error prone*. Inoltre è stato recentemente dimostrato che la polimerasi recante la mutazione Y955C incrementa *in vitro* l'incorporazione di 8-oxo-dG nell'mtDNA, nonché l'appaiamento a residui di 8-oxo-dG presenti nel template di adenosina, mediante appaiamento di tipo Hogsteen (Graziewicz *et al.*, 2007).

In secondo luogo il diploide eteroallelico mostra un incremento della frequenza di *petite* di circa 9 e 22 volte, rispettivamente a 28°C e a 36°C. Diversi meccanismi possono spiegare l'incremento di delezioni. Le delezioni potrebbero essere mediate da mutazioni puntiformi. Questo meccanismo sembra però improbabile in quanto la delezione di *SML1* nel diploide eteroallelico riduce di due volte la frequenza di mutanti Ery^R ma di 8 volte della frequenza di mutanti *petite*. Come ipotizzato da Graziewicz *et al.*, 2004, è probabile che l'incremento di delezioni sia mediato da uno stallo della replicazione in corrispondenza della forza replicativa, dovuto a sua volta alla forte riduzione dell'attività catalitica della polimerasi. Lo stallo potrebbe determinare un incremento di delezioni e anche della perdita di mtDNA attraverso diversi meccanismi. Lo stallo della replicazione:

- potrebbe determinare un'interruzione prematura della replicazione, che potrebbe promuovere una ricombinazione intramolecolare illegittima attraverso *strand invasion*, che porterebbe alla formazione di molecole delete.
- potrebbe lasciare il DNA per maggiore tempo a singolo filamento in corrispondenza della forza di replicazione. E' noto che il DNA a singolo filamento è soggetto a danni ossidativi indotti dai ROS 1000 volte di più rispetto al DNA a doppio filamento (Frederico *et al.*, 1990). E' noto inoltre che l'accumulo di basi ossidate porta ad un

incremento del danno esteso del DNA, quale riarrangiamenti e delezioni, che culmina nella perdita dell'mtDNA (Wallace, 2001; Wei and Lee, 2002; Wallace, 2005; Doudican *et al.*, 2005; Van Houten *et al.*, 2006). Un coinvolgimento del danno ossidativo ad opera dei ROS sembra essere confermato dalla riduzione di circa 8 volte della frequenza dei *petite* in presenza dell'antiossidante acido diidrolipoico.

- potrebbe indurre la formazione di rotture a doppio filamento sul DNA. E' stato infatti dimostrato che ad uno stallo della replicazione del DNA possono seguire rotture a doppio filamento (Michel *et al.*, 1997; Lewis and Resnick, 2000). Meccanismi di riparazione per ricombinazione potrebbero a loro volta portare a delezioni dell'mtDNA. A conferma di questa ipotesi vi è l'osservazione che diversi pazienti con PEO dovuta a mutazioni in POLG posseggono DNA spontaneamente linearizzato (Van Goethem *et al.*, 1997).

A conferma dell'ipotesi dello stallo vi è l'osservazione che l'incremento dei dNTP *pool* riduce la frequenza dei *petite*, probabilmente aumentando la velocità di replicazione ad opera della polimerasi.

La mutabilità estesa, così come quella puntiforme, è inoltre dominante. La dominanza può essere spiegata col fatto che la polimerasi mutata si legghi al DNA templatato determinando uno stallo e impedendo che si possa legare la polimerasi selvatica, ipotesi supportata dall'osservazione che la polimerasi umana Y955C mostra una costante di dissociazione per il DNA templatato molto simile a quella della polimerasi wt, per cui le due polimerasi possono competere per il legame col substrato.

In terzo luogo il diploide eteroallelico mostra un incremento della frequenza dei rho⁰, dunque della perdita dell'mtDNA. Sebbene nei soggetti affetti da adPEO non si osservi una riduzione sostanziale dell'mtDNA, uno studio recente su topi recanti l'allele mutato Y955C mostra una riduzione dell'mtDNA *copy number*, in accordo con i nostri risultati (Lewis *et al.*, 2007).

E' noto che il *pool* nucleotidico influenza la stabilità dell'mtDNA: mutazioni che riducono il *pool* nucleotidico determinano una maggiore instabilità dell'mtDNA, sia nell'uomo che nel lievito (Saada, 2004; O'Rourke *et al.*, 2005). Come riportato nell'introduzione, lo step che limita la sintesi dei dNTP è costituito dalla reazione catalizzata dalla ribonucleotide reduttasi. La subunità catalitica della ribonucleotide reduttasi è codificata dal gene *RNR1* e la sua attività è finemente regolata, attraverso diversi meccanismi, durante il ciclo di replicazione di *S. cerevisiae*. (Lowdon and Vitols, 1973; Elledge and Davis, 1990; reviewed in Nordlund and Reichard, 2006). L'attività codificata dal gene *RNR1* influenza notevolmente la stabilità del DNA mitocondriale. Infatti è stato osservato che mutazioni in *RNR1* aumentano la frequenza di *petite* e l'overespressione di *RNR1* diminuisce la frequenza di *petite* e aumenta il numero di copie di mtDNA (O'Rourke *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2005). *RNR1* è inoltre stato identificato come soppressore multicopia di mutazioni *mip1*, in grado di ripristinare la crescita dei mutanti termosensibili a 37°C (Lecrenier and Foury, 1995).

L'attività di Rnr1 è influenzata dalla proteina Sml1, una proteina che legandosi a Rnr1 inibisce l'attività della ribonucleotide reduttasi (Zhao *et al.*, 1998; Chabes and *al.*, 1999). La

delezione di *SML1* ha effetti simili all'overespressione di *RNR1* sulla stabilità mitocondriale: diminuisce la frequenza di *petite*, incrementa il numero di copie dell'mtDNA e complementa il fenotipo termosensibile della mutazione *mip1-1* (Taylor *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 1998).

Abbiamo analizzato se un incremento dei dNTP potesse ridurre la frequenza dei *petite* e dei rho⁰ indotta dalle mutazioni patologiche studiate. A tal fine i ceppi aploidi e diploidi recanti le mutazioni in *mip1* sono stati dapprima trasformati con *RNR1* in multicopia. L'overespressione riduceva la frequenza dei *petite* e dei rho⁰ sia in presenza della mutazione G224A sia in presenza della mutazione Y757C in eterozigosi. Gli stessi effetti si ottenevano mediante la delezione di *SML1*. E' probabile che la riduzione della frequenza dei *petite* sia dovuta ad un incremento dell'attività delle polimerasi mutate che, in presenza di una maggiore concentrazione di dNTP, catalizzano la sintesi del DNA con una maggiore velocità. Nel caso della mutazione Y757C, è noto che, nella polimerasi umana la mutazione equivalente riduce l'affinità per il nucleotide entrante di 45 volte. Una ridotta affinità potrebbe determinare uno stallo della replicazione soprattutto in regioni ricche di uno stesso nucleotide, ad esempio omopolimeriche. In questo caso si potrebbe avere una carenza del nucleotide complementare, che renderebbe impossibile per una polimerasi difettosa l'inserimento del successivo nucleotide e che determinerebbe un blocco totale della replicazione. Prevenendo lo stallo della replicazione, un incremento dei dNTP potrebbe diminuire la frequenza dei riarrangiamenti e la conseguente frequenza di mutanti *petite*. Non è comunque escluso che un incremento dei dNTP, anziché agire direttamente sul processo di polimerizzazione, incrementi l'efficienza degli eventi di riparazione del DNA, che sono noti essere importanti per il mantenimento del DNA mitocondriale (reviewed in Contamine and Picard, 2000).

Abbiamo osservato che la delezione di *SML1* determina la riduzione della frequenza di mutazioni estese ma non della frequenza di mutazioni puntiformi (eccetto una blanda riduzione registrata nel diploide eteroallelico *MIP1/mip1*^{Y757C}). Questo risultato porta a concludere che riarrangiamenti, delezioni e deplezione dell'mtDNA non siano correlate ad un aumento della frequenza di mutazioni puntiformi. I nostri risultati giungono alle medesime conclusioni di studi precedenti e confermano che i meccanismi che inducono delezioni dell'mtDNA sono diversi, almeno per le due mutazioni studiate, da quelli che inducono l'incremento di mutazioni puntiformi (Wanrooij *et al.*, 2004; Kollberg *et al.*, 2005).

Infine, mediante l'uso di acido diidrolipoico, uno scavenger dei ROS, è stato chiaramente dimostrato come nell'insorgenza di delezioni e nella deplezione dell'mtDNA abbia un ruolo il danno ossidativo ad opera di agenti ossidanti. In particolare il trattamento con acido diidrolipoico riduce la frequenza di *petite* di circa 6 volte nell'aploide *mip1*^{G224A} e di circa 8 volte nel diploide *MIP1/mip1*^{Y757C}.

L'overespressione di *RNR1* e il trattamento con acido diidrolipoico non solo ha permesso di chiarire alcuni meccanismi con cui agiscono le polimerasi mutate, ma apre anche la strada ad un possibile trattamento dei soggetti affetti da PEO con sostanze in grado di ridurre l'accumulo di delezioni.

5. Risultati (II parte):

Difetti del DNA mitocondriale di *Saccharomyces cerevisiae* causati da interazioni funzionali tra mutazioni nella DNA polimerasi γ associate a malattie mitocondriali umane*

*I risultati discussi in questa sezione sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

Baruffini E., Ferrero I. and Foury F. (2007). Mitochondrial DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* caused by functional interactions between DNA polymerase gamma mutations associated with disease in human. *Biochim Biophys Acta*. **1772**, 1225-1235.
La pubblicazione è riportata come allegato 2.

5.1 Scelta delle mutazioni

Sebbene alcuni pazienti presentino una sola mutazione in un allele POLG (tipicamente i pazienti affetti da adPEO), in molti pazienti uno o entrambi gli alleli presentano due mutazioni, per cui è difficile determinare se solo una delle mutazioni sia responsabile del fenotipo patologico oppure se entrambe diano un contributo. Scopo di questa analisi è determinare quale sia il contributo al fenotipo patologico di due mutazioni normalmente associate.

Le mutazioni sono state scelte in base ai seguenti parametri:

- 1) conservazione del residuo nelle polimerasi di diversi organismi (POLG umana e *MIP1* sono state allineate con geni codificanti la polimerasi mitocondriale di diversi organismi, allegato 2, figura 1);
- 2) associazione, *in cis* o *in trans*, con altre mutazioni;
- 3) localizzazione della mutazione nel dominio polimerasico.

Sulla base di queste caratteristiche, sono state scelte cinque mutazioni. Il fenotipo patologico associato a queste mutazioni è riassunto in allegato 2, tabella 1. Le caratteristiche delle varie mutazioni sono state descritte nell'introduzione. Di particolare interesse è la mutazione E1143G, classificata in banche dati come SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) presente nel 2-4% della popolazione caucasica. Sebbene soggetti omozigoti per lo SNP E1143G siano sani, sulla base di diverse osservazioni, riportate nell'introduzione, è stato ipotizzato, e dimostrato *in vitro*, che lo SNP E1143G non sia neutrale, ma si comporti come modificatore fenotipico di mutazioni *in cis* o *in trans*.

Le mutazioni G848S, A889T, H932Y, G1051R e E1143G di POLG equivalgono, in *MIP1*, alle mutazioni G651S, A692T, H734Y, G807R e E900G. Le mutazioni in *MIP1* sono state studiate singolarmente e in associazione come osservato nei pazienti, per determinare il contributo di ogni mutazione al fenotipo. In particolare le mutazioni H734Y e G807R, e le mutazioni G651S e E900G, sono state studiate *in trans*. Le mutazioni A692T e E900G sono state studiate *in cis*.

5.2 Costruzione degli alleli *mip1* mutati e loro introduzione in *Saccharomyces cerevisiae*

I vari alleli mutati sono stati ottenuti mediante mutagenesi sito-specifica, utilizzando la tecnica della *overlapping* PCR descritta nei dettagli in Materiali e metodi e schematizzata nella figura 5.1.

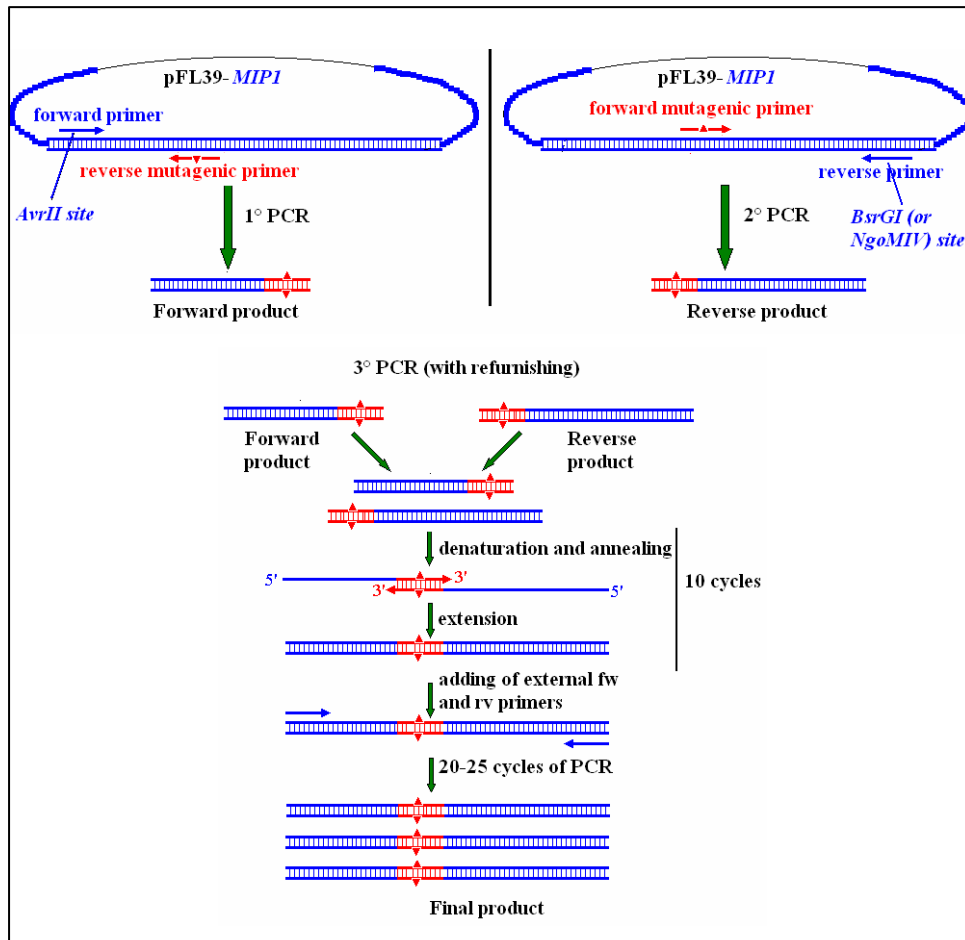


Figura 5. 1: Schema della *overlapping PCR*. La tecnica si basa sull'utilizzo di tre reazioni di PCR. Nella prima reazione viene amplificato un frammento di gene mediante un primer *forward* e un primer mutagenico *reverse*. Nella seconda PCR si amplifica un altro frammento di gene utilizzando un primer mutagenico *forward* e un primer *reverse*. I due primer mutagenici sono complementari l'uno all'altro, in modo tale che i due frammenti abbiano in comune una regione alle estremità. La terza PCR si basa sull'utilizzo, sia come template che come primer, dei due amplificati precedenti. Poiché i due amplificati hanno una regione in comune, dopo denaturazione, l'estremità di un filamento di un amplificato si appaierà all'estremità di un filamento dell'altro amplificato, e fungerà da primer per la sintesi dell'amplificato finale.

Mediante mutagenesi sito-specifica sono stati ottenuti i plasmidi pFL39*mip1*^{G651S}, *mip1*^{A692T}, *mip1*^{H734Y}, *mip1*^{G807R}, *mip1*^{E900G} e pFL39*mip1*^{A692T-E900G}.

I plasmidi pFL39*mip1* sono stati inseriti nel ceppo DWM-5A/pFL38MIP1 e, attraverso il *plasmid shuffling*, il plasmide pFL38MIP1 è stato perso, ottenendo i ceppi DWM-5A/pFL39*mip1*^{G651S}, DWM-5A/pFL39*mip1*^{A692T}, DWM-5A/pFL39*mip1*^{H734Y}, DWM-5A/pFL39*mip1*^{G807R}, DWM-5A/pFL39*mip1*^{E900G} e DWM-5A/pFL39*mip1*^{A692T-E900G}. Inoltre sono stati ottenuti i rispettivi ceppi contenenti anche il plasmide pFL38MIP1 utilizzati per studiare la dominanza/recessività.

Lo studio degli effetti di due mutazioni *in trans* è stato studiato sia nel ceppo DWM-5A che nel ceppo diploide DMM/pFL38MIP1 ($\Delta mip1 \Delta mip1$). Il ceppo DMM è stato ottenuto mediante incrocio del ceppo DWM-5A/pFL38MIP1 ($\Delta mip1$) col ceppo DWM-1A ($\Delta mip1$). Dapprima DMM/pFL38MIP1 è stato trasformato con i vari plasmidi pFL39*mip1*, ottenendo ceppi anch'essi utilizzati per studiare la dominanza/recessività. Successivamente, mediante

plasmid shuffling, è stato rimosso il plasmide pFL38MIP1. I diversi alleli sono stati clonati anche in pFL38, ottenendo i plasmidi pFL38mip1, con cui sono stati trasformati i vari ceppi DMM/pFL39mip1. In questo modo sono stati ottenuti i ceppi DMM/pFL39mip1^{G651S}/pFL38mip1^{G651S}, DMM/pFL39mip1^{H734Y}/pFL38mip1^{H734Y}, DMM/pFL39mip1^{G807R}/pFL38mip1^{H734Y}, DMM/pFL39mip1^{G807R}/pFL38mip1^{G807R}, DMM/pFL39mip1^{E900G}/pFL38mip1^{G651S} e DMM/pFL39mip1^{E900G}/pFL38mip1^{E900G}.

5.2.1 Stima del numero di copie dei plasmidi pFL39mip1

Dapprima è stato determinato il numero di copie dei plasmidi pFL39mip1 nei ceppi DWM-5A, per valutare se effettivamente il numero di copie sia prossimo a uno e che dunque i livelli di Mip1 non siano influenzati da un maggior numero di copie del gene. Per determinare il numero di copie plasmidiche, è stata condotta sul DNA totale estratto dai ceppi DWM-5A un'analisi *Southern*, utilizzando come riferimento il DNA genomico.

Come sonda è stato utilizzato il gene *TRP1*, che, in seguito a digestione del DNA totale con *EcoRI*, ibridizza con un frammento genomico di circa 1200 bp e con una banda plasmidica di circa 4700 bp, pari alla lunghezza di pFL39 più un frammento di *mip1*. Il plasmide vuoto pFL39 produce una banda linearizzata di circa 4300 bp. L'analisi *Southern* è stata eseguita in doppio, e i risultati sono riportati in allegato 2, figura 2. La quantificazione deriva dalla media dei rapporti, per ciascun *Southern*, del segnale del DNA plasmidico rispetto al segnale del DNA genomico. Tutti i valori sono leggermente superiori a uno, come atteso visto che mediamente pFL39 è presente in una cellula in 1-2 copie. I valori risultano inoltre simili fra loro. I valori più alti non sono significativamente differenti, poiché la deviazione standard risulta pari a 0,3. Da questa analisi emerge che i risultati, in particolare i valori delle frequenze dei mutanti rispetto al wt, non sono influenzati dal numero di copie effettive del plasmide in cui sono stati clonati gli alleli mutati *mip1*.

5.3 Effetto delle mutazioni *mip1*

5.3.1 Crescita su fonti respirabili

Dapprima è stata saggiata la capacità di crescere su fonti ossidabili dei ceppi DWM-5A trasformati con i vari alleli *mip1*, a 28°C e 36°C. La crescita è stata misurata su terreno SC addizionato di etanolo 2% a 28°C e su terreno YPE addizionato di etanolo 2% a 36°C. Le crescite sono riportate in allegato 2, figure 3 A e 3 B. Il ceppo *mip1*^{G651S} è incapace di crescere su etanolo, indicando che il ceppo è respiratorio deficiente. I ceppi *mip1*^{G807R} e *mip1*^{E900G} non mostrano alcun difetto di crescita rispetto al ceppo *MIP1* a 28°C, mentre la crescita è ridotta per i ceppi *mip1*^{A692T} e *mip1*^{H734Y}. Inoltre si nota come la crescita del ceppo *mip1*^{A692T-E900G} sia inferiore rispetto alla crescita del ceppo *mip1*^{A692T}, suggerendo che la mutazione E900G non sia neutrale. A 36°C la crescita di tutti i ceppi mutanti risulta inferiore rispetto alla crescita del ceppo wt, indicando che ad alte temperature il fenotipo di crescita è notevolmente influenzato dalla presenza di mutazioni in *MIP1*.

5.3.2 Determinazione della frequenza e della natura dei *petite*

Come per le mutazioni studiate nel capitolo precedente, è stata determinata la frequenza e la natura dei *petite* per i ceppi DWM-5A trasformati con gli alleli mutanti (allegato 2, tabella 2). A 28°C tutti gli alleli mutanti aumentano la frequenza dei *petite*, sebbene in misura diversa. In particolare la mutazione G651S impedisce una corretta replicazione dell'mtDNA, poiché tutte le cellule sono *petite*. La mutazione E900G non risulta neutrale, in quanto determina un aumento di circa due volte della frequenza dei *petite*. Inoltre, come osservato già per la crescita su fonti respirabili, la mutazione E900G si comporta come modificatore fenotipico della mutazione A692T *in cis*, incrementando l'accumulo di *petite* da circa l'80% a circa il 97%. A 36°C la frequenza dei *petite* è ulteriormente incrementata, suggerendo che le polimerasi mutate, in particolare la mutazione G807R e E900G, siano termosensibili.

Per quanto concerne la natura dei *petite* tutte le mutazioni incrementano la frequenza dei ρ^0 , sia a 28°C che a 36°C. Inoltre si osserva come la frequenza dei ρ^0 sia proporzionale alla frequenza dei *petite*, suggerendo che mutazioni in *MIP1* che determinano un aumento delle delezioni dell'mtDNA incrementino anche la perdita dell'mtDNA.

5.3.3 Determinazione della mutabilità puntiforme

Mediante valutazione dei cloni resistenti a eritromicina, è stata determinata la frequenza delle mutazioni puntiformi dell'mtDNA. Come si osserva in allegato 2, tabella 2, tutti gli alleli mutanti *mip1* incrementano la frequenza dei mutanti Ery^R, da circa 2 volte per la mutazione E900G a circa 10 volte per la mutazione G807R. E' interessante notare inoltre che la frequenza dei mutanti Ery^R non è proporzionale alla frequenza dei *petite*. Ad esempio nel caso della mutazione G807R, a fronte di un moderato aumento dei *petite* a 28°C, si osserva un forte incremento di mutanti Ery^R. Inoltre la mutazione E900G non aumenta ulteriormente la frequenza dei mutanti Ery^R quando associata alla mutazione A692T.

5.4 Determinazione della dominanza/ recessività

La dominanza delle mutazioni è stata determinata valutando la frequenza di insorgenza di cloni *petite* in ceppi aploidi (DWM-5A) e diploidi (DMM) trasformati con l'allele *MIP1* su pFL38 e con l'allele *mip1* mutato su pFL39. Le frequenze dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A e nei ceppi diploidi DMM sono riportate nella tabella 5.1 e 5.2 rispettivamente.

Ceppo DWM-5A	28°C	
	% <i>petites</i>	% rho ⁰
<i>MIP1/MIP1</i>	1.0 ± 0.1	11
<i>MIP1/pFL39</i>	2.7 ± 0.3	24
<i>MIP1/mip1</i> ^{G651S}	2.4 ± 0.3	22
<i>MIP1/mip1</i> ^{A692T}	3.8 ± 0.4	21
<i>MIP1/mip1</i> ^{H734Y}	6.7 ± 0.7	22
<i>MIP1/mip1</i> ^{G807R}	1.7 ± 0.3	21
<i>MIP1/mip1</i> ^{E900G}	1.1 ± 0.1	12
<i>MIP1/mip1</i> ^{A692T-E900G}	3.6 ± 0.3	21

Tabella 5. 1: Frequenza dei mutanti *petite* e dei mutanti rho⁰ fra i *petite* nei ceppi eteroallelici DWM-5A.

Ceppo DMM	28°C
	% <i>petites</i>
<i>MIP1/MIP1</i>	0,8 ± 0,1
<i>MIP1/pFL39</i>	2,1 ± 0,1
<i>MIP1/mip1</i> ^{G651S}	1,8 ± 0,2
<i>MIP1/mip1</i> ^{A692T}	2,6 ± 0,1
<i>MIP1/mip1</i> ^{H734Y}	7,4 ± 0,9
<i>MIP1/mip1</i> ^{G807R}	1,6 ± 0,1
<i>MIP1/mip1</i> ^{E900G}	0,8 ± 0,1
<i>MIP1/mip1</i> ^{A692T-E900G}	2,5 ± 0,1

Tabella 5. 2: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi eteroallelici DMM.

La mutazione E900G risulta recessiva, poiché la frequenza dei *petite* e dei rho⁰ risulta simile alla frequenza osservata nel ceppo contenente i due alleli selvatici *MIP1*. Questo suggerisce che la polimerasi Mip1^{E900G} mantenga gran parte della sua attività. La frequenza dei *petite* del ceppo eteroallelico contenente la mutazione G807R è intermedia fra quella del ceppo contenente due copie di *MIP1* e quello contenente una copia. Il ceppo contenente la mutazione G651S mostra la stessa frequenza di *petite* del ceppo contenente un solo allele *MIP1*, suggerendo che *mip1*^{G651S} si comporti come un allele nullo. La mutazione A692T risulta invece debolmente dominante, poiché la frequenza è leggermente, ma significativamente, superiore alla frequenza di un ceppo contenente una sola copia di *MIP1*. La presenza della mutazione E900G non altera la dominanza della mutazione. Infine la mutazione H734Y risulta dominante.

La frequenza dei mutanti Ery^R è stata determinata nei ceppi DWM-5A (tabella 5.3).

Ceppo DWM-5A	Frequenza Ery ^R	
	Ery ^R (x 10 ⁸)	Incremento
<i>MIP1/MIP1</i>	2.2 ± 0.4	1.0
<i>MIP1/pFL39</i>	8.0 ± 0.8	3.6
<i>MIP1/mip1^{G651S}</i>	2.7 ± 0.6	1.2
<i>MIP1/mip1^{A692T}</i>	4.0 ± 0.9	1.8
<i>MIP1/mip1^{H734Y}</i>	3.5 ± 0.3	1.6
<i>MIP1/mip1^{G807R}</i>	6.2 ± 0.5	2.8
<i>MIP1/mip1^{E900G}</i>	3.1 ± 0.7	1.4
<i>MIP1/mip1^{A692T-E900G}</i>	3.9 ± 0.5	1.8

Tabella 5. 3: Frequenza dei mutanti Ery^R fra i *petite* nei ceppi eteroallelici DWM-5A.

Tutti i ceppi eteroallelici mostrano una frequenza di mutanti *petite* compresa fra la frequenza osservata in ceppi contenenti due copie e in ceppi contenenti una copia di *MIP1*, indicando che tutte le mutazioni sono recessive per questo carattere. Le polimerasi mutate, anche la polimerasi Mip1^{G651S}, mantengono almeno parzialmente la capacità di correggere copie di nucleotidi non appaiati correttamente durante la replicazione grazie all'attività esonucleasica.

5.5 Studio dell'associazione di mutazioni *in trans*

Come descritto all'inizio, per determinare l'effetto di due mutazioni *in trans*, i ceppi DWM-5A e DMM sono stati trasformati con due alleli *mip1* mutati come osservato in pazienti umani.

Le crescite dei ceppi eteroallelici contenenti gli alleli *mip1^{H734Y}* e *mip1^{G807R}* sono riportati in allegato 2, figura 3. Il ceppo eteroallelico recante i due alleli presenta una crescita ridotta rispetto ai ceppi contenenti una o due copie dell'allele *mip1^{G807R}*, suggerendo che la presenza della polimerasi Mip1^{H734Y} interferisca con la replicazione catalizzata da Mip1^{G807R}.

I risultati delle frequenze dei mutanti *petite*, dei rho⁰ e dei mutanti Ery^R sono riportati in allegato 2, tabella 4 e nella tabelle 5.4 e 5.5.

Ceppo DWM-5A	% <i>petites</i>	% rho ⁰	Ery ^R (x 10 ⁸)
<i>mip1^{H734Y}/mip1^{H734Y}</i>	97.8 ± 0.2	91	ND
<i>mip1^{G807R}/mip1^{G807R}</i>	8.7 ± 1.8	29	48.6 ± 3.6
<i>mip1^{H734Y}/mip1^{G807R}</i>	70.7 ± 4.8	82	41.2 ± 4.4
<i>mip1^{G651S}/mip1^{G651S}</i>	100±0	100	ND
<i>mip1^{E900G}/mip1^{E900G}</i>	1.9±0.1	17	4.2±0.4
<i>mip1^{G651S}/mip1^{E900G}</i>	6.0±0.9	29	6.9±0.7

Tabella 5. 4: Frequenza dei mutanti *petite*, rho⁰ ed Ery^R nei ceppi aploidi eteroallelici DWM-5A.

Ceppo DMM	% <i>petites</i>
<i>mip1</i> ^{H734Y} / <i>mip1</i> ^{G807R}	83.9 ± 2.7
<i>mip1</i> ^{G651S} / <i>mip1</i> ^{E900G}	6.9 ± 0.5

Tabella 5. 5: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi diploidi eteroallelici DMM.

Per quanto concerne l'associazione H734Y/G807R, si osserva che i ceppi contenenti i due alleli producono più *petite* e più rho⁰ dei ceppi contenenti una o due copie dell'allele *mip1*^{G807R}, confermando che la polimerasi Mip1^{H734Y} interferisce con la replicazione effettuata da Mip1^{G807R}, in accordo col carattere dominante della mutazione H734Y.

Per quanto concerne l'associazione G651S/E900G, la presenza di Mip1^{G651S} non influenza la replicazione di Mip1^{E900G}, perché i ceppi contenenti l'allele *mip1*^{E900G} presentano la stessa frequenza di *petite* indipendentemente dalla presenza dell'allele *mip1*^{G651S}, pari a circa il 6-7%. Questo risultato conferma che *mip1*^{G651S} si comporta come un allele nullo.

5.6 Livelli proteici e attività di proteine Mip1 selvatica e mutate

Per chiarire meglio i meccanismi attraverso i quali le polimerasi mutate riducono la stabilità dell'mtDNA, è stata condotta un'analisi di *folding* e di attività *in vitro* sulle polimerasi. La ridotta capacità di una polimerasi mutata di catalizzare la replicazione del DNA può essere dovuta a due fattori: incremento del *misfolding*, che riduce i livelli proteici funzionali; riduzione dell'attività catalitica intrinseca.

Per valutare il ruolo di questi due parametri, è stato necessario overesprimere la proteina Mip1 wt e le sue varianti mutate, poiché la proteina prodotta da una singola copia del gene non è sufficiente per svolgere le analisi. L'overespressione è stata ottenuta subclonando gli alleli *mip1* mutati nel plasmide pLGALMIP1, un derivato del vettore d'espressione di lievito pLGALZ3, che contiene un promotore *GAL1* inducibile da galattosio, sotto il cui controllo è stata posta la regione codificante di *MIP1*.

I plasmidi pLGALMIP1 e pLGAL*mip1* sono stati inseriti nel ceppo W303-1B. E' stato scelto il ceppo W303-1B, contenente una copia endogena di *MIP1*, per evitare che i ceppi potessero perdere l'mtDNA, e che i risultati fossero influenzati dalla riduzione di mtDNA.

5.6.1 Espressione degli alleli *mip1*

I ceppi W303-1B/pLGAL*mip1* sono stati dapprima fatti crescere per 24 ore in terreno SC addizionato di raffinosisio 2% per evitare che la presenza di glucosio nelle fasi successive causasse inibizione dell'espressione a partire dal promotore *GAL1*, reprimibile da glucosio. Successivamente le cellule sono state poste in SC addizionato di galattosio 2%, per indurre l'espressione di *mip1*. Per ogni allele *mip1*, sono state estratte le proteine totali dopo 6, 9 e 15 ore, mediante il metodo dell'acido tricloroacetico. Con questo metodo vengono precipitate tutte le proteine, anche le proteine eventualmente misfoldate e non solubili, sì da poter determinare la quantità totale di Mip1, e pertanto il livello di espressione.

Stesse quantità di proteine sono state sottoposte ad analisi *Western*, utilizzando come controllo negativo le proteine estratte dal ceppo trasformato con pLGALZ3 vuoto. Per ogni

ceppo e ogni condizione (6, 9 e 15 ore di induzione) l'esperimento è stato fatto in doppio. In figura 5.2 è riportato il *Western* dopo 15 ore di induzione.

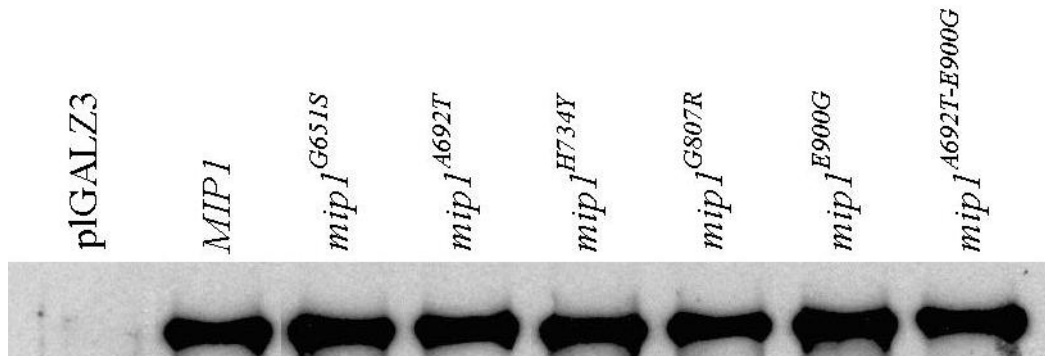


Figura 5. 2: Western blot di Mip1 wt e mutate dopo 15 ore di induzione.

Come si osserva in figura, tutte le proteine, selvatiche e mutate, mostrano lo stesso segnale, indicando che il livello di espressione delle proteine non è influenzato dalla presenza delle mutazioni. Come atteso, il controllo negativo non mostra alcun segnale apprezzabile, poiché in presenza di una sola copia del gene non viene prodotta abbastanza proteina per osservare un segnale tramite *Western blot*.

5.6.2 Determinazione dei livelli proteici mitocondriali solubili

Mediante estrazione con acido tricloroacetico vengono estratte le proteine totali, comprese le proteine eventualmente precipitate. E' noto che il *misfolding* di Mip1 dovuto a mutazioni, come nel caso di altre proteine mutate, produce aggregati non solubili e ovviamente non funzionali (Foury, comunicazione personale). Per saggiare se la presenza delle mutazione riducesse i livelli proteici mitocondriali solubili, e pertanto funzionali, l'analisi *Western* è stata inoltre condotta su estratti grezzi mitocondriali dopo 15 ore di induzione in terreno SC addizionato di galattosio 2%, come riportato in Materiali e metodi. Sugli estratti grezzi è stata condotta, come in precedenza, l'analisi *Western*. La quantificazione degli estratti solubili di Mip1 è stata fatta utilizzando una curva di taratura ottenuta a partire dagli estratti di Mip1 wt. I risultati sono riportati in allegato 2, figura 4 e tabella 5. Come è possibile osservare, tutte le mutazioni, eccetto la mutazione A692T, riducono i livelli solubili funzionali. La riduzione è moderata per la mutazione E900G, e elevata, superiore all'80%, per le rimanenti mutazioni. Inoltre, l'associazione di E900G alla mutazione A692T, riduce notevolmente i livelli proteici. Da questa analisi emerge che, per la maggior parte delle mutazioni, la riduzione della capacità di mantenere *in vivo* l'mtDNA è dovuta, almeno in parte, alla riduzione dei livelli proteici funzionali.

5.6.3 Misurazione dell'attività catalitica

Sugli estratti solubili ottenuti in precedenza è stata misurata l'attività catalitica, mediante saggio di *gap-filling* su *calf timus* DNA attivato dalla DNasi I. Il taglio con la DNasi I produce frammenti con estremità 5' protrudenti, che possono essere riempite mediante la polimerasi Mip1. La misurazione è stata condotta come descritta in Materiali e metodi. La

polimerasi wt produceva un valore di 456 ± 50 nmol di TTP/mg di estratto proteico/ora in materiale precipitabile con acido tricloroacetico.

I valori ottenuti sono riportati in allegato 2, tabella 5. In tabella i valori sono stati normalizzati sulla base dei livelli proteici solubili e espressi come percentuale rispetto all'attività della polimerasi wt. Le polimerasi Mip1^{G651S}, Mip1^{A692T} e Mip1^{H734Y} mostrano una notevole riduzione dell'attività di *gap-filling* specifica. L'attività della polimerasi Mip1^{G807R} è debolmente ridotta, mentre l'attività della polimerasi Mip1^{E900G} non è differente da quella della proteina wt. Inoltre, quando la mutazione E900G è associata alla mutazione A692T, l'attività non è ulteriormente ridotta.

5.7 Discussione

Nel presente studio sono state introdotte in *MIP1* cinque mutazioni equivalenti a mutazioni patologiche presenti in POLG. Tutte le mutazioni studiate riducono la crescita, almeno a 36°C, su fonti ossidabili, e incrementano la frequenza dei *petite*, la frequenza dei rho⁰ e la frequenza dei mutanti Ery^R, sebbene a diversi livelli.

La mutazione G651S corrisponde alla mutazione umana G848S. Questa mutazione è stata osservata in casi molto gravi di Alpers, *in trans* con le mutazioni A467T o con la doppia mutazione W748S-E1143G. Dal nostro studio emerge chiaramente che la polimerasi Mip1^{G651S} non è in grado di replicare correttamente il DNA mitocondriale, in quanto tutte le colonie sono *petite*, e tutte rho⁰. L'incapacità di replicare l'mtDNA non sorprende, in quanto la presenza della mutazione G651S riduce notevolmente sia i livelli proteici solubili mitocondriali sia l'attività polimerasica. Il fenotipo osservato correla dunque col fenotipo patologico osservato nei pazienti. In particolare è noto che le mutazioni A467T e W748S riducono notevolmente l'attività catalitica (Chan *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006). Il fenotipo così grave osservato nei pazienti sembra pertanto dovuto alla presenza di due polimerasi mutate con attività fortemente ridotta. La mutazione G651S risulta inoltre recessiva, e in particolare l'allele *mip1*^{G651S} si comporta come allele nullo. Questi risultati sono in accordo con l'osservazione che la mutazione G848S è recessiva nell'uomo.

La mutazione A692T corrisponde alla mutazione umana A889T. La mutazione A889T è stata osservata in casi di PEO, *in trans* con la mutazione R579W o *in cis* con lo SNP E1143G. Nel primo caso, la mutazione sembra essere recessiva, poiché un genitore del paziente, portatore obbligato della mutazione, era sano. Nel secondo caso, la mutazione sembra essere dominante, perché l'altro allele non presenta mutazioni. In questo caso sono possibili due spiegazioni. E' possibile che la mutazione A889T sia dominante in sé, oppure che lo SNP E1143G la renda dominante. La mutazione A692T in *MIP1* riduce fortemente la stabilità dell'mtDNA, in quanto si osserva un incremento della frequenza dei *petite* (circa 80% a 28°C) e dei rho⁰ (circa 86% a 28°C). La riduzione della capacità di replicare l'mtDNA non è dovuta ad una riduzione dei livelli proteici solubili, del tutto simili a quelli della proteina wt, ma piuttosto alla riduzione di circa il 70% dell'attività polimerasica. All'aumento della mutabilità

estesa è associato anche un aumento della mutabilità puntiforme, di circa 4 volte. Per quanto concerne la dominanza, la mutazione risulta debolmente, ma significativamente in termini di incremento di *petite*, dominante. Questa osservazione suggerisce che la mutazione umana A889T sia anch'essa dominante, ma a causa dello scarso effetto dominante il fenotipo può essere variabile, da non patologico a patologico con tremori fino a patologico con PEO, come nei soggetti eterozigoti osservati.

La mutazione H734Y corrisponde alla mutazione umana H932Y, osservata in un'unica famiglia i cui soggetti affetti da PEO con atassia-neuropatia erano eterozigoti per le mutazioni H932Y e G1051R. I parenti dei due soggetti, omozigoti per l'una o per l'altra mutazione, avevano fenotipi complessi, da non patologici ad oligosintomatici con problemi psichiatrici o emicranie. In particolare tre soggetti su cinque portatori dell'allele recante la mutazione H932Y presentavano una patologia caratterizzata da emicranie frequenti. Al contrario, alcuni soggetti portatori dell'allele G1051R, non presentavano per lo più sintomi. Alcuni mostravano problemi psichiatrici, che tuttavia erano presenti anche in soggetti omozigoti wt, suggerendo che i problemi psichiatrici fossero dovuti, nella famiglia, ad altri fattori. La mutazione H734Y in *MIP1* riduce fortemente la capacità della polimerasi di replicare l'mtDNA, poiché a 28°C quasi il 100% dei cloni sono *petite* e rho⁰. La ridotta capacità di mantenere l'mtDNA è dovuta sia ad una ridotta quantità dei livelli proteici, pari a circa il 10-20%, sia ad una ridotta attività catalitica, pari al 30-40% rispetto alla polimerasi wt. La mutazione risulta inoltre parzialmente dominante e questa dominanza potrebbe spiegare le ragioni per cui tre soggetti eterozigoti per la mutazione H932Y non sono completamente sani, ma oligosintomatici. Il fenotipo osservato in lievito correla perfettamente con ciò che è stato osservato nell'uomo, e suggerisce fortemente che la mutazione H932Y sia dominante.

La mutazione G807R corrisponde alla mutazione umana G1051R, descritta precedentemente. La mutazione G807R riduce la capacità della polimerasi di mantenere l'mtDNA *in vivo*, sebbene moderatamente, poiché a 28°C la frequenza di *petite* è pari a circa il 27%. I mutanti risultano inoltre termosensibili, poiché la frequenza dei *petite* e dei rho⁰ sale quasi al 100% a 36°C, suggerendo che la proteina presenti dei problemi di *folding*. I risultati sono confermati dalle analisi *in vitro*, che dimostrano come la ridotta capacità della polimerasi di replicare l'mtDNA sia dovuta alla forte riduzione dei livelli proteici solubili, pari a circa il 10% del wt. L'attività catalitica, sebbene parzialmente ridotta, risulta simile a quella della polimerasi non mutata, indicando dunque che l'aumento dei *petite* è dovuto soprattutto alla riduzione dei livelli proteici. Alla mutazione è associato anche un forte incremento, di circa 10 volte, della frequenza di mutazioni puntiformi sull'mtDNA. Infine la mutazione risulta recessiva, poiché la mutabilità estesa dell'mtDNA è simile in un ceppo contenente una copia wt e una copia mutata rispetto al ceppo contenente due copie selvatiche.

La mutazione E900G corrisponde allo SNP E1143G. Apparentemente lo SNP E1143G non è neutrale, ma è in grado di comportarsi come modificatore fenotipico di mutazioni patologiche.

Oltre alle osservazioni nei pazienti che portano lo SNP, è stato recentemente dimostrato da studi *in vitro* che lo SNP E1143G si comporta come modificatore fenotipico della mutazione W748S (Chan *et al.*, 2006). Per quanto concerne il nostro studio, abbiamo osservato che la presenza della mutazione aumenta di circa 2 volte la frequenza di *petite* rispetto al wt a 28°C, indicando che la mutazione *per se* non ha un effetto neutrale. Inoltre la frequenza di *petite* sale a 90% a 36°C, indicando che i mutanti sono termosensibili e suggerendo che la proteina presenti una riduzione dei livelli funzionali. Questa osservazione è stata confermata dall'analisi dei livelli proteici funzionali, che sono ridotti a circa il 30-40% rispetto al wt. L'attività catalitica è invece simile rispetto a quella della polimerasi wt, indicando come l'incremento dei *petite* sia dovuto alla riduzione dei livelli proteici. Alla mutazione E900G è associato anche un blando ma significativo incremento della frequenza di mutazioni puntiformi. Infine la mutazione risulta recessiva.

Le mutazioni A889T e E1143G sono state osservate *in cis* in due casi di adPEO, come sottolineato in precedenza. In lievito, è stato osservato che la presenza della mutazione E900G incrementa la frequenza dei *petite*, dall'80% al 97%, indicando che la mutazione E900G si comporta come modificatore fenotipico di una mutazione patologica *in cis*. L'aumento della frequenza di mutanti *petite* non è dovuto alla riduzione dell'attività catalitica, che risulta simile per la polimerasi Mip1^{A692T} e per la polimerasi Mip1^{A692T-E900G}, ma alla riduzione dei livelli proteici solubili che, mentre sono normali per la proteina Mip1^{A692T}, sono ridotti a circa il 5% per la proteina Mip1^{A692T-E900G}. Gli effetti che si osservano nel ceppo recante l'allele *mip1*^{A692T-E900G} sembrano essere dovuti in parte alla riduzione dell'attività catalitica dovuta alla mutazione A692T in parte alla riduzione dei livelli proteici solubili dovuti sia alla mutazione A692T sia alla mutazione E900G. La presenza della mutazione E900G non incrementa invece la frequenza di mutazioni puntiformi dovute alla mutazione A692T. Infine la presenza della mutazione E900G non altera la dominanza della mutazione A692T, che risulta dominante già *per se*.

Per quanto concerne l'effetto di due mutazioni in *trans*, è stato osservato in primo luogo che la presenza della mutazione G651S non influenza la replicazione ad opera della proteina Mip1^{E900G}, in accordo con l'osservazione che *mip1*^{G651S} si comporta come allele nullo. Al contrario, la presenza della mutazione H734Y, che è dominante, influenza la replicazione della polimerasi Mip1^{G807R}. Mentre il ceppo recante solo l'allele *mip1*^{G807R} presenta una frequenza di *petite* di circa il 27°C, il ceppo recante gli alleli *mip1*^{G807R} e *mip1*^{H734Y} mostra una frequenza di *petite* pari a circa l'80%. In tal senso si può ipotizzare che il grave fenotipo osservato nei soggetti eterozigoti per le mutazioni H932Y e G1051R e caratterizzato da atassia-neuropatia con PEO non sia dovuto alla presenza di due polimerasi con scarsa attività, bensì al fatto che una polimerasi recante una mutazione dominante interferisca con la replicazione di una polimerasi mutata che, di per sé, ha un'attività poco inferiore a quella del wt.

E' stato inoltre osservato, come negli esperimenti condotti sulle mutazioni G224A e Y757C, che non vi è correlazione fra incremento di delezioni o deplezione di mtDNA e incremento della frequenza di mutazioni puntiformi. In particolare:

- 1) la frequenza di mutanti *petite* e ρ^0 non è proporzionale alla frequenza di mutanti Ery^R per le varie mutazioni. Ad esempio la mutazione G807R produce relativamente pochi *petite*, ma determina un forte incremento dei mutanti Ery^R.
- 2) la mutazione E900G incrementa la frequenza di *petite* in associazione con la mutazione A692T, ma non la frequenza di mutazioni puntiformi.
- 3) le mutazioni A692T e H734Y sono dominanti per quanto concerne la mutabilità estesa, ma sono recessive per quanto concerne la mutabilità puntiforme.

Queste osservazioni confermano che le delezioni dell'mtDNA sembrano essere dovute a meccanismi diversi da quelli che producono mutazioni puntiformi, quali stallo della replicazione, ridotta attività polimerasica o, come dimostrato in questo studio, ridotti livelli proteici funzionali dovuti a problemi di *folding*.

6. Risultati (III parte):

Rescue genetico mediante
overespressione di geni codificanti
enzimi di riparazione e *rescue* chimico
mediante trattamento con antiossidanti
del fenotipo indotto da mutazioni in
MIP1

6.1 *Rescue* genetico mediante overespressione di geni coinvolti nella riparazione dell'mtDNA

Scopo dell'esperimento consiste nella ricerca di geni coinvolti nella riparazione che, overespressi, riducano la frequenza di mutanti *petite* dovuti a mutazioni in *MIP1*. Sono stati overespressi, mediante clonaggio nel plasmide multicopia YEplac195 o nel plasmide monocopia pFL38, i geni *CCE1*, *MHR1*, *MSH1*, *CDC9*, *REV3* e *REV7*, le cui caratteristiche sono state descritte nell'introduzione.

Dopo clonaggio, i geni sono stati inseriti nei ceppi aploidi DWM-5A (*Δmip1*) recanti gli alleli *mip1*^{A692T}, *mip1*^{G807R}, *mip1*^{E900G} e nel ceppo diploide DWM (*MIP1/Δmip1*) recante l'allele *mip1*^{Y757C} su pFL39. Le quattro mutazioni elencate sono state scelte fra le varie mutazioni a disposizione a causa delle loro diverse caratteristiche.

- La mutazione A692T produce un'alta frequenza di *petite*, è debolmente dominante e la polimerasi mutata mostra una riduzione dell'attività catalitica, ma non dei livelli solubili mitocondriali.
- La mutazione G807R produce *petite* con una frequenza vicino al 25%, è recessiva e la polimerasi mostra una riduzione dei livelli solubili mitocondriali, mentre l'attività è simile a quella del wt.
- La mutazione E900G produce *petite* a bassa frequenza, è recessiva e la polimerasi mostra una riduzione di circa il 60% dei livelli solubili mitocondriali.
- La mutazione Y757C, in eterozigosi, determina un accumulo di *petite* maggiore rispetto a quello del ceppo recante un solo allele selvatico.

Di seguito sono descritti gli effetti dell'overespressione dei vari geni sulla mutabilità estesa.

6.1.1 Overespressione di *CCE1*

Il gene *CCE1*, codificante per una endonucleasi coinvolta nella risoluzione delle giunzioni di Holliday, è stato dapprima clonato nel plasmide multicopia YEplac195, con cui sono stati trasformati i ceppi aploidi DWM-5A recanti le mutazioni A692T, G807R e E900G, oppure l'allele selvatico. La frequenza dei *petite* è riportata in figura 6.1.

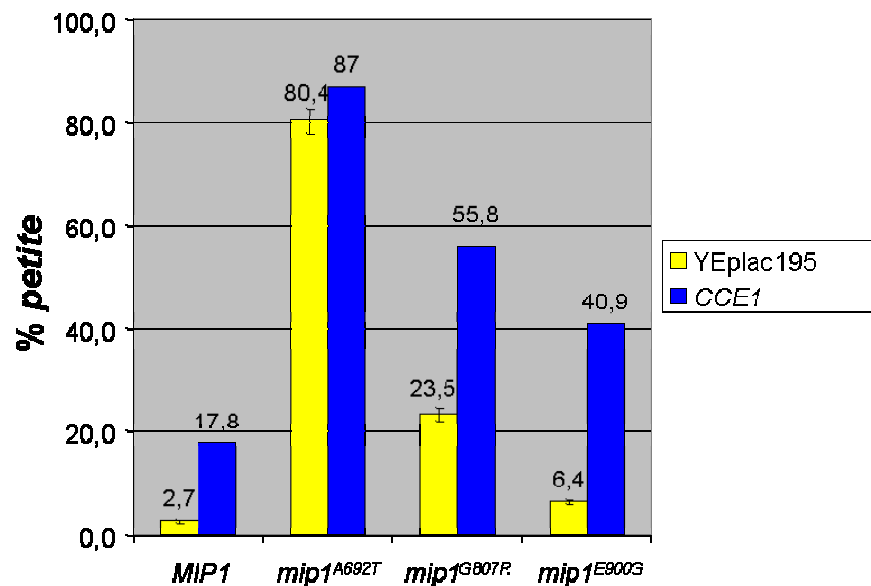


Figura 6. 1: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti l'allele selvatico *MIP1* o gli alleli mutanti *mip1* trasformati con YEplac195 vuoto, in giallo, o con YEplac195CCE1, in blu.

L'overespressione di *CCE1* incrementa la frequenza dei mutanti *petite*. E' possibile ipotizzare che l'overespressione di Cce1 destabilizzi il DNA, ad esempio legandosi ad esso fino a saturazione, e inibendo così altre reazioni che avvengono sull'mtDNA. Il fatto che l'overespressione di una proteina mitocondriale incrementi la frequenza di *petite* non sorprende, in quanto è noto che alcune proteine, quando overesprese, possono incrementare l'accumulo di cloni respiratorio deficienti. Lo stesso *MIP1*, se overespresso, determina un incremento della frequenza dei *petite* (Foury, comunicazione personale). In contemporanea a questo studio altri ricercatori hanno overespresso *CCE1* in cellule umane in coltura e, in quei cloni in cui l'espressione di *CCE1* era maggiore, si assisteva alla deplezione di mtDNA (Sembongi *et al.*, 2007).

Per evitare gli effetti deleteri dovuti ad overespressione su un plasmide multicopia, il gene *CCE1* è stato clonato in un plasmide monocopia, pFL38, per analizzare gli effetti dovuti alla presenza di una sola copia soprannumeraria del gene (figura 6.1).

Come mostrato in figura, la presenza di una copia genica in più non altera in maniera significativa la frequenza di *petite*.

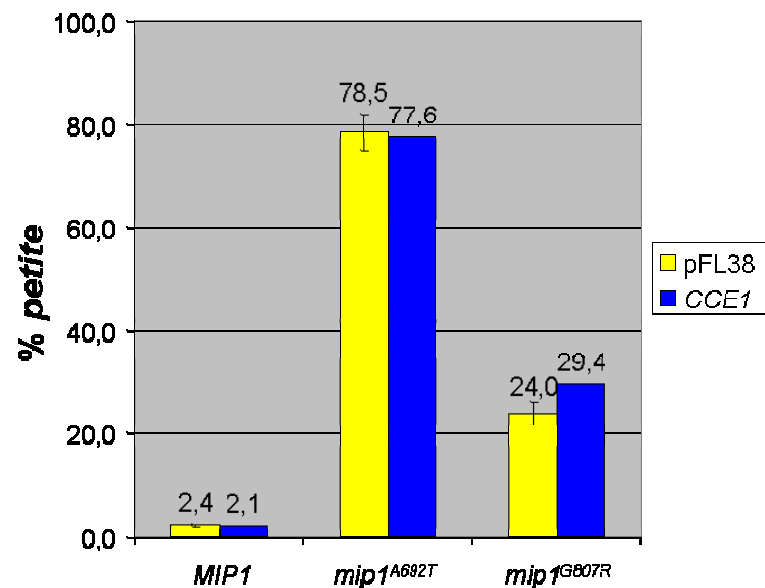


Figura 6. 2: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti l'allele selvatico *MIP1* o gli alleli mutanti *mip1* trasformati con pFL38 vuoto, in giallo, o con pFL38CCE1, in blu.

6.1.2 Overespressione di *MHR1*

Il gene *MHR1*, codificante una proteina coinvolta nella ricombinazione mitocondriale, è stato clonato nel vettore multicopia YEplac195 e successivamente inserito nei ceppi aploidi DWM-5A recanti le varie mutazioni. La frequenza dei mutanti *petite* è riportata in figura 6.3.

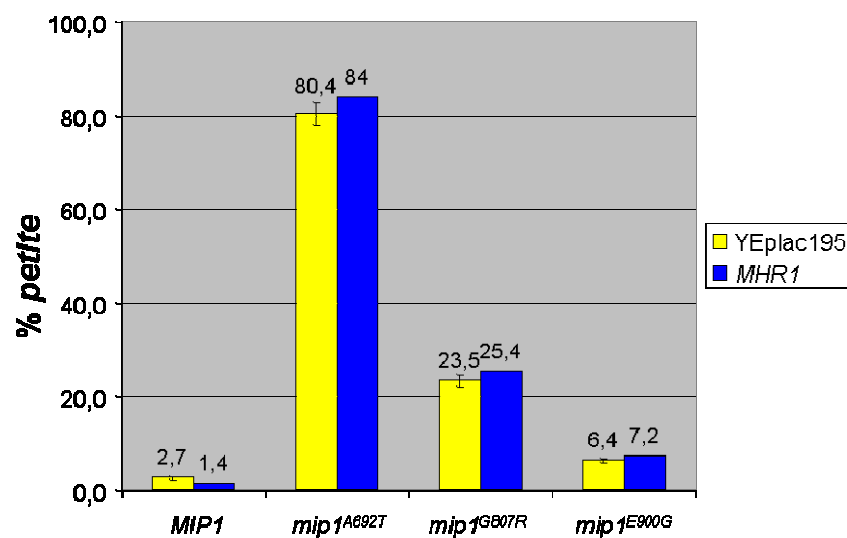


Figura 6. 3: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti l'allele selvatico *MIP1* o gli alleli mutanti *mip1* trasformati con YEplac195 vuoto, in giallo, o con YEplac195MHR1, in blu.

L'overespressione di *MHR1* non altera significativamente la frequenza dei *petite* in alcun mutante esaminato.

L'analisi è stata condotta anche a 37°C, visto che è noto che la delezione di *MHR1* aumenta la frequenza di *petite* soltanto ad alte temperature (Ling *et al.*, 1995). L'analisi a 37°C, non mostrata, non ha determinato alcuna variazione della frequenza di *petite*.

6.1.3 Espressione in monocopia di *MSH1*

Il gene *MSH1*, codificante per la proteina omologa a MutS di *E. coli* e coinvolta nella riparazione di *mismatch*, nella BER e nella ricombinazione omologa, è stato clonato nel plasmide monocopia pFL38. La scelta è caduta su un plasmide monocopia in quanto l'overespressione di *MSH1* determina instabilità dell'mtDNA (Koprowski *et al.*, 2002; Dzierzbicki *et al.*, 2004). L'effetto della presenza di una copia genica soprannumeraria di *MSH1* è riportata in figura 6.4.

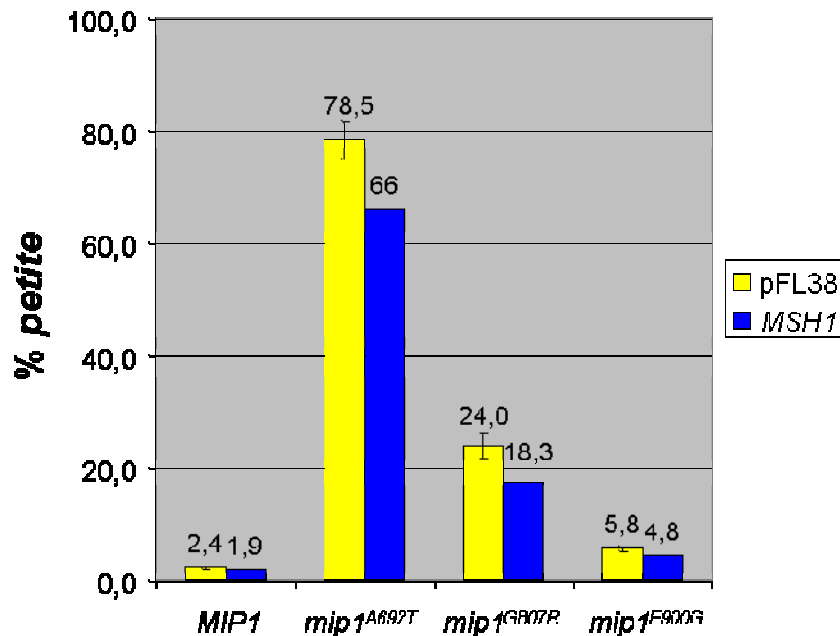


Figura 6. 4: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti l'allele selvatico *MIP1* o gli alleli mutanti *mip1* trasformati con pFL38 vuoto, in giallo, o con pFL38*MSH1*, in blu.

L'espressione di una copia in più di *MSH1* produce sui ceppi aploidi recanti l'allele *mip1^{A692T}* e *mip1^{G807R}* una riduzione che, sebbene significativa, risulta molto blanda. A causa della scarsa riduzione della frequenza dei *petite*, gli effetti del gene *MSH1* non sono stati analizzati ulteriormente.

6.2.4 Overespressione di *CDC9*

Il gene *CDC9*, codificante per l'unica isoforma mitocondriale, è stato clonato nel plasmide multicopia YEplac195. L'effetto dell'overespressione sulla mutabilità puntiforme nei ceppi aploidi è riportato in figura 6.4 A, mentre l'effetto sul ceppo DWM/pFL39*mip1^{Y757C}* è riportato in figura 6.4 B.

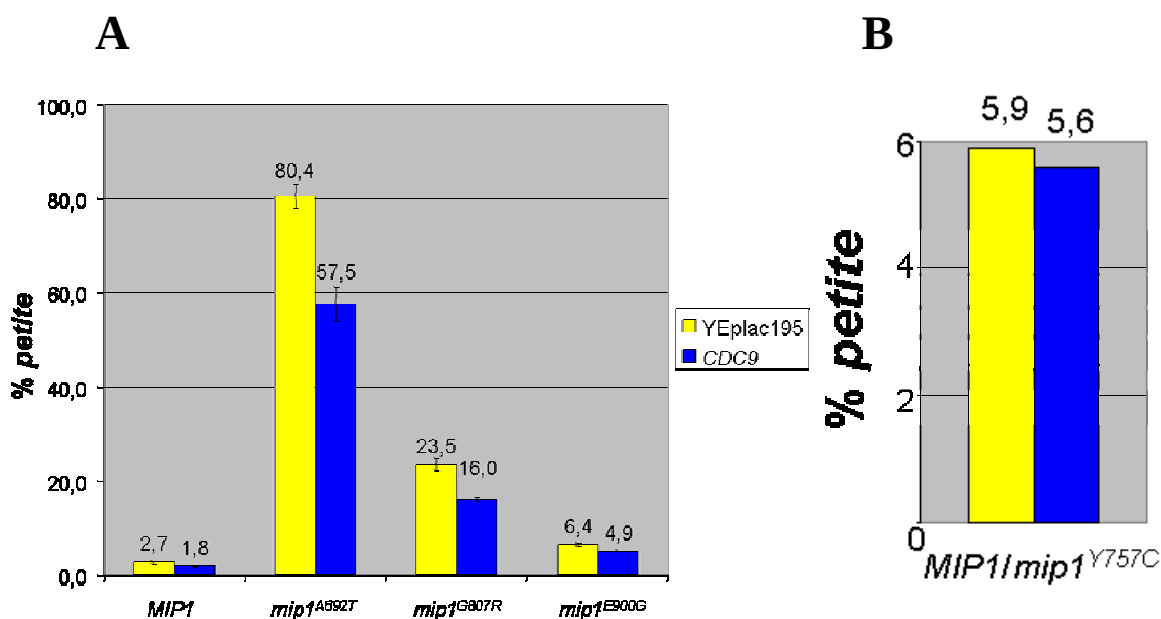


Figura 6. 5: (A) Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti l'allele selvatico *MIP1* o gli alleli mutanti *mip1* trasformati con YEplac195 vuoto, in giallo, o con YEplac195*CDC9*, in blu; (B) Frequenza dei mutanti *petite* nel ceppo diploide eterozigote DWM/*mip1^{Y757C}*.

L'overespressione di *CDC9* riduce la frequenza di mutanti *petite* di circa il 25%-30% per tutte le mutazioni studiate, a eccezione della mutazione Y757C, per la quale non si osserva alcuna riduzione.

Dei ceppi aploidi recanti le varie mutazioni è stata misurata anche la mutabilità puntiforme. In questo caso non è stata osservata alcuna differenza fra la frequenza di mutanti Ery^R nei ceppi trasformati col plasmide vuoto o col plasmide recante il gene *CDC9* (dati non mostrati).

Una analisi di *Northern blot* ha confermato un alto livello di espressione del gene *CDC9* (figura 6.6).

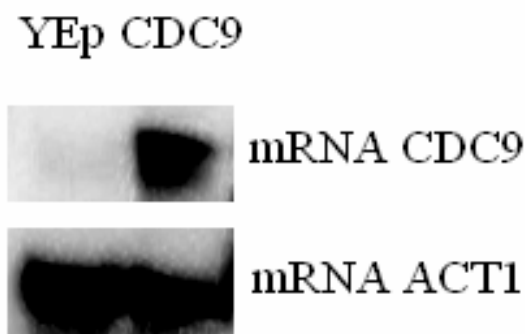


Figura 6. 6: *Northern blot* sul ceppo DWM-5A/*MIP1* trasformato con YEplac195 vuoto, a destra, o con YEplac195*CDC9*, a sinistra. In alto l'mRNA del gene *CDC9*, in basso l'mRNA del gene *ACT1*.

6.2.5 Overespressione di *REV3* e *REV7*

REV3 e *REV7* codificano rispettivamente per la subunità catalitica e la subunità accessoria della polimerasi zeta. I due geni sono stati clonati separatamente nel plasmide YEplac195.

Inoltre, il gene *REV7* è stato sub clonato nel plasmide YEplac195REV3, così da ottenere un plasmide recante entrambi i geni. Gli effetti sulla mutabilità estesa mitocondriale sono riportati in figura 6.7.

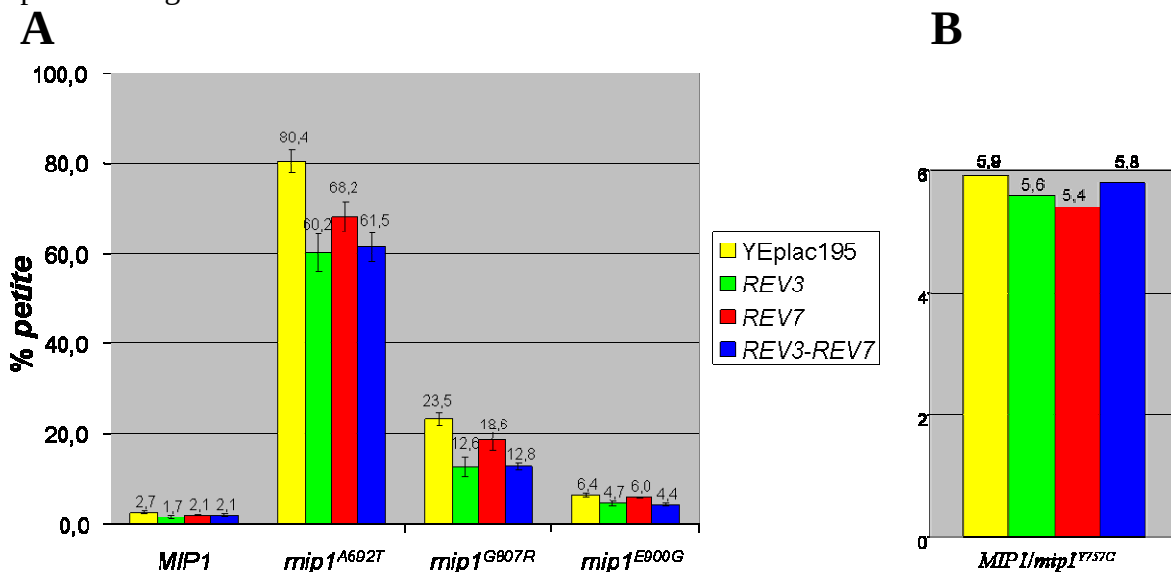


Figura 6. 7: (A) Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti l'allele selvatico *MIP1* o gli alleli mutanti *mip1* trasformati con YEplac195 vuoto, in giallo, con YEplac195REV3, in verde, con YEplac195REV7, in rosso, e con YEplac195REV3-REV7, in blu; (B) Frequenza dei mutanti *petite* nel ceppo diploide eterozigote DWM/*mip1^{Y757C}*.

L'overespressione di *REV3* riduce significativamente la frequenza dei *petite*, in modo mutazione-specifico. La riduzione è pari a circa il 25% nel ceppo recante la mutazione A692T, di circa il 45% nel ceppo recante la mutazione G807R, e di circa il 30% nel ceppo recante la mutazione E900G. Non si osserva alcuna riduzione della frequenza dei *petite* nel ceppo diploide eteroallelico recante la mutazione Y757C.

L'overespressione di *REV7* riduce la frequenza di *petite* in maniera significativa, ma lieve, nei ceppi aploidi recanti le mutazioni A692T e G807R.

La contemporanea overespressione di entrambi i geni *REV3* e *REV7* riduce la frequenza dei *petite* allo stesso modo dell'overespressione del solo gene *REV3*, indicando che i livelli della proteina Rev3 sono limitanti per la riduzione della frequenza di *petite*.

E' stata inoltre determinata la frequenza dei mutanti Ery^R che, come nel caso dell'overespressione di *CDC9*, non mostra alcuna differenza fra i ceppi trasformati con il plasmide vuoto o con i geni *REV3* e/o *REV7* (dati non mostrati).

Per confermare l'overespressione di *REV3* e *REV7*, sul ceppo aploide DWM-5A/*MIP1* trasformato con i vari plasmidi è stato condotto un *Northern blot*, utilizzando sonde contro *REV3* e *REV7* (figura 6.8). Il *Northern blot* ha confermato l'overespressione genica.

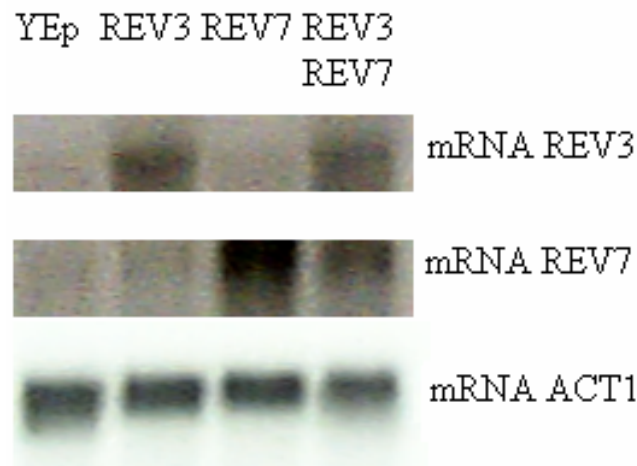


Figura 6. 8: Northern blot sul ceppo DWM-5A/*MIP1* trasformato con YEplac195 vuoto (lane 1), con YEplac195REV3 (lane 2), con YEplac195REV7 (lane 3) e con YEplac195REV3-REV7 (lane 4). In alto l'mRNA del gene *CDC9*, in mezzo l'mRNA del gene *REV7*, in basso l'mRNA del gene *ACT1*.

6.2.6 Rescue mediante incremento dei dNTP pool

L'incremento dei dNTP mediante overespressione di *RNR1* o delezione di *SML1* si è dimostrato efficace nel ridurre la frequenza dei *petite*, sia nel ceppo recante l'allele *MIP1* selvatico sia nei ceppi recanti le mutazioni G224A e Y757C (capitolo 4). Per valutare se un incremento del pool dei dNTP fosse efficace per tutte le mutazioni in *MIP1*, tutti gli alleli mutati a disposizione sono stati inseriti nel ceppo DYY-4C, delecto in *SML1*. Gli effetti sulla mutabilità estesa sono riportati in figura 6.9.

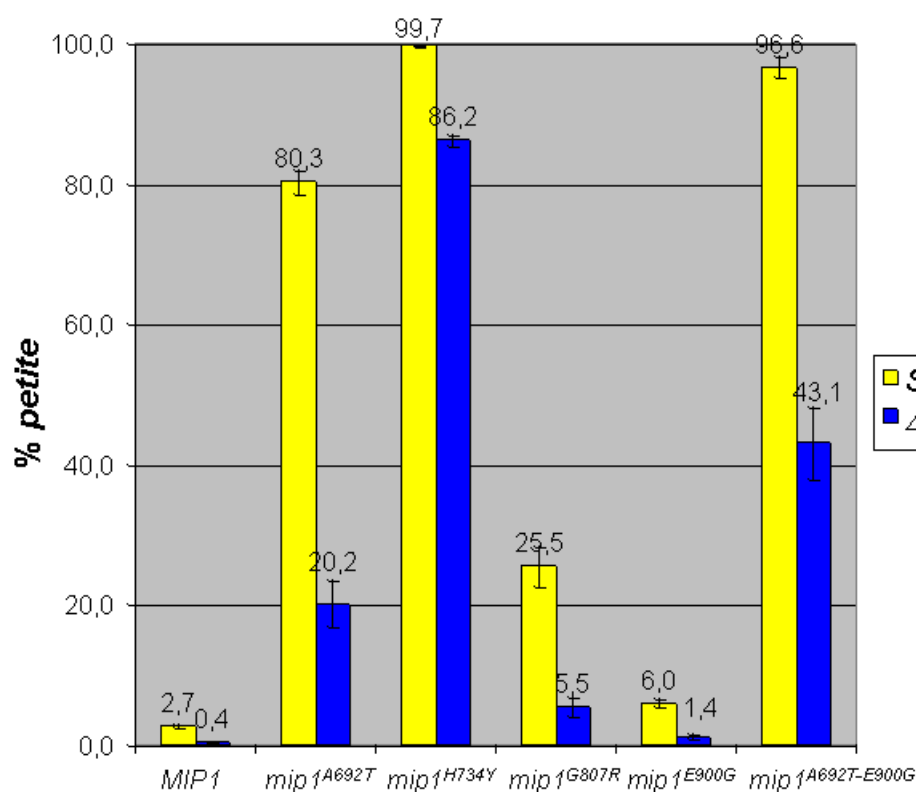


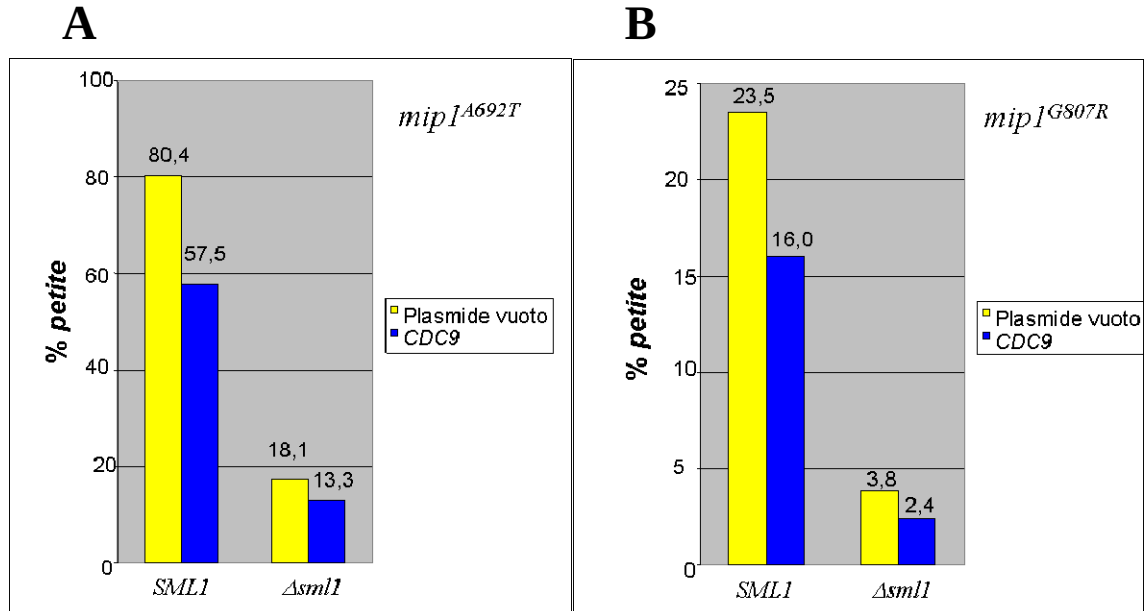
Figura 6. 9: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi DWM-5A (*SML1*) recanti i vari alleli *mip1*, in giallo, e nei ceppi DYY-4C ($\Delta sml1$), in blu.

L'incremento dei dNTP si è dimostrato efficace nel diminuire la frequenza dei *petite* associata ad ogni mutazione in *MIP1*. La riduzione è comunque mutazione-specifica, e va dal 15% per la mutazione H734Y all'80% per la mutazione G807R.

6.2.7 Associazione fra incremento dei NTP *pool* e overespressione di *CDC9* o *REV3* e *REV7*

Sulla base dei risultati ottenuti, si sono valutati gli effetti di un doppio meccanismo di *rescue*: l'incremento della concentrazione dei dNTP e l'overespressione di *CDC9* o *REV3* o *REV7*. L'analisi aveva un doppio scopo. In primo luogo, si voleva determinare se gli effetti della riduzione fossero additivi, così da poter ridurre in maniera significativa la frequenza di *petite*, risultato potenzialmente importante dal punto di vista terapeutico. In seconda istanza, si volevano comprendere meglio i meccanismi attraverso cui l'overespressione di Cdc9 e Pol zeta agissero.

La frequenza dei *petite* è stata determinata per i ceppi DYY-4C, deleti in *SML1*, recanti gli alleli *mip1*^{A692T} e *mip1*^{G807R} trasformati col gene *CDC9* (figura 6.10 A e B) o coi geni *REV3* e *REV7* (figura 6.10 C e D). Sono state analizzate solo le mutazioni *mip1*^{A692T} e *mip1*^{G807R} in quanto nel contesto Δ *sml1* il ceppo recante l'allele *mip1*^{E900G} presentava una frequenza di *petite* troppo bassa (1,4%) per studiare gli effetti dell'overespressione di *CDC9*, *REV3* e *REV7*.



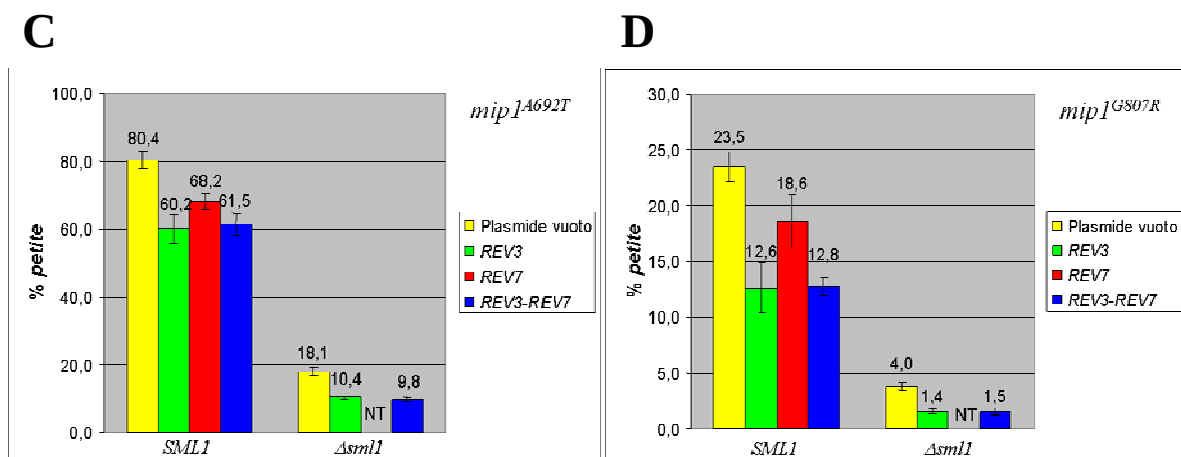


Figura 6. 10: (A) Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi *SML1* o $\Delta sml1$ recanti la mutazione A692T trasformati con YEplac195, in giallo, o con YEplac195CDC9, in blu; (B) Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi *SML1* o $\Delta sml1$ recanti la mutazione G807R trasformati con YEplac195, in giallo, o con YEplac195CDC9, in blu; (C) Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi *SML1* o $\Delta sml1$ recanti la mutazione A692T trasformati con YEplac195, in giallo, con YEplac195REV3, in verde, con YEplac195REV7, in rosso, o con YEplac195REV3-REV7, in blu. NT: non testato; (D) Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi *SML1* o $\Delta sml1$ recanti la mutazione A807T trasformati con YEplac195, in giallo, con YEplac195REV3, in verde, con YEplac195REV7, in rosso, o con YEplac195REV3-REV7, in blu.

Come si osserva nelle figura 6.10 A e 6.10 B, gli effetti dell'incremento dei dNTP e dell'overespressione di *CDC9* sono additivi. Infatti, sia nel ceppo *SML1* che nel ceppo $\Delta sml1$ si osserva una riduzione della frequenza di *petite* di circa il 25-30%. Questo risultato suggerisce che l'azione di ciascuno dei due sistemi considerati sia indipendente da quella dell'altro.

Al contrario, gli effetti dell'overespressione di *REV3* o di *REV3-REV7*, sono più che additivi nel contesto $\Delta sml1$ rispetto ad un ceppo *SML1*. Per quanto concerne la mutazione A692T, se nel ceppo *SML1* si osserva una riduzione del 25% in seguito ad overespressione di Pol zeta, pari ad una riduzione di 1,3 volte, nel ceppo $\Delta sml1$ la riduzione è del 45%, pari a 1,8 volte. Per quanto riguarda la mutazione G807R, nel ceppo *SML1* si osserva una riduzione del 45% in seguito ad overespressione di Pol zeta, pari ad una riduzione di 1,8 volte, mentre nel ceppo $\Delta sml1$ la riduzione è del 65%, pari a 2,8 volte. Nel complesso le frequenze dei *petite* sono ridotte di circa 8 volte per la mutazione A692T e di circa 16 volte per la mutazione G807R.

6.2 Rescue genetico mediante trattamento con sostanze antiossidanti

I ceppi recanti le mutazioni A692T, G807R e Y757C sono stati trattati con sostanze antiossidanti, per valutare il coinvolgimento di ROS nella formazione dei *petite*.

6.2.1 Trattamento con acido diidrolipoico e con resveratrolo

L'acido diidrolipoico, le cui caratteristiche sono state spiegate nel capitolo 4, è un antiossidante naturale. Il trattamento del ceppo DWM/*mip1^{Y757C}* con acido diidrolipoico 30 μ M si è dimostrato in grado, come detto nel capitolo 4, di ridurre di circa 6 volte la frequenza dei mutanti *petite*.

La frequenza dei mutanti *petite* in seguito a trattamento con acido diidrolipoico è riportato in figura 6.11.

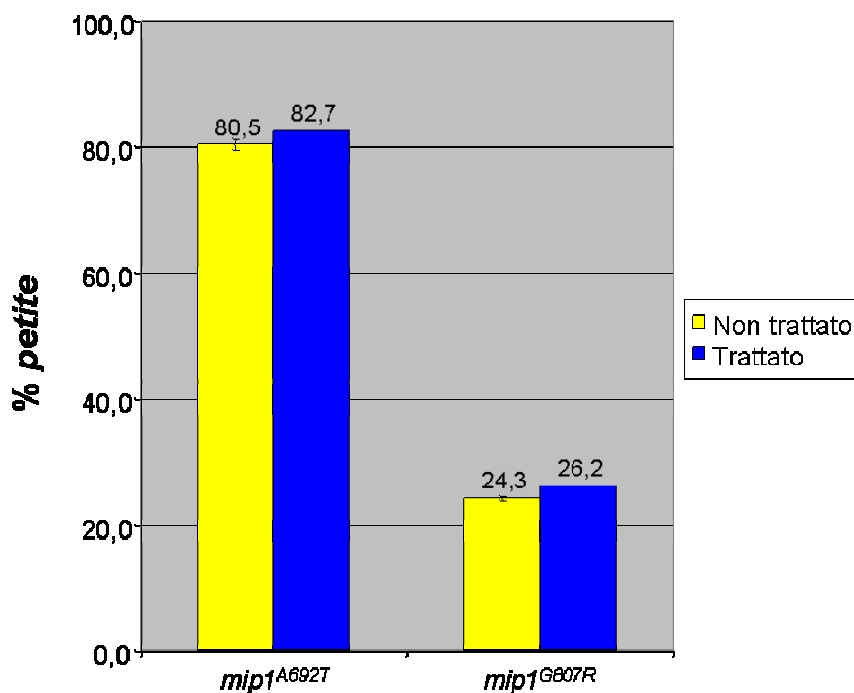


Figura 6. 11: Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti gli alleli mutanti *mip1* trattati con acido diidrolipoico 30 µM, in blu, o non trattati, in giallo.

Il trattamento con acido diidrolipoico non ha sortito alcun effetto sulla mutabilità estesa associata alle mutazioni A692T e G807R.

Il resveratrolo è un antiossidante naturale prodotto da diverse piante ed è abbondante sulla buccia dell'uva e nel vino. Strutturalmente il resveratrolo è un fenolo modificato (3,5,4'-triidrossistilbene) che possiede due gruppi alcolici su un anello aromatico, che sono in grado di ossidarsi così da dare origine ad una struttura chinonica.

Il trattamento con resveratrolo dei ceppi aploidi DWM-5A a diverse concentrazioni non ha mostrato alcuna riduzione della frequenza dei *petite* (dati non mostrati).

6.2.2 Trattamento con mitochinone

Il mitochinolo/mitochinone, o MitoQ, è una sostanza antiossidante di sintesi ottenuto nel 2001 (Kelso *et al.*, 2001). Il MitoQ deriva dalla modificazione chimica dell'ubichinone, in cui è stato inserito un catione trifenilfosfonio lipofilo legato ad una catena alifatica, come mostrato in figura 6.12.

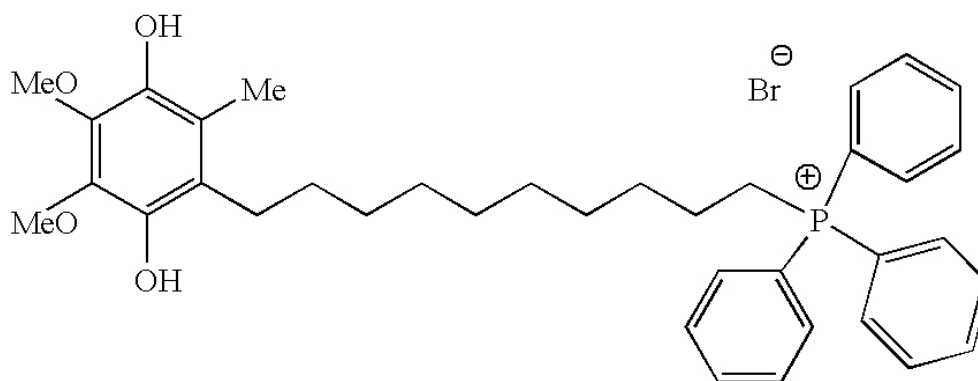
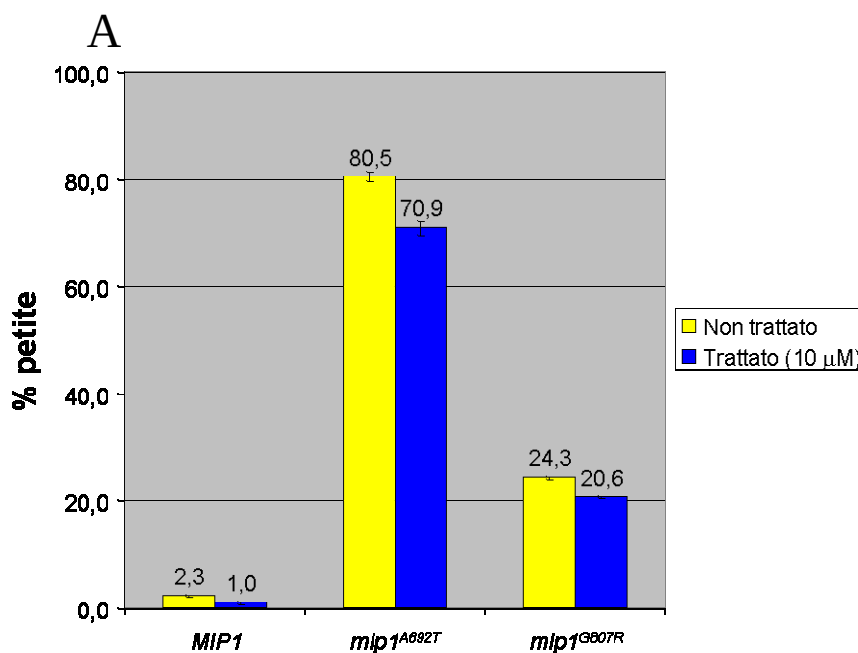


Figura 6. 12: Struttura chimica del mitoQ nella forma ridotta (mitochinolo).

Grazie al gruppo cationico, la molecola entra specificatamente nei mitocondri grazie al potenziale di membrana, e il gruppo ubiquinonico rimane immerso nella membrana mitocondriale interna, dove, riducendo i ROS, protegge il mitocondrio dal danno ossidativo. Inoltre la forma ossidata (mitochinone) viene di nuovo trasformata, dalla catena respiratoria mitocondriale, nella forma ridotta (mitochinolo) che è in grado di riossidarsi in presenza di ROS e continuare così il processo ciclico che protegge il mitocondrio dall'ossidazione dei ROS. Nello specifico la forma ossidata può essere ridotta dal complesso I, in grado di cedere elettroni al mitochinone grazie alla somiglianza strutturale con l'ubichinone (Kelso *et al.*, 2001).

Dopo misurazione della minima concentrazione inibente, pari a 50 μM , i ceppi aploidi DWM-5A recanti i diversi alleli mutanti e il ceppo DWM/*mip1*^{Y757C} sono stati trattati con MitoQ 5 μM , 10 μM e 25 μM . I risultati sono riportati in figura 6.13.



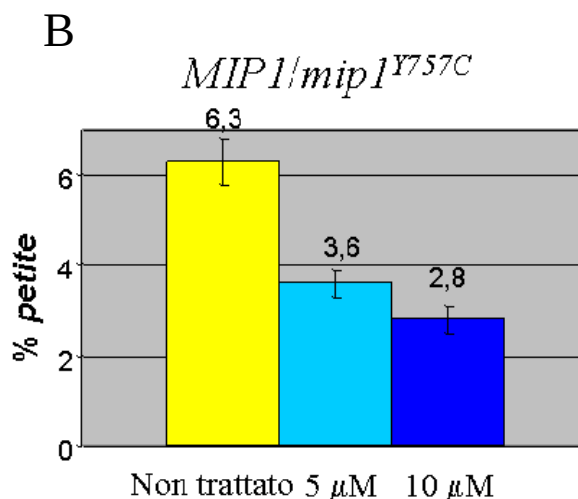


Figura 6. 13: (A) Frequenza dei mutanti *petite* nei ceppi aploidi DWM-5A recanti l'allele selvatico *MIP1* o gli alleli mutanti *mip1* trattati con MitoQ 10 μ M, in blu, o non trattati, in giallo; (B) Frequenza dei mutanti *petite* nel ceppo diploide eterozigote DWM/*mip1^{Y757C}* trattato con MitoQ 5 μ M, in azzurro, con MitoQ 10 μ M, in blu, o non trattato, in giallo.

Il trattamento con MitoQ riduceva la frequenza dei *petite* nei ceppi aploidi recanti gli alleli mutanti, sebbene la riduzione fosse poco significativa, pari a circa il 15% sia per la mutazione A692T sia per la mutazione G807R. La riduzione risulta significativa, e maggiore del 50%, nel ceppo aploide recante l'allele selvatico *MIP1*. Il trattamento con MitoQ 5 μ M non riduceva la frequenza in maniera significativa (dati non mostrati).

Il trattamento con MitoQ riduceva la frequenza del ceppo eterozigote *MIP1/mip1^{Y757C}* di circa il 45% in presenza di MitoQ 5 μ M e di circa il 65% in presenza di MitoQ 10 μ M, indicando che nella formazione dei *petite* ad opera della mutazione Y757C gioca un ruolo rilevante la presenza di sostanze ossidanti.

Il trattamento dei vari ceppi con MitoQ 25 μ M si è dimostrato dannoso per la stabilità dell'mtDNA, poiché la frequenza dei *petite* era significativamente maggiore. E' possibile ipotizzare che, a concentrazioni troppo elevate, il MitoQ sia sbilanciato verso la forma chinonica, e si comporti come ossidante, oppure che, interferendo con l'ossidazione dell'ubichinone ad opera del complesso I, porti ad una maggiore formazione di ROS, anche tenendo conto che la maggior parte dei ROS, come detto nell'introduzione, si formano proprio a partire dal complesso I.

6.3 Conclusioni e prospettive

Nel presente studio sono stati overespressi, in ceppi recanti alleli mutanti *mip1*, geni coinvolti nella riparazione. La scelta di questa strategia si basa sull'osservazione che gli enzimi coinvolti nella riparazione dell'mtDNA influenzano profondamente la stabilità del DNA, tanto che delezioni nei geni codificanti questi enzimi portano, in generale, a un aumento della mutabilità estesa e/o puntiforme dell'mtDNA.

Fra i vari geni analizzati, tre, *CDC9*, *REV3* e *REV7*, si sono dimostrati in grado, quando overespressi, di ridurre la mutabilità estesa dovuta a mutazioni in *MIP1*.

Per quanto concerne *CDC9*, è in grado di ridurre la frequenza dei mutanti *petite* di circa il 25%-30% nei ceppi aploidi deleti in *MIP1* e recanti gli alleli *MIP1*, *mip1*^{A692T}, *mip1*^{G807R} e *mip1*^{E900G}. *CDC9* non è invece in grado di ridurre la frequenza nel ceppo diploide *MIP1/mip1*^{Y757C}, suggerendo che le delezioni mediate dalla mutazione Y757C si generino attraverso meccanismi diversi da quelli dovuti alle mutazioni precedentemente elencate.

Le ipotesi per spiegare come un aumento della concentrazione della DNA ligasi possa ridurre la mutabilità estesa sono varie. In prima istanza, è noto che mutazioni in *CDC9* che rendono la ligasi termosensibile riducono di circa il 50% il numero di copie di mtDNA (Donahue *et al.*, 2001). La riduzione si osserva anche in fase stazionaria, suggerendo che la DNA ligasi sia importante nel mantenimento dell'mtDNA non solo per il suo ruolo nella replicazione. In tal senso è possibile che l'overespressione di *CDC9* determini un aumento del numero di copie di mtDNA, favorendo dunque la trasmissione di genomi integri alla progenie. Inoltre la DNA ligasi è coinvolta nei processi di riparazione, in particolare nella BER e nella riparazione di tagli a doppio filamento. E' possibile che forme mutate di polimerasi, oltre ad avere un'attività catalitica ridotta, possano favorire l'insorgenza di danni sul DNA, la cui riparazione potrebbe essere favorita da un'overespressione di Cdc9. In terzo luogo, è stato dimostrato che nell'uomo la DNA polimerasi mitocondriale, e la DNA ligasi III, ortologo funzionale di Cdc9, interagiscono fisicamente *in vivo*. Questa interazione favorisce l'attività replicativa di Pol γ e permette a quest'ultima di partecipare alla BER. E' possibile che anche Mip1 e Cdc9 interagiscano *in vivo*, e che questa interazione favorisca l'attività di *MIP1*.

Per valutare queste ipotesi verranno condotti successivamente diversi esperimenti.

- 1) Verrà valutato, mediante real-time PCR e/o *Southern blot*, se l'overespressione di *CDC9* determini un aumento del numero di copie di mtDNA.
- 2) Verrà valutato se fra Cdc9 e Mip1 vi sia interazione fisica. Per questa analisi verrà utilizzato un ceppo recante una versione di *MIP1* modificata codificante per la proteina Mip1 legata ad un tag. Il ceppo verrà trasformato con un plasmide multicopia contenente il gene *CDC9* codificante per una versione modificata, legata ad un tag diverso dal precedente. La determinazione dell'interazione avverrà mediante coimmunoprecipitazione, utilizzando come anticorpo per la coimmunoprecipitazione l'anticorpo anti-Mip1, e per la determinazione della presenza di Cdc9 un anticorpo anti-Cdc9.
- 3) Poiché *CDC9* è espressa anche nel nucleo, si valuterà se un overespressione di Cdc9 è deleteria per il DNA nucleare. In particolare verrà valutato se l'overespressione determina un aumento di retromutazioni, di *crossing over* mitotico, di conversioni geniche, di aneuploidia e di delezioni mediante l'uso del ceppo YHE2, un derivato del ceppo D7 (Zimmerman *et al.*, 1975).

E' stato inoltre osservato che l'incremento dei dNTP *pool* riduce la frequenza dei mutanti *petite* per ogni mutazione testata, sebbene in modo fortemente mutazione-dipendente. Questo suggerisce che un incremento della concentrazione dei dNTP possa essere utile per contrastare gli effetti di numerose mutazioni in *MIP1*. Sono stati inoltre studiati gli effetti di

un doppio meccanismo di *rescue*: incremento dei dNTP e overespressione di *CDC9*. Sulle mutazioni testate, gli effetti si sono dimostrati additivi, suggerendo che i due meccanismi agiscano diversamente, e che dunque un incremento dei dNTP non influenzi l'attività di *Cdc9*.

L'overespressione di *REV3* e *REV7* determina una riduzione della frequenza di *petite* nei ceppi recanti gli alleli *MIP1*, *mip1^{A692T}*, *mip1^{G807R}* e *mip1^{E900G}*. L'overespressione di *REV3* riduce la frequenza di *petite* in maniera mutazione dipendente, determinando una riduzione del 25% nel ceppo recante la mutazione A693T e del 45% nel ceppo recante la mutazione G807R. Gli effetti sono ancora maggiori nel ceppo deleto in *SML1*, dove si osserva una riduzione della frequenza di *petite* rispettivamente del 45% e del 65%. Da questi risultati emerge chiaramente che l'incremento dei dNTP favorisce il meccanismo con cui agisce Rev3. Anche in questo caso si possono formulare diverse ipotesi per spiegare il *rescue* ad opera di Pol zeta. In primo luogo, è possibile che Pol zeta, se overespresso, possa complementare parzialmente la funzione di Mip1. Sebbene la polimerasi zeta sia poco processiva, una sua overespressione potrebbe aumentare la velocità di replicazione dell'mtDNA, qualora Pol zeta fosse in grado di sostituirsi parzialmente a Mip1. In secondo luogo, è possibile che Mip1 mutata presenti dei problemi nella sintesi translesione, cioè che in presenza di una lesione Mip1 mutata sia maggiormente inibita rispetto alla polimerasi wt. La presenza di una maggiore concentrazione di Pol zeta, coinvolta nella sintesi translesione, potrebbe favorire indirettamente la polimerizzazione di Mip1, che non verrebbe più bloccata in corrispondenza di danni sul DNA. In tal senso è anche possibile che Mip1 e Pol zeta interagiscano fisicamente. Nel nucleo infatti le polimerasi replicative e una polimerasi riparativa, Pol eta, interagiscono fisicamente. L'interazione non è diretta, ma mediata da una proteina chiamata PCNA che, quando modificata mediante ubiquitinazione e/o sumoilazione, favorisce lo *switch* delle due polimerasi. In presenza di un template non danneggiato infatti, la polimerasi replicativa sintetizza nuovo DNA. Quando vi è un danno, il PCNA, dopo modificazione, determina uno *switch* per cui la polimerasi riparativa, sintetizza il DNA in corrispondenza del template danneggiato. Infine, in seguito ad un nuovo *switch*, la polimerasi replicativa riprende la sintesi del DNA (Prakash *et al.*, 2005). E' stato ipotizzato che anche Pol zeta possa interagire col PCNA (McHugh and Sarkar, 2006). Sebbene il PCNA non sia presente nel mitocondrio, è possibile che le due polimerasi siano comunque in grado di interagire attraverso altre proteine.

Diversi esperimenti verranno condotti per valutare la validità di queste ipotesi.

- 1) Verrà valutato, mediante real-time PCR e/o *Southern blot*, se l'overespressione di Pol zeta determini un aumento del numero di copie di mtDNA.
- 2) Verrà valutato se fra Pol zeta e Mip1 vi è interazione fisica. Verrà utilizzata la medesima tecnica già spiegata per *CDC9*, ma in questo caso verranno overespressi *REV3* e *REV7*.
- 3) Poiché Pol zeta è espressa anche nel nucleo, si valuterà se l'overespressione di Pol zeta è deleteria per il DNA nucleare.

- 4) Verranno studiati gli effetti della delezione di *REV3* sulla mutabilità mitocondriale per valutare se tali effetti siano complementari rispetto a quelli osservati nel caso dell'overespressione di *REV3*.
- 5) Nei ceppi già overesprimenti Pol zeta, verrà overespresso anche il gene *REV1*. Come detto, Rev1 interagisce con Rev7 e favorisce il mantenimento del complesso Rev3-Rev7 e l'attività di Pol zeta. Il gene *REV1* verrà clonato nel plasmide multicopia YEplac181, contenente il marcatore *LEU2*, con cui verranno trasformati i ceppi aploidi recanti gli alleli mutanti *mip1* e il plasmide YEplac195*REV3-REV7*. Su questi ceppi verrà misurata la frequenza di *petite* e, nel caso di risultati positivi, si procederà anche con le analisi sopra riportate.

I ceppi aploidi recanti gli alleli *mip1* mutati sono stati trattati con diversi agenti antiossidanti in grado di ridurre l'accumulo dei ROS. Nessuna di queste sostanze si è dimostrata efficace nel ridurre la frequenza di *petite*, se non il MitoQ che, a concentrazione 10 μ M, ha determinato una debole riduzione, di circa il 15%, della mutabilità estesa. Questa analisi suggerisce che nella mutabilità estesa dell'mtDNA dovuta alle mutazioni A692T, G807R ed E900G non giochino un ruolo cruciale i ROS. Al contrario, il trattamento con MitoQ 10 μ M ha ridotto di più di due volte la frequenza dei mutanti *petite* nel ceppo diploide *MIP1/mip1^{Y757C}*. Sulla base di questa osservazione, e della riduzione della frequenza dei mutanti *petite* anche in seguito a trattamento con acido diidrolipoico (capitolo 4), è lecito pensare che l'accumulo di delezioni nell'mtDNA in presenza della mutazione Y757C sia mediato parzialmente dall'accumulo di ROS. Questi risultati sono coerenti con i risultati riportati da Graziewicz *et al.*, 2007, che hanno mostrato come la polimerasi umana Y955C tenda ad accumulare nel DNA la base ossidata 8-oxo-dG.

7. Risultati (IV parte):

Studio di uno SNP nel gene *MIP1* codificante la DNA polimerasi mitocondriale di *Saccharomyces cerevisiae* presente nei ceppi di laboratorio*

*I risultati discussi in questa sezione sono stati oggetto della seguente pubblicazione:

Baruffini E., Lodi T., Dallabona C. and Foury F. (2007). A single nucleotide polymorphism in the DNA polymerase gamma gene of *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains is responsible for increased mitochondrial DNA mutability. *Genetics*. **177**, 1227-1231. La pubblicazione è riportata come allegato 3.

7.1 Analisi della mutabilità mitocondriale associata all'allele *MIP1*[S] e all'allele *MIP1*[Σ]

In tutti gli esperimenti realizzati in questo studio è stato utilizzato il ceppo W303 o suoi derivati. Nell'analogo studio condotto da Stuart *et al.*, 2006 circa gli effetti delle mutazioni equivalenti a mutazioni patologiche inserite in *MIP1* è stato usato un diverso ceppo, ma isogenico a W303 per quanto riguarda l'allele *MIP1* selvatico. Poiché l'allele *MIP1* del ceppo W303 ha la stessa sequenza del ceppo S288c, utilizzato per la determinazione della sequenza dell'intero genoma (riportata in banche dati al sito www.yeastgenome.org), tale allele verrà chiamato in seguito *MIP1*[S].

MIP1 è stato clonato per la prima volta da Foury *et al.*, 1989, mediante trasformazione con una banca genomica di un ceppo *mip1-1*. La banca genomica era stata costruita utilizzando il DNA del ceppo Σ1278b, per cui l'allele *MIP1* identificato da Foury *et al.* verrà in seguito chiamato *MIP1*[Σ].

Negli studi in cui sono stati utilizzati ceppi contenenti l'allele *MIP1*[S] si osservavano nel wild type frequenze di *petite* del 2-6% a 28°C (questo studio, capitolo 4; Stuart *et al.*, 2006) e frequenze del 10% a 36°C (questo studio, capitolo 4). Al contrario, l'accumulo di *petite* che si osservava utilizzando l'allele *MIP1*[Σ] erano inferiori allo 0.5% sia a 28°C che a 37°C (Hu *et al.*, 1995). Sebbene la stima dei *petite* fosse stata fatta utilizzando diverse tecniche, i valori sono estremamente diversi soprattutto ad alte temperature. Queste differenze sono difficilmente imputabili a differenze del *background* genetico, visto che anche negli studi condotti utilizzando l'allele *MIP1*[Σ], questo era inserito nel ceppo W303-1B.

Per approfondire la causa di queste differenze è stata misurata la frequenza di *petite* nel ceppo DWM-5A ($\Delta mip1$) trasformato alternativamente con l'allele *MIP1*[S] o con l'allele *MIP1*[Σ], ottenendo così i ceppi DWM-5A/pFL39*MIP1*[S] e DWM-5A/pFL39*MIP1*[Σ]. Sui ceppi è stato dapprima misurato l'accumulo di mutanti *petite* dopo crescita su terreno solido, a 28°C, a 36°C, a 37°C e a 38,5°C. I risultati sono riportati in allegato 3, figura 1 A.

Come mostrato, il ceppo DWM-5A trasformato con l'allele *MIP1*[S] presentava un accumulo di *petite* 4 volte superiore al ceppo trasformato con l'allele *MIP1*[Σ]. Inoltre il ceppo recante l'allele *MIP1*[S], a differenza del ceppo trasformato con l'allele *MIP1*[Σ], mostrava un accumulo di *petite* dipendente dalla temperatura, raggiungendo valori del 21% a 36°C, del 35% a 37°C e del 64% a 38,5°C. E' stata successivamente misurato, mediante incrocio con ceppi *mit⁻* (capitolo 4), la frequenza dei cloni ρ^0 tra i *petite*. Mentre a 28°C la percentuale di ρ^0 non risulta differente, a 36°C la percentuale di cloni ρ^0 è 2,5 volte maggiore per il ceppo recante l'allele *MIP1*[S] rispetto al ceppo recante l'allele *MIP1*[Σ] (allegato 3, figura 1 B). Infine, anche la frequenza di mutazioni puntiformi è risultata di 6 volte maggiore nel ceppo recante l'allele *MIP1*[S] (allegato 3, figura 1 C).

Da questi risultati è emerso che all'allele *MIP1*[S] è associato un maggior accumulo di *petite*, soprattutto ad alte temperature, e una maggiore infedeltà. Poiché il *background* genetico in cui

è stata condotta l'analisi è lo stesso, si è concluso che le differenze devono essere dovute alle differenze amminoacidiche fra la proteina Mip1[S] e la proteina Mip1[Σ].

7.2 Confronto *in silico* fra Mip[Σ] e Mip1[S]

Le sequenze delle due ORF *MIP1*[Σ] e *MIP1*[S] sono state allineate mediante il programma ClustalW. L'allineamento completo è riportato in figura 7.1.

```

MIP1 [Σ] : ATGACGAAATGATGGTTAGATTGAATGCATGCTGCGAATGGTGC GCGCGCGCCGCTGCGTGTGCAGTTTGTGCTCG : 80
MIP1 [S] : ATGACGAAATGATGGTTAGATCGAATGCATGCTGCGAATGGTGC GCGCGCGCCGCTGCGTGTGCAGTTTGTGCTCG : 80

MIP1 [Σ] : ATGGTTCTCCACAAAGAAGAAATCCCGAGAAGCACCAGGATTAATCCTGTGGGGATACAGTATTAGGTGAGTCTTTGC : 160
MIP1 [S] : ATGGTTCTCCACAAAGAAGAAATCCCGAGAAGCACCAGGATTAATCCTGTGGGGATACAGTATTAGGTGAGTCTTTGC : 160

MIP1 [Σ] : AAAGACAGGTATTTGGTAGTTGCGGTGGTAAAGATGAGGTGGAGCAAAGCGACAAACTATGGAGTTATCGAAAAAGTCG : 240
MIP1 [S] : AAAGACAGGTATTTGGTAGTTGCGGTGGTAAAGATGAGGTGGAGCAAAGCGACAAACTATGGAGTTATCGAAAAAGTCG : 240

MIP1 [Σ] : CTAAAGGACCATGGGTTGTGGGGAAGAAGACGCTCATCACGGATCCAATATCGTTTCTCTGCCGCCACTACAAGGCAG : 320
MIP1 [S] : CTAAAGGACCATGGGTTGTGGGGAAGAAGACGCTCATCACGGATCCAATATCGTTTCTCTGCCGCCACTACAAGGCAG : 320

MIP1 [Σ] : GTCGCTAGATGAGCATTTCAGAAAGATTGGCGGTTCAATTCTGAACCGTACAAGAGTTTTTGCAGGACAAAGTTACAGG : 400
MIP1 [S] : GTCGCTAGATGAGCATTTCAGAAAGATTGGCGGTTCAATTCTGAACCGTACAAGAGTTTTTGCAGGACAAAGTTACAGG : 400

MIP1 [Σ] : AGATGGTGGCAGCAGCCGCGGAATGGCTGCGGAAGCCAGGCTGGGTTAAATACGTACCTGGAATGGCACCCTCGAAGTG : 480
MIP1 [S] : AGATGGTGGCAGCAGCCGCGGAATGGCTGCGGAAGCCAGGCTGGGTTAAATACGTACCTGGAATGGCACCCTCGAAGTG : 480

MIP1 [Σ] : GCATACCAGACGAAGAGCTGGTGGTGTGTTGATGTAGAAACACTCTATAACGTCTCTGACTATCCGACTTTGGCCACGGC : 560
MIP1 [S] : GCATACCAGACGAAGAGCTGGTGGTGTGTTGATGTAGAAACACTCTATAACGTCTCTGACTATCCGACTTTGGCCACGGC : 560

MIP1 [Σ] : CTTGTGCATCGACGCGTGGTACCTTTGGTGTTCGCCGTTTCATATGTGGTGGTGTGATGATCCTGCTGCTGCTGATACCCCTAA : 640
MIP1 [S] : CTTGTGCATCGACGCGTGGTACCTTTGGTGTTCGCCGTTTCATATGTGGTGGTGTGATGATCCTGCTGCTGCTGATACCCCTAA : 640

MIP1 [Σ] : ACACATTGAATAAAGACAAAGTAATAATTGGTCACAATGTTGCGTATGATAGGGCACGGGTTCTCGAAGAATACAACCTTC : 720
MIP1 [S] : ACACATTGAATAAAGACAAAGTAATAATTGGTCACAATGTTGCGTATGATAGGGCACGGGTTCTCGAAGAATACAACCTTC : 720

MIP1 [Σ] : AGGGACTCGAAGGCGTTTTCTCGACACTCAATCTCTGCATATTGCATCTTTGCGGCTGTGTTCAAGACACCGTCCGAT : 800
MIP1 [S] : AGGGACTCGAAGGCGTTTTCTCGACACTCAATCTCTGCATATTGCATCTTTGCGGCTGTGTTCAAGACACCGTCCGAT : 800

MIP1 [Σ] : GTTCATGAAGAATAACAAGAAAAAGAGGCAGAAGTGAATCGGAAGTACATCCAGAAATTTCCATAGAAGATTATGACG : 880
MIP1 [S] : GTTCATGAAGAATAACAAGAAAAAGAGGCAGAAGTGAATCGGAAGTACATCCAGAAATTTCCATAGAAGATTATGACG : 880

MIP1 [Σ] : ACCCTTGGTTAAATGTGTCTGCTTTAAACTCGCTAAAGGATGTAGCGAAATTTCACTGCAAGATAGATCTTGATAAGACT : 960
MIP1 [S] : ACCCTTGGTTAAATGTGTCTGCTTTAAACTCGCTAAAGGATGTAGCGAAATTTCACTGCAAGATAGATCTTGATAAGACT : 960

MIP1 [Σ] : GATAGAGATTCTTTGCTTCCACAGATAAATCAACGATAATAGAAAAATTTCCAAAACTGGTCAACTACTGCGCCACTGA : 1040
MIP1 [S] : GATAGAGATTCTTTGCTTCCACAGATAAATCAACGATAATAGAAAAATTTCCAAAACTGGTCAACTACTGCGCCACTGA : 1040

MIP1 [Σ] : CGTAACGGCCACAAGCCAAGTGTGATAGATTTCCTGTTTTCTGAAAAAGTGTCTCATCCAGTTTTCGTTTGCAG : 1120
MIP1 [S] : CGTAACGGCCACAAGCCAAGTGTGATAGATTTCCTGTTTTCTGAAAAAGTGTCTCATCCAGTTTTCGTTTGCAG : 1120

MIP1 [Σ] : GTTTAAAGTCCTTAAGCAAATGCATTCTGCCGACGAAGCTTAACGACTGGAATGATTACTTGAACAGCTCTGAGTCTTTG : 1200
MIP1 [S] : GTTTAAAGTCCTTAAGCAAATGCATTCTGCCGACGAAGCTTAACGACTGGAATGATTACTTGAACAGCTCTGAGTCTTTG : 1200

MIP1 [Σ] : TACCAACAGTCCAAAGTCCAGATAGAATCCAAAATGTTCAAATCATAAAAGATATCGTCTGTGTAAGGACAAACCAGA : 1280
MIP1 [S] : TACCAACAGTCCAAAGTCCAGATAGAATCCAAAATGTTCAAATCATAAAAGATATCGTCTGTGTAAGGACAAACCAGA : 1280

MIP1 [Σ] : TTTTATCTCAAGGATCCCTGGTTATCACAATTGGATTGGACCACCAACCTTTAAGATTGACAAAGAAAGGTGTTCTCG : 1360
MIP1 [S] : TTTTATCTCAAGGATCCCTGGTTATCACAATTGGATTGGACCACCAACCTTTAAGATTGACAAAGAAAGGTGTTCTCG : 1360

MIP1 [Σ] : CAAAGTGTCAAAAGCTGCCCGGCTTCCAGAATGGTATAGACAACCTTTTCCCTCAAAGGACACTGTAGAACCTAAGATC : 1440
MIP1 [S] : CAAAGTGTCAAAAGCTGCCCGGCTTCCAGAATGGTATAGACAACCTTTTCCCTCAAAGGACACTGTAGAACCTAAGATC : 1440

MIP1 [Σ] : ACTATTAATCAAGAATAAATCCGATTTTGTTCAGTTATCGTGGGAGAATTCCTCCGTAATATGGTCGAAGGAGTCTGG : 1520
MIP1 [S] : ACTATTAATCAAGAATAAATCCGATTTTGTTCAGTTATCGTGGGAGAATTCCTCCGTAATATGGTCGAAGGAGTCTGG : 1520

MIP1 [Σ] : ATGGTGCTTCAACGTGCCCCATGAACAAGTAGAAACATACAAGGCTAAAAATTATGTTTGGCAGATAGGTATCTCAAG : 1600
MIP1 [S] : ATGGTGCTTCAACGTGCCCCATGAACAAGTAGAAACATACAAGGCTAAAAATTATGTTTGGCAGATAGGTATCTCAAG : 1600

MIP1 [Σ] : AGGAAGAGGAAATAAGATGAATAACCTAGGATTGCAATGCACAGGTGTTCTTTCAAAGTACCTCATCCCAATGGGCC : 1680
MIP1 [S] : AGGAAGAGGAAATAAGATGAATAACCTAGGATTGCAATGCACAGGTGTTCTTTCAAAGTACCTCATCCCAATGGGCC : 1680

MIP1 [Σ] : ACTTTTAATGTACTAATCTTTTAACCAATCGTATAACCAATTTTTTTGAAAAGGGCGTACTAAAATCTGAGTCAGAAAT : 1760
MIP1 [S] : ACTTTTAATGTACTAATCTTTTAACCAATCGTATAACCAATTTTTTTGAAAAGGGCGTACTAAAATCTGAGTCAGAAAT : 1760

MIP1 [Σ] : GGCTCATCAGGCTTTACAAATTAACCTCTCAGGCTCTTATTGGATGTGAGCAAGGAAAGAATCCAAATCCCAATTTGTAG : 1840
MIP1 [S] : GGCTCATCAGGCTTTACAAATTAACCTCTCAGGCTCTTATTGGATGTGAGCAAGGAAAGAATCCAAATCCCAATTTGTAG : 1840

MIP1 [Σ] : TCCCCAATTGTAAATTCCTAATGAGTTCAGTCTTTGTCCGCAAAATCGTCGTTAAATAATGAGAAGACAAATGATCTT : 1920
MIP1 [S] : TCCCCAATTGTGTAAATTCCTAATGAGTTCAGTCTTTGTCCGCAAAATCGTCGTTAAATAATGAGAAGACAAATGATCTT : 1920

MIP1 [Σ] : GCCATAATTATACGAAAAATCGTCCCATGGGCACAATCACTAGAAGAGCTGTGAAAAATCGTGGTTAACCGCATCCAA : 2000
MIP1 [S] : GCCATAATTATACGAAAAATCGTCCCATGGGCACAATCACTAGAAGAGCTGTGAAAAATCGTGGTTAACCGCATCCAA : 2000

MIP1 [Σ] : TGCAAAAGCAAAATAGGATAGGTTCCGAATTGAAAACTCAAGTCAAAGCTCCTCCAGGTTATTGTTTGTGGGGCGGACG : 2080
MIP1 [S] : TGCAAAAGCAAAATAGGATAGGTTCCGAATTGAAAACTCAAGTCAAAGCTCCTCCAGGTTATTGTTTGTGGGGCGGACG : 2080

MIP1 [Σ] : TGGATAGTGAGGAATTGTGGATAGCATCTTAGTCGGTGACTCCATTTCATGTTTATGGTGGTACCGCCATTGGTTGG : 2160

```

```

MIP1 [S] : TGGATAGTGAGGAATTGTGGATAGCATCTTTAGTCGGTGACTCCATTTTCAATGTTTCATGGTGGTACCGCCATTGGTTGG : 2160
MIP1 [Σ] : ATGTGTTTAGAAGGCACTAAAAACGAAGGTACAGATTGTCACACGAAGACTGCTCAAATTTTGGGGTGTTCGTAATGA : 2240
MIP1 [S] : ATGTGTTTAGAAGGCACTAAAAACGAAGGTACAGATTGTCACACGAAGACTGCTCAAATTTTGGGGTGTTCGTAATGA : 2240

MIP1 [Σ] : GGCAGAAAATTTTAAATTATGGTAGAATTTACGGCGCTGGTGCTAAATTTGCGAGTCAGTTACTTAAAGGTTTAAACCCAT : 2320
MIP1 [S] : GGCAGAAAATTTTAAATTATGGTAGAATTTACGGCGCTGGTGCTAAATTTGCGAGTCAGTTACTTAAAGGTTTAAACCCAT : 2320

MIP1 [Σ] : CTCTAACTGATGAAGAGACAAAAAATTGCGAATAAGTTATATGAAAAACGAAAGGTAAAAACGAAAGATCAAAATTA : 2400
MIP1 [S] : CTCTAACTGATGAAGAGACAAAAAATTGCGAATAAGTTATATGAAAAACGAAAGGTAAAAACGAAAGATCAAAATTA : 2400

MIP1 [Σ] : TTCAAAAAATTTTGGTATGGTGGATCTGAGTCAATTCTATTCAATAAATTAGAAAGCATCGCGGAACAAAGAACTCCAAA : 2480
MIP1 [S] : TTCAAAAAATTTTGGTATGGTGGATCTGAGTCAATTCTATTCAATAAATTAGAAAGCATCGCGGAACAAAGAACTCCAAA : 2480

MIP1 [Σ] : GACACCGGTACTGGGATGTGGTATTACCTATTCACCTTATGAAGAAAAATCTGAGGGCGAATTCCTTTCTACCTTCAAGAA : 2560
MIP1 [S] : GACACCGGTACTGGGATGTGGTATTACCTATTCACCTTATGAAGAAAAATCTGAGGGCGAATTCCTTTCTACCTTCAAGAA : 2560

MIP1 [Σ] : TCAATTGGGCCATCCAGTCATCTGGAGTGGATTATCTACATCTTCTTTGTGTGCTCCATGGAATATATTATTAAGAAATAT : 2640
MIP1 [S] : TCAATTGGGCCATCCAGTCATCTGGAGTGGATTATCTACATCTTCTTTGTGTGCTCCATGGAATATATTATTAAGAAATAT : 2640

MIP1 [Σ] : AACCTTGAGGCAAGGCTTTGCATTTCCATCCATGATGAGATTAGATTTTGGTGAGCGAAAAGGACAAATACAGAGCTGC : 2720
MIP1 [S] : AACCTTGAGGCAAGGCTTTGCATTTCCATCCATGATGAGATTAGATTTTGGTGAGCGAAAAGGACAAATACAGAGCTGC : 2720

MIP1 [Σ] : TATGGCTTTGCAAAATCAGCAACATATGGACGAGAGCAATGTTTTGCCAGCAAAATGGGGATAAATGAATTACCGCAAACT : 2800
MIP1 [S] : TATGGCTTTGCAAAATCAGCAACATATGGACGAGAGCAATGTTTTGCCAGCAAAATGGGGATAAATGAATTACCGCAAACT : 2800

MIP1 [Σ] : GTGCCTTTTCTCGCAAGTAGATATTGATTCTGTGCATACGTAAAGAAGTCAATATGGACTGCATAACCCCTCGAACAAA : 2880
MIP1 [S] : GTGCCTTTTCTCGCAAGTAGATATTGATTCTGTGCATACGTAAAGAAGTCAATATGGACTGCATAACCCCTCGAACAAA : 2880

MIP1 [Σ] : ACCGCCATTCTCATGGGAGGCGCTTGATATCAATCAACTGCTAGACAAAACCAATAGTAAATTGGGTAAACCAACTCT : 2960
MIP1 [S] : ACCGCCATTCTCATGGGAGGCGCTTGATATCAATCAACTGCTAGACAAAACCAATAGTAAATTGGGTAAACCAACTCT : 2960

MIP1 [Σ] : CGATATCGACAGCAAAAGTATCACAATATGCCTATAACTACAGAGAACCTGTATTTGAAGAATATAATAAATCTTATATCT : 3040
MIP1 [S] : CGATATCGACAGCAAAAGTATCACAATATGCCTATAACTACAGAGAACCTGTATTTGAAGAATATAATAAATCTTATATCT : 3040

MIP1 [Σ] : CAGAGTTCTTAAATATTTTCTTGCGATGCAAGTCCAGTCAGATAAGCGCGATGTGAATCGGCTAGAAGATGAGTATCTG : 3120
MIP1 [S] : CAGAGTTCTTAAATATTTTCTTGCGATGCAAGTCCAGTCAGATAAGCGCGATGTGAATCGGCTAGAAGATGAGTATCTG : 3120

MIP1 [Σ] : CGGGAGTGTACATCCAAAGAATACGCTAGAGATGGGAACACTGCAGAGTACAGCCTCCTAGACTATATAAAGGATGTCTGA : 3200
MIP1 [S] : CGGGAGTGTACATCCAAAGAATACGCTAGAGATGGGAACACTGCAGAGTACAGCCTCCTAGACTATATAAAGGATGTCTGA : 3200

MIP1 [Σ] : GAAGGGCAAAAGGACTAAAGTACGTATTATGGGATCCAATTTTTTAGATGGTACCAAAAATGCCAAAGCTGATCAACGAA : 3280
MIP1 [S] : GAAGGGCAAAAGGACTAAAGTACGTATTATGGGATCCAATTTTTTAGATGGTACCAAAAATGCCAAAGCTGATCAACGAA : 3280

MIP1 [Σ] : TCAGATTACCTGTCAATATGCCAGATTATCCACACTTCATAAAATTGCTAACGATTAGCAATTCAGAAAAGCAATTG : 3360
MIP1 [S] : TCAGATTACCTGTCAATATGCCAGATTATCCACACTTCATAAAATTGCTAACGATTAGCAATTCAGAAAAGCAATTG : 3360

MIP1 [Σ] : CTGGAGAACAGGAGAAAAGGAACACAGGATAGATGACGAAAATAAGAAAAAATTAACCAGAAAAAGAAATACCAACGCC : 3440
MIP1 [S] : CTGGAGAACAGGAGAAAAGGAACACAGGATAGATGACGAAAATAAGAAAAAATTAACCAGAAAAAGAAATACCAACGCC : 3440

MIP1 [Σ] : TATGGAAGGAAGTACAAAAGAGTGTATGGTGGCAGGAAGGCATTTGAAGCGTTCTATGAATGTGCAAAATAAACCTTAG : 3520
MIP1 [S] : TATGGAAGGAAGTACAAAAGAGTGTATGGTGGCAGGAAGGCATTTGAAGCGTTCTATGAATGTGCAAAATAAACCTTAG : 3520

MIP1 [Σ] : ACTATACTTTGGAGACAGAAAAACAATTCTTTAATATTCTATAGATGGAGTGATTGACGACGTTCTGAACGACAAATCT : 3600
MIP1 [S] : ACTATACTTTGGAGACAGAAAAACAATTCTTTAATATTCTATAGATGGAGTGATTGACGACGTTCTGAACGACAAATCT : 3600

MIP1 [Σ] : AATTATAAAAAGAAACCATCACAGCAAGAACGGCATCATCATCGCCAATAAGAAAGACTGCGAAAGCAGTACATTCCAA : 3680
MIP1 [S] : AATTATAAAAAGAAACCATCACAGCAAGAACGGCATCATCATCGCCAATAAGAAAGACTGCGAAAGCAGTACATTCCAA : 3680

MIP1 [Σ] : AAAATTGCCGGCAAGGAAGTCAAGCACTACAAATAGAAATTTGGTTGAGCTGGAAGGGACATTACTATTCTAGAGAGT : 3760
MIP1 [S] : AAAATTGCCGGCAAGGAAGTCAAGCACTACAAATAGAAATTTGGTTGAGCTGGAAGGGACATTACTATTCTAGAGAGT : 3760

MIP1 [Σ] : ACTAG : 3765
MIP1 [S] : ACTAG : 3765

```

Figura 7. 1: Allineamento degli alleli *MIP1*[S] e *MIP1*[Σ]. In verde gli SNP silenti, in giallo gli SNP non silenti.

Dall'allineamento emerge che fra le due sequenze sono presenti 26 SNP. 16 di questi SNP sono silenti, e dunque non provocano sostituzioni nella sequenza aminoacidica. 10 SNP sono non silenti e causano altrettante sostituzioni nella sequenza aminoacidica. Le sostituzioni sono riportate in allegato 3, tabella 1, in cui il primo aminoacido si riferisce a Mip1[Σ].

Le due isoforme proteiche sono state allineate con tutte le pol γ note di funghi e animali mediante il programma ClustalW al sito <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>. Sette dei 10 residui identificati come polimorfici nell'allineamento fra Mip1[Σ] e Mip1[S] (F8, A35, M540, N541, N616, P978 e S986, in cui l'aminoacido si riferisce alla sequenza di Mip1[Σ]) erano scarsamente o non erano affatto conservati nelle varie polimerasi, suggerendo che questi residui probabilmente non svolgono un ruolo importante nella catalisi ad opera di

Mip1. Il residuo V222 è alternativamente occupato da valina, come in Mip1[Σ], o da isoleucina, come in Mip1[S], in quasi tutte le polimerasi fungine e animali, suggerendo che sia valina che isoleucina, che hanno caratteristiche fisiche e di ingombro simili, possano sostenere al meglio la catalisi (figura 7.2).

<i>S.cerevisiae</i> S288C	218:KEQV I IGHN	353:QVFD E IFPV	657:AVEN A WLTA
<i>S.cerevisiae</i> Σ1278b	218:KEQV V IGHN	353:QVFD K IFPV	657:AVEN T WLTA
<i>Kluyveromyces lactis</i>	220:RPKL I VGHN	359:KVFD E VFPK	648:SVEN T WLTA
<i>Candida albicans</i>	248:KPKV I IGYN	424:EVT K KLFPV	731:ATEN T WLTA
<i>Candida glabrata</i>	232:KEKL I IGHN	372:KVFD K VFPS	683:AVES T WLTA
<i>Eremothecium gossypii</i>	221:RPQV I IGHN	356:KVFD K VYPL	645:AVEN T WLTA
<i>Pichia pastoris</i>	194:TEKF I VGHN	346:KV FQ KVY PK	627:AVEN T WLTA
<i>Debaryomyces hansenii</i>	229:NP KL I IGYN	381:SVTA K LFSQ	695:ATEN T WLTA
<i>Yarrowia lipolytica</i>	222:EP RV I VGHN	374:QV FK K ILPL	666:CVEN T WLTA
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	217:KGALFVGHN	361:QV FK K VFPQ	645:AVEN T WLTA
<i>Neurospora crassa</i>	237:VD RI I VGHN	383:QVYQ V VFPN	704:AV ER TWLTA
<i>Aspergillus fumigatus</i>	241:QP RI V VGHN	387:RVY K K VFPN	682:AVEN T WLTA
<i>Aspergillus terreus</i>	236:QP RI V IGHN	384:RVY K K VFPN	676:AVEN T WLTA
<i>Aspergillus oryzae</i>	236:QP RI V VGHN	384:RVY K K VFPN	676:AVEN T WLTA
<i>Aspergillus nidulans</i>	236:KP RI I VGHN	384:RVY K K VFLN	678:AVEN T WLTA
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	233:QH RI I VGHN	381:RVYQ K VFPL	679:SVEN T WLTA
<i>Coccidioides immitis</i>	240:NS RI V VGHN	386:RVY R K VFPN	684:AVEN T WLTA
<i>Gibberella zeae</i>	222:KD RI I VGHN	367:RVYQ I VFPN	763:AVEN T WLTA
<i>Magnaporthe grisea</i>	275:KD RI I VGHN	421:RVYS I VFPN	727:AVEN T WLTA
<i>Chaetomium globosum</i>	244:K ERV I VGHN	390:RVYQ V VFPN	693:AVEN T WLTA
<i>Cryptococcus neoformans</i>	291:IP RI V IGHN	457:DVYA K VFPL	958:AVE A TWLTA
<i>Drosophila melanogaster</i>	251:GPGL V VGHN	372:RILRVLYPL	772:AME P TWMTA
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	256:GPGL V VGHN	377:RVLRVLYPM	777:AME P TWMTA
<i>Anopheles gambiae</i>	198:RPRV V IGHN	319:AVLQRLWPL	704:AME P TWMTA
<i>Tribolium castaneum</i>	190:KPK I I IGHN	300:SVLN E LFPN	681:AVE P TWMTA
<i>Apis mellifera</i>	200:KPK I I VGHN	319:NVLC K LFPI	717:AVE P TWMTA
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	292:TERL I VGHN	432:KVIS K LLPM	797:AVE P TWLTA
<i>Xenopus laevis</i>	236:TERL V VGHN	379:EV FQ E QFPL	824:AVE P TWLTA
<i>Mus musculus</i>	245:QEQL V VGHN	388:EV FQ QQLPL	833:AVE P TWLTA
<i>Rattus norvegicus</i>	245:QEQL V VGHN	387:EV FQ QQLPL	831:AVE P TWLTA
<i>Canis familiaris</i>	261:QEQL V VGHN	403:EIFQ Q QLPL	855:AVE P TWLTA
<i>Bos taurus</i>	246:Q ERL V VGHN	388:EV FQ QQLPL	838:AVE P TWLTA
<i>Macaca mulatta</i>	251:QEQL V VGHN	394:EV FQ QQLPL	843:AVE P TWLTA
<i>Pan troglodytes</i>	259:QEQL V VGHN	402:EV FQ QQLPL	851:AVE P TWLTA
<i>Homo sapiens</i>	262:QEQL V VGHN	405:EV FQ QQLPL	854:AVE P TWLTA

Figura 7. 2: Allineamento di DNA polimerasi γ di *S. cerevisiae*, fungine e animali. Vengono riportate le regioni attorno al residuo V222, K357 e T661. In grassetto i residui conservati in più polimerasi.

Il residuo K357 è alternativamente occupato da lisina, come in Mip1[Σ], o da glutammato, come in Mip1[S], in quasi tutte le polimerasi fungine, suggerendo che sia una carica positiva che negativa viene accettata in questa posizione, almeno nelle polimerasi fungine (figura 7.2). Al contrario, il residuo T661 è occupato da treonina in tutte le polimerasi, eccetto che in Mip1[S], dove è presente alanina (figura 7.2). Anche lo *stretch* attorno a T661 è altamente conservato, suggerendo che questa regione svolga un ruolo importante nel processo catalitico. In particolare la perdita di un gruppo *alcolico* in seguito alla sostituzione di treonina con alanina potrebbe essere deleteria per la catalisi.

7.3 Analisi della mutabilità mitocondriale associata all'allele *MIP1[S]^{A661T}*

Per valutare se la sostituzione T661A fosse responsabile di una ridotta capacità della polimerasi Mip1[S] di replicare correttamente il mtDNA è stata creata una variante allelica in cui l'alanina 661 di Mip1[S] è sostituita con treonina, chiamata *MIP1[S]^{A661T}*. L'allele *MIP1[S]^{A661T}* è stato ottenuto mediante mutagenesi sito-specifica mediante la tecnica dell'*overlap* delle estremità (Ho *et al.*, 1989).

L'analisi ha mostrato che il ceppo DWM-5A contenente l'allele *MIP1[S]^{A661T}* mostrava la stessa frequenza di *petite* e di ρ^0 del ceppo contenente l'allele *MIP1[Σ]* (allegato 3, figura 1 A e B). Questo dimostra che l'alta mutabilità estesa associata all'allele *MIP1[S]* è dovuta alla presenza di alanina in posizione 661. Dalla misurazione della frequenza dei mutanti Ery^R (allegato 3, figura 1 C) è emerso che la sostituzione A661R riduceva la frequenza delle mutazioni puntiformi, sebbene non come si era osservato nel ceppo recante l'allele *MIP1[Σ]*. Quindi la presenza di Ala661 è deleteria anche per la fedeltà della replicazione, sebbene probabilmente altri residui influenzino la fedeltà.

L'analisi precedente dimostra chiaramente che l'alta mutabilità dell'mtDNA associata all'allele *MIP1[S]*, soprattutto ad alte temperature, è dovuta alla sostituzione A661T nella proteina. Questo risultato è stato confermato da due set di esperimenti.

- 1) La frequenza dei *petite* è stata misurata a 28°C e a 36°C in cinque ceppi di laboratorio, W303-1B, BY4742, D273-10B/A1, FL100 e Σ1278b (Sherman, 1964). Come mostrato in allegato 3, tabella 2, i ceppi D273-10B/A1, FL100 e Σ1278b producono *petite* a bassa frequenza, sia a 28°C che a 36°C. Al contrario i ceppi W303-1B e BY4742 producono alti livelli di *petite*, soprattutto a 36°C. Mentre la sequenza di BY4742, isogenico a S288c, contiene alanina, la sequenza degli altri ceppi, che è stata determinata mediante sequenziamento e presenta gli stessi residui di *MIP1[Σ]*, contiene treonina. Di conseguenza, l'alta mutabilità mitocondriale è sempre associata alla presenza di alanina in posizione 661.
- 2) Gli alleli *MIP1[S]* e *MIP1[S]^{A661T}*, clonati nel plasmide centromerico pFL38, sono stati introdotti nel ceppo D273-10B/A1, uno dei ceppi che mostra la minore frequenza di *petite* spontanei (Sherman, 1964). E' stato quindi deleto l'allele *MIP1[Σ]* al locus genomico e analizzata la frequenza di *petite* a 28°C e a 36°C. Sono stati ottenuti risultati molto simili a quelli ottenuti nel ceppo DWM-5A (allegato 3, tabella 3). In particolare a 28°C l'allele *MIP1[S]* determinava una frequenza di circa 3 volte maggiore rispetto alla frequenza dei *petite* dovuti all'allele pFL38*MIP1[S]^{A661T}*. Inoltre, mentre l'accumulo di *petite* era insensibile alla temperatura nel ceppo contenente l'allele *MIP1[S]^{A661T}*, nel ceppo contenente l'allele *MIP1[S]* si osserva un incremento di circa 5 volte a 36°C rispetto a 28°C.

7.4 Dominanza/recessività della mutazione T661A

E' stata determinata la frequenza dei mutanti *petite* e dei mutanti Ery^R nel ceppo DWM-5A trasformato con due copie dell'allele *MIP1*[S], con una copia dell'allele *MIP1*[S] e con una dell'allele *MIP1*[S]^{A661T}, oppure con due copie dell'allele *MIP1*[S]^{A661T} (tabella 7.1):

Ceppo	Frequenza dei <i>petite</i> (%)		Frequenza Ery ^R
	28°C	36°C	
DWM-5A/ <i>MIP1</i> [S]/ <i>MIP1</i> [S]	1,0	5,2	2,2 x 10 ⁸
DWM-5A/ <i>MIP1</i> [S]/ <i>MIP1</i> [S] ^{A661T}	0,7	1,0	1,2 x 10 ⁸
DWM-5A/ <i>MIP1</i> [S] ^{A661T} / <i>MIP1</i> [S] ^{A661T}	0,4	0,5	ND

Tabella 7. 1: Frequenza dei mutanti *petite* e dei mutanti Ery^R nel ceppo DWM-5A trasformato con due copie dei diversi alleli *MIP1*[S] e *MIP1*[S]^{A661T}. ND: non determinato.

Dall'analisi emerge che la sostituzione T661A è recessiva, poiché il ceppo DWM-5A/*MIP1*[S]/*MIP1*[S]^{A661T} mostra valori molto vicini a quelli del ceppo DWM-5A/*MIP1*[S]^{A661T}/*MIP1*[S]^{A661T}, soprattutto a 36°C.

Inoltre è possibile osservare un effetto di dosaggio genico. Il ceppo recante due copie di *MIP1*[S] (allegato 3, figura 1) mostra una riduzione della frequenza di *petite* di circa 4 volte a 36°C rispetto al ceppo con una sola copia di *MIP1*[S]. Lo stesso vale per l'allele *MIP1*[S]^{A661T}, ma in questo caso le differenze sono molto più scarse visto i bassi valori basali del ceppo recante una sola copia di *MIP1*[S]^{A661T}.

7.5 Efficienza catalitica delle polimerasi Mip1[S], Mip1[Σ] e Mip1[S]^{A661T}

E' facilmente ipotizzabile che l'aumento della mutabilità estesa in presenza dell'allele *MIP1*[S] sia dovuto ad una ridotta efficienza dell'attività catalitica della polimerasi Mip1[S]. Pertanto è stata misurata l'attività catalitica delle tre isoforme polimerasiche. Come nel caso precedente (capitolo 5), i tre alleli sono stati inseriti nel plasmide pLGALZ3 sotto il controllo del promotore inducibile *GAL1*. I ceppi W303-1B/plGAL*MIP1*[Σ], W303-1B/plGAL*MIP1*[S]^{A661T}, W303-1B/plGAL*MIP1*[S] e W303-1B/plGALZ3 sono stati fatti crescere in galattosio per 15 ore per indurre l'espressione della proteina. Successivamente, sono state estratte le proteine solubili totali, sulle quali è stata fatta un'analisi *Western* per determinare la quantità relativa di Mip1 (figura 7.3 A).

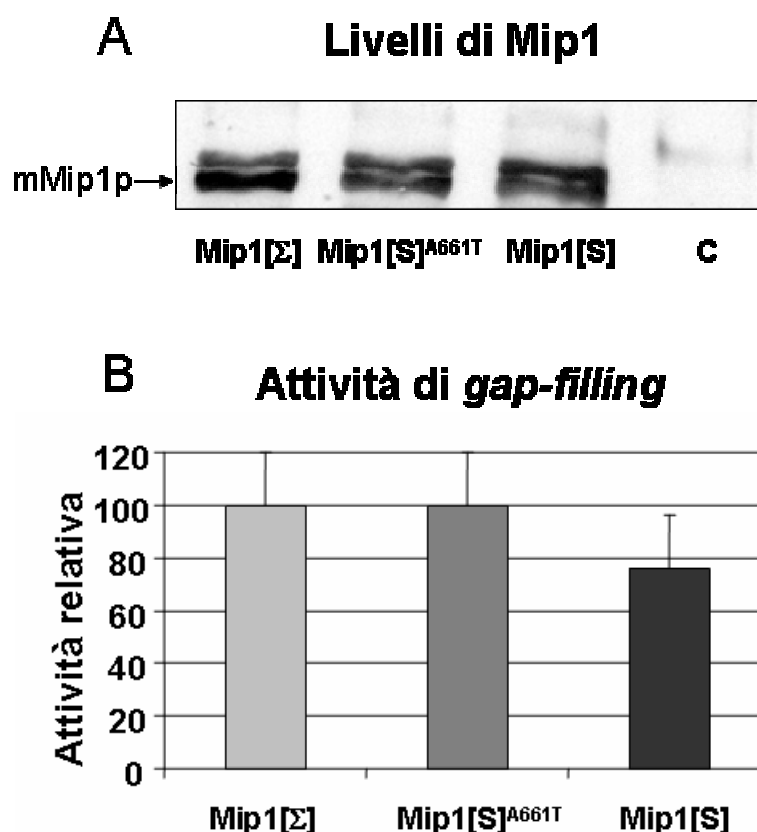


Figura 7. 3: (A) *Western blot* sulla proteina Mip1 estratta dai ceppi W303-1B/pGALMIP1[Σ], W303-1B/pGALMIP1[S]^{A661T}, W303-1B/pGALMIP1[S] e W303-1B/pGALZ3 dopo induzione da galattosio; (B) *gap filling activity* sugli estratti dei ceppi W303-1B/pGALMIP1[Σ], W303-1B/pGALMIP1[S]^{A661T}, W303-1B/pGALMIP1[S]. I valori sono stati normalizzati in base alla quantità relativa di proteina Mip1 presente negli estratti. I valori derivano da due esperimenti indipendenti.

L'immagine indica che le proteine sono presenti in quantità equivalenti. (E' stato condotto in parallelo un *Western*, non mostrato, con diverse quantità di Mip1p così da risalire alla quantità esatta di ciascuna lane mediante confronto). E' da notare che, in questo caso, sono osservabili due bande distinte, riconducibili la più alta alla proteina Mip1 intera, cioè contenente il segnale MTS per l'entrata nei mitocondri, e l'altra alla proteina tagliata e funzionale.

L'efficienza catalitica è stata misurata attraverso saggi di *gap filling* su *calf thymus* DNA attivato come incorporazione dei dNTP in strutture duplex con gap alle estremità a 30°C. Come mostrato in figura 7.3 B, l'efficienza catalitica di Mip1[S] era inferiore di circa il 20% rispetto all'efficienza catalitica di Mip1[Σ] e di Mip1[S]^{A661T}, che risultava simile. Questi risultati dimostrano come la sostituzione della treonina in posizione 661 con alanina riduca l'attività catalitica della proteina.

7.6 Analisi del polimorfismo 661 in ceppi naturali

E' stata condotta un'analisi del polimorfismo del residuo Mip1661 in una serie di ceppi naturali: 20 ceppi enologici o per la panificazione di origine italiana, un ceppo enologico di riferimento di origine canadese (L1056) e il ceppo EM93, un ceppo isolato in California da

fichi marci (Mortimer and Johnston, 1986). Questo ceppo è il progenitore di S288c, che ha ereditato l'88% del suo genoma. E' stato analizzato se i ceppi naturali posseggono in posizione 661 alanina o treonina. Alla T661 è associata in posizione 1981 di *MIP1* una A, mentre alla A661 è associata in posizione 1981 di *MIP1* una G. Alla presenza di A in posizione 1981 è associato un sito per l'enzima di restrizione *BsaAI*. In presenza di G in posizione 1981, questo sito di restrizione è perso.

Una regione di 1234 bp contenente il polimorfismo è stata amplificata mediante PCR su colonia sui 22 ceppi naturali. I 22 amplificati sono stati digeriti con *BsaAI* e tutti, tranne EM93, mostravano un pattern di digestione costituito da una banda di 937 bp e una di 347 bp, che in allegato 3, figura 2 A è rappresentato dal pattern del ceppo M28. Tutti i ceppi naturali, eccetto EM93, posseggono pertanto treonina in posizione 661. EM93 mostrava un pattern costituito dalle due bande di 937 bp e 347 bp, ma anche da una banda non digerita di 1234 bp (allegato 3, figura 2 A). Questa osservazione suggeriva che in EM93, che è diploide, sono presenti due alleli *MIP1*, uno contenente treonina e l'altro alanina.

Per escludere che la banda non digerita osservata in EM93 derivasse da una digestione parziale, la regione attorno alla posizione 1981 di *MIP1* è stata sequenziata nel ceppo EM93. Come controlli sono stati inoltre sequenziati il DNA del ceppo S288c, che possiede G in posizione 1991, e $\Sigma 1278b$, che possiede A. Come mostrato in allegato 3, figura 2 B, il ceppo EM93 mostra in posizione 1981 due picchi, uno corrispondente ad A e l'altro a G. Questa osservazione ha dimostrato che in EM93 sono presenti due alleli.

Il ceppo EM93 è stato fatto sporificare e 20 aschi sono stati dissezionati. Le 20 tetradi erano costituite solo da due colonie crescenti, facendo supporre che in EM93 sia presente in eterozigosi una mutazione letale recessiva. Su otto spore di quattro tetradi è stata fatta l'analisi di restrizione con *BsaAI*, riportata in figura 7.4.

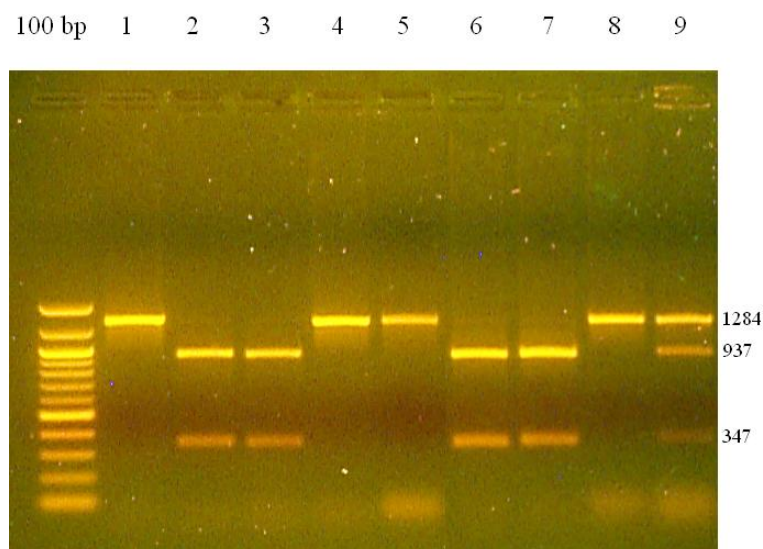


Figura 7. 4: Analisi di restrizione su otto spore di quattro tetradi derivanti dalla sporificazione di EM93. La regione amplificata con i primer MIPH e MIPL è stata digerita con *BsaAI*. Lane 1 e 2: spore della tetrad A; lane 3 e 4: spore della tetrad B; lane 5 e 6: spore della tetrad C; lane 7 e 8: spore della tetrad D; lane 9: EM93.

Come mostrato chiaramente in figura, il 50% delle spore possedeva l'allele codificante per Mip1 contenente alanina e il 50% delle spore possedeva l'allele codificante per Mip1 contenente treonina.

Recentemente l'istituto Sanger ha rilasciato pubblicamente le sequenze parziali di 37 ceppi di *S. cerevisiae* (<http://www.sanger.ac.uk/Teams/Team71/durbin/sgrp/index.shtml>), di cui 32 naturali isolati in varie parti del mondo, e cinque di laboratorio. Fra questi ultimi vi sono W303, S288c, YPGM, probabilmente isogenico a S288c, SK1 e Y55. Mediante analisi bioinformatica, sono stati cercati quei ceppi per i quali *MIP1*, o parte di *MIP1*, è stato sequenziato. 25 dei 37 ceppi mostravano la sequenza di *MIP1* attorno alla posizione 1981. I 21 ceppi naturali mostravano la presenza di A in posizione 1981, a cui corrisponde treonina. W303, S288c, YPGM, come atteso, mostravano la presenza di una G, a cui corrisponde alanina, mentre SK1 mostrava la presenza di A.

Questa analisi, insieme alla precedente analisi di restrizione, ha dimostrato che i ceppi naturali contengono treonina in posizione 661, eccetto EM93 che possiede un isoforma con alanina e una con treonina.

7.7 Analisi degli altri SNP di *MIP1*

E' stato valutato quali polimorfismi sono presenti nelle altre posizioni di *MIP1* nei ceppi naturali. In primo luogo il gene *MIP1* è stato sequenziato nei ceppi enologici M55, NWS Chardonnay e L1056. Tutti e tre i ceppi mostravano gli stessi polimorfismi osservati nell'allele *MIP1*[S], eccetto per la presenza di alanina in posizione 661. La sequenza dei tre ceppi è uguale pertanto alla sequenza dell'allele *MIP1*[S]^{A661T}. Sebbene siano stati sequenziati solo tre ceppi, questa osservazione sembra far ipotizzare che nella maggior parte dei ceppi, compreso EM93, sia presente la stessa sequenza osservata in S288c (eccetto ovviamente l'alanina). I 21 ceppi naturali per cui è disponibile la sequenza all'istituto Sanger mostravano invece diverse combinazioni di polimorfismi, come riportato in tabella 7.2.

Ceppo	Origine	SNP	Ceppo	Origine	SNP
BC187	Napa Valley, USA	S	UWOPS83-787.3	Bahamas	S e Σ
DBVPG1373	Olanda	?	UWOPS87-2421	Hawaii	S e Σ
DBVPG1788	Finlandia	S	Y12	Africa	S
DBVPG1853	Etiopia	S	Y9	Giappone	S e Σ
DBVPG6040	Olanda	S	YIIC17-E5	Sauternes, Francia	S
DBVPG6044	Africa occidentale	S	YJM975	Bergamo, Italia	?
K11	Giappone	S e Σ	YJM981	Bergamo, Italia	?
L-1528	Cile	S	YPS128	Pennsylvania, USA	?
NCYC361	Irlanda	S	YPS606	Pennsylvania, USA	?
UWOPS05-217.3	Malesia	S e Σ	YS9	Singapore	S
	UWOPS05-227.2	Malesia			?

Tabella 7. 2: SNP presenti nei ceppi dell'istituto Sanger. S significa che gli SNP sono gli stessi di quelli presenti in *MIP1*[S]; S e Σ significa che parte degli SNP sono di *MIP1*[S] e parte di *MIP1*[Σ].

La maggior parte dei ceppi mostravano gli stessi polimorfismi presenti in *MIP1*[S], confermando l'ipotesi precedente. Alcuni ceppi, in particolare di origine orientale, mostravano combinazioni di SNP di *MIP1*[S] e di SNP di *MIP1*[Σ]. Sebbene non mostrato, i diversi ceppi “misti” presentano combinazioni diverse le une dalle altre e ceppo-specifiche. In nessuno dei ceppi naturali sono stati identificati gli stessi SNP di *MIP1*[Σ].

7.8 Allelismo di *MMC1* e *MIP1*

Negli anni '80 nel nostro dipartimento è stato identificato un gene, *MMC1*, la cui mutazione incrementava l'accumulo dei *petite* (Marmioli *et al.*, 1980). In questo studio venne dimostrato come alcuni ceppi aploidi di laboratorio, fra cui S288c, presentassero alte frequenze di *petite* (8-10%), a cui era associata anche una maggiore produzione di mutanti Ery^R e Cap^R, e vennero chiamati “alto produttori” (di *petite*). Quando venivano incrociati con ceppi di laboratorio “basso produttori” i diploidi che si formavano erano “basso produttori”, indicando che la mutazione/le mutazioni presenti nei ceppi “alto produttori” erano recessive. Mediante l'analisi delle tetradi è stato dimostrato inoltre che era mutato un solo allele, che venne chiamato *mmc1* (Mitochondrial Mutability Control): i ceppi *MMC1* erano “basso produttori”, i ceppi *mmc1* “alto produttori”, e i ceppi *MMC1/mmc1* erano “basso produttori”. Studi successivi hanno dimostrato come all'allele *mmc1* sia associato ad un maggiore accumulo di cloni *petite* in seguito a trattamento con sostanze mutagene o UV (Donnini *et al.*, 1983).

Molte delle caratteristiche dei ceppi *mmc1* sono simili a quelle dei ceppi di laboratorio recanti l'allele *MIP1*[S]:

- entrambi i ceppi producono *petite* ad alta frequenza;
- ad entrambi gli alleli è associata una maggiore infedeltà di replicazione;
- i due alleli sono recessivi sia per quanto concerne la mutabilità estesa che quella puntiforme;

Per analizzare se *mmc1* fosse allelico a *MIP1*[S], e *MMC1* a *MIP1*[Σ], o *MIP1*[S]^{A661T}, è stato determinato mediante amplificazione e analisi di restrizione con *BsaAI* quale nucleotide fosse presente in posizione 661 del gene *MIP1* dei ceppi K8-6C e 10022 (*mmc1*) e dei ceppi 5595/4c, 5595/8c e 5594/4a (*MMC1*).

E' stato trovato che i ceppi *mmc1* “alto produttori” posseggono G in posizione 1981 di *MIP1*, dunque alanina in posizione 661, mentre i ceppi *MMC1* “basso produttori” posseggono A in posizione 1981, dunque treonina. Questa osservazione, sebbene non conclusiva, depone fortemente a favore dell'allelismo fra i geni *MMC1* e *MIP1*.

7.9 Effetto dell'alanina 661 sullo studio di mutazioni associate a patologie mitocondriali

Nel capitolo 5 sono stati studiati gli effetti delle mutazioni G651S, A692T, H734Y, G807R e E900G da sole o in associazione. Come allele wt, in cui sono state inserite le mutazioni, è

stato utilizzato l'allele clonato da W303-1B, dunque *MIP1*[S], contenente alanina in posizione 661. Per valutare se i fenotipi osservati potessero essere influenzati dalla presenza dell'alanina in posizione 661, tutte le mutazioni sono state inserite anche nel *background* *MIP1*[S]^{A661T}. La frequenza di *petite* e di mutanti Ery^R, misurata in presenza di questi alleli, è riportata in allegato 2, tabella 6 e in tabella 7.3.

Mutazione	Contesto <i>MIP1</i> [S]		Contesto <i>MIP1</i> [S] ^{A661T}	
	% <i>petite</i> a 28°C	% <i>petite</i> a 36°C	% <i>petite</i> a 28°C	% <i>petite</i> a 36°C
<i>MIP1</i>	2,7 ± 0,3	21,0 ± 2,4	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1
<i>mip1</i> ^{G651S}	100 ± 0	–	45,7 ± 4,9	99,7 ± 0,2
<i>mip1</i> ^{A692T}	80,3 ± 1,7	99,7 ± 0,1	17,1 ± 1,6	40,1 ± 0,3
<i>mip1</i> ^{H734Y}	99,7 ± 0,1	100 ± 0	97,8 ± 0,4	98,8 ± 0,3
<i>mip1</i> ^{G807R}	25,5 ± 2,8	99,2 ± 0,2	2,1 ± 0,2	9,5 ± 0,8
<i>mip1</i> ^{E900G}	6,0 ± 0,6	91,7 ± 3,9	1,3 ± 0,1	5,0 ± 0,1
<i>mip1</i> ^{A692T-E900G}	96,6 ± 1,5	100 ± 0	35,5 ± 2,0	78,1 ± 3,2

Figura 7. 3: Frequenza dei *petite* degli alleli mutanti *MIP1*, *mip1*^{G651S}, *mip1*^{A692T}, *mip1*^{H734Y}, *mip1*^{G807R}, *mip1*^{E900G} e *mip1*^{A692T-E900G} nel *background* *MIP1*[S] o *MIP1*[S]^{A661T}.

Per quanto concerne l'accumulo di *petite*, tutte le frequenze sono spostate verso valori più bassi nel contesto *MIP1*[S]^{A661T}, sia a 28°C che a 36°C. In particolare l'allele *mip1*^{G651S} determina una frequenza di *petite* non più del 100%, ma di circa il 40% a 28°C e di circa il 99% a 36°C. La frequenza è decisamente più bassa per la mutazione G807R (27% contro 2,1% a 28°C), con un incremento rispetto al wt di 10 e 3 volte circa. La frequenza è minore anche per la mutazione E900G, ma in questo caso l'incremento rispetto al wt è 2 in entrambi i contesti. Anche nel contesto *MIP1*[S]^{A661T}, la mutazione E900G si comporta come modificatore fenotipico della mutazione A692T *in cis*, in quanto raddoppia la frequenza di *petite*, sia a 28°C che a 36°C. Infine tutti i mutanti, esclusi i mutanti recanti la mutazione H734Y, mostravano un fenotipo termosensibile, come già osservato nel contesto *MIP1*[S].

Per quanto concerne la frequenza di mutanti Ery^R, tutte le mutazioni incrementavano la frequenza di mutazioni puntiformi, ma anche in questo caso verso valori più bassi. Inoltre nel contesto *MIP1*[S]^{A661T} è stato possibile studiare l'effetto della mutazione G651S, che determinava un incremento di mutanti Ery^R di circa 15 volte.

Inoltre è stata studiata la dominanza/recessività delle mutazioni nel contesto *MIP1*[S]^{A661T} per quanto concerne l'accumulo di *petite* (tabella 7.4).

Ceppo DWM-5A	% <i>petites</i> (28°C)
<i>MIP1/MIP1</i>	0,54
<i>MIP1/pFL39</i>	0,81
<i>MIP1/mip1^{G651S}</i>	0,68
<i>MIP1/mip1^{A692T}</i>	1,42
<i>MIP1/mip1^{H734Y}</i>	4,32
<i>MIP1/mip1^{G807R}</i>	0,52
<i>MIP1/mip1^{E900G}</i>	0,49
<i>MIP1/mip1^{A692T-E900G}</i>	1,58

Tabella 7. 4: Frequenze dei *petite* nei ceppi aploidi eteroallelici DWM-5A contenenti gli alleli mutati nel contesto *MIP1[S]^{A661T}*.

Come nel contesto *MIP1[S]*, le mutazioni G651S, G807R e E900G sono recessive, mentre le mutazioni A692T e H734Y sono dominanti.

7.10 Discussione

E' noto che diversi ceppi di *S. cerevisiae* accumulano cloni *petite* con diversa frequenza. Questo non è sorprendente visto l'elevato numero di geni in grado di influenzare la stabilità dell'mtDNA (Contamine and Picard, 2000). E' inoltre generalmente riconosciuto che i ceppi naturali producano *petite* a bassa frequenza, inferiore all'1%. Per quanto concerne invece i ceppi di laboratorio, le percentuali sono molto variabili: alcuni ceppi presentano frequenze comprese fra 0,5-1%, altri presentano frequenze anche molto superiori a questi valori (Sherman 1964; Marmiroli *et al.*, 1980).

In questo studio è stato dimostrato che nei ceppi di laboratorio più utilizzati sono presenti due alleli *MIP1*, uno chiamato *MIP1[S]*, in quanto presente nel ceppo S288c, l'altro *MIP1[Σ]*, in quanto presente nel ceppo Σ1278b. I due alleli posseggono 26 SNP e codificano per due isoforme di Mip1 che presentano 10 differenze aminoacidiche. L'elevato numero di polimorfismi in *MIP1* non sorprende visto che i genomi dei due ceppi sono altamente divergenti (Schacherer *et al.*, 2007). I ceppi Σ1278b, D273-10B/A1 e FL100, che posseggono l'allele *MIP1[Σ]*, posseggono un genoma mitocondriale relativamente stabile, producendo *petite* spontanei con una frequenza inferiore all'1%, anche a 36°C. Al contrario i ceppi S288c, W303-1B e BY4742, che posseggono l'allele *MIP1[S]*, mostrano un'elevata produzione di *petite*, soprattutto ad alte temperature, e una ridotta fedeltà della replicazione dell'mtDNA.

E' stato poi dimostrato come un singolo SNP, la transizione A→G in posizione 1981 di *MIP1*, fosse responsabile della ridotta stabilità dell'mtDNA nel ceppo S288c e nei ceppi da esso derivati. La transizione A1981→G determina la sostituzione della treonina 661, estremamente conservata nelle polimerasi γ fungine e animali, con alanina. Questa sostituzione ha profonde conseguenze sulla mutabilità mitocondriale:

- 1) Alla presenza di alanina è associato una maggiore frequenza di *petite* (circa 3-4 volte) a 28°C.
- 2) I ceppi recanti l'allele *MIP1* codificante per l'isoforma proteica contenente alanina mostrano un elevato incremento di *petite* a temperature elevate, a fronte di un incremento molto limitato nei ceppi recanti l'allele *MIP1* codificante per l'isoforma contenente treonina.
- 3) Ad alte temperature l'allele *MIP1* codificante per l'isoforma contenente alanina induce una maggiore perdita di mtDNA, come dimostrato dall'aumento di cloni rho⁰.
- 4) La proteina Mip1 contenente alanina è meno fedele, come dimostrato da un maggiore comparsa di mutanti Ery^R.

Anche lo *stretch* attorno alla posizione 661 è estremamente conservato, suggerendo che questa regione svolga un ruolo importante nel processo catalitico. Per valutare questa ipotesi è stata misurata mediante saggio di *gap filling* l'attività delle diverse isoforme di Mip1. Dall'analisi *in vitro* è emerso chiaramente che la polimerasi contenente alanina possiede una capacità di incorporare dNTP in un DNA attivato ridotta di circa il 20% rispetto alla polimerasi contenente treonina. L'analisi è stata fatta a 30°C, poiché a temperature più elevate la polimerasi è instabile (Francoise Foury, comunicazione personale). Questo risultato chiarisce perché in presenza di alanina a 28°C si osservi una maggiore frequenza di *petite*. L'elevato incremento che si osserva a temperature più alte può essere interpretato in termini di *unfolding*. E' infatti probabile che ad alte temperature, per le quali è noto un parziale *unfolding* di *MIP1*, la quantità di Mip1 sia ridotta, per cui l'effetto di mutazioni è più evidente. Non è escluso inoltre che la stessa sostituzione T661A favorisca l'*unfolding* della proteina ad alte temperature.

Per cercare l'origine della mutazione A1981→G un elevato numero di ceppi enologici o naturali isolati da diverse fonti in diverse aree è stato analizzato per la presenza di A o G in posizione 1981. Tutti i ceppi mostrano A in posizione 1981, dunque treonina in posizione 661. L'unica eccezione è il ceppo EM93, un ceppo diploide che presenta un allele contenente A1981 e un allele contenente G1981. EM93 è il ceppo da cui è stato ottenuto il ceppo S288c, che ha in comune l'88% del genoma con EM93 (Mortimer and Johnston, 1986). E' dunque molto probabile che S288c abbia ereditato l'allele mutato *MIP1*[S] da EM93, insieme ad un'altra serie di mutazioni (*gal2*, *mal*, *mel*) (Mortimer and Johnston, 1986).

Su diversi isolati naturali le cui sequenze parziali sono disponibili al sito dell'istituto Sanger è stata condotta anche un'analisi degli altri polimorfismi presenti in *MIP1*. Da questa analisi è emerso che la maggior parte dei ceppi posseggono gli stessi polimorfismi del gene *MIP1*[S]. Alcuni ceppi posseggono alcuni polimorfismi di *MIP1*[S] e altri di *MIP1*[Σ]. Le combinazioni fra i due tipi di polimorfismi sono diversi da ceppo a ceppo, presentando una sorta di struttura a mosaico. E' molto probabile dunque che i diversi alleli *MIP1* si siano originati non solo attraverso comparsa e selezione di mutazioni, ma anche attraverso processi di ricombinazione. E' interessante poi notare che i ceppi "ibridi" sono per lo più di origine orientale (Giappone, Malesia, Hawaii). L'organizzazione a mosaico di *MIP1* solleva la questione dell'origine dei

ceppi orientali, per i quali si è dimostrato un'origine filogenetica diversa da quella dei ceppi occidentali (Fay and Benavides, 2005; Ayoub *et al.*, 2006). Nessuno dei ceppi invece possiede esattamente gli stessi SNP presenti in *MIP1*[Σ], per cui rimane ancora l'incertezza su quale ceppo progenitore abbia trasmesso a questi ceppi l'allele *MIP1*[Σ].

La scoperta che i ceppi derivati da S288C posseggono un allele *MIP1* mutato che incrementa l'instabilità dell'mtDNA ha almeno due profonde conseguenze sullo studio della funzionalità mitocondriale.

In primo luogo, in studi precedenti e in questo studio (capitolo 4, 5 e 6) mutazioni equivalenti a mutazioni patologiche umane sono stati introdotti nell'allele *MIP1*[S]. Ci siamo chiesti se gli effetti fenotipici delle mutazioni potessero essere influenzati dal *background* genetico, cioè dalla presenza di alanina in posizione 661. Per rispondere a questa domanda le cinque mutazioni studiate nel capitolo 5 sono state introdotte nell'allele *MIP1*[S]^{A661T} ed è stata condotta la stessa analisi sulla funzionalità mitocondriale condotta in precedenza nel contesto *MIP1*[S]. Sebbene nel contesto *MIP1*[S]^{A661T} tutti i valori legati alla mutabilità mitocondriale siano spostati verso valori più bassi, le conclusioni a cui si giunge sono le medesime.

Sulla base di queste osservazioni, emerge chiaramente che entrambi gli alleli possono essere utilizzati come modelli per lo studio di mutazioni corrispondenti a mutazioni patologiche umane. La presenza di due alleli offre anzi uno strumento in più per lo studio delle mutazioni. Utilizzando l'allele *MIP1*[S]^{A661T} le frequenze dei *petite* sono spostate verso valori più bassi. Questo è utile quando gli effetti di una mutazione sono così deleteri che, nel contesto *MIP1*[S], non possono essere analizzati. Ad esempio la mutazione G651S nel contesto *MIP1*[S] determina la perdita totale di mtDNA, prevenendo ogni altra analisi. Nel contesto *MIP1*[S]^{A661T}, sebbene vi sia un forte incremento dei mutanti *petite*, una certa percentuale dei cloni rimane rho⁺, permettendo, ad esempio, l'analisi della fedeltà della replicazione mediante il saggio su eritromicina. Inoltre, la frequenza dei mutanti *petite* associati alla mutazione A692T è più bassa nel contesto *MIP1*[S]^{A661T} che nel contesto *MIP1*[S], in modo tale che, nel primo caso, gli effetti della mutazione E900G *in cis* vengono meglio evidenziati. Utilizzando l'allele *MIP1*[S], le frequenze dei *petite* sono spostati verso valori più alti. Questo è utile quando gli effetti di una mutazione sono così blandi che difficilmente sono significativi nel contesto *MIP1*[S]^{A661T}, mentre nel contesto *MIP1*[S] il divario fra allele wt e allele mutato è maggiore e più significativo. Inoltre, essendo i valori più alti, l'utilizzo dell'allele *MIP1*[S] favorisce studi di *rescue* chimico o genetico.

In secondo luogo e di interesse più generale, è degno di nota che la collezione dei deletanti dell'EUROSCARF utilizzati nell'analisi funzionale su larga scala è stata fatta nei ceppi BY4741, BY4742 e BY4743, che contengono l'allele *MIP1*[S]. Questa scoperta deve essere tenuta in considerazione per analisi che concernono la funzionalità mitocondriale. E' possibile infatti che le osservazioni sul metabolismo mitocondriale, ad esempio crescita su fonti ossidabili a 28°C o a 36°C o frequenza di mutanti *petite*, siano influenzate dalla presenza della sostituzione T661A.

8. Note finali

Nel presente studio sono state introdotte nel gene *MIP1* di *S. cerevisiae*, codificante per la DNA polimerasi mitocondriale, sette mutazioni equivalenti a mutazioni patologiche umane nel gene ortologo POLG. Sono stati determinati gli effetti di queste mutazioni sul metabolismo del DNA e sulla stabilità dell'mtDNA ed è stato osservato, fra i risultati più importanti, che tutte le mutazioni determinano un incremento della mutabilità estesa dell'mtDNA. Inoltre sono state identificate sostanze, in particolare antiossidanti, in grado di ridurre la mutabilità mitocondriale dovuta a specifiche mutazioni in *MIP1*. Infine sono stati identificati geni codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo dell'mtDNA che, se overespressi, sono in grado di ridurre la mutabilità *petite* dovuta alle mutazioni in *MIP1*. I risultati sono già stati discussi alla fine dei capitoli 4, 5 e 6. *S. cerevisiae* si è dimostrato dunque essere un ottimo modello per lo studio degli effetti di mutazioni nel gene codificante la polimerasi mitocondriale, sia per la “validazione” delle mutazioni sia per l'identificazione di sostanze o geni in grado di ripristinare, almeno parzialmente, la stabilità dell'mtDNA.

Parallelamente a questa analisi, è stato scoperto che i ceppi di laboratorio maggiormente usati (S288c, serie BY47 e serie W303) contengono un allele mutato di *MIP1*, ereditato dal progenitore EM93, che incrementa la mutabilità estesa dell'mtDNA, soprattutto ad alte temperature. Questa osservazione, discussa alla fine del capitolo 7, spiega, almeno in parte, come mai la maggior parte dei ceppi di laboratorio producono spontaneamente una percentuale di *petite* maggiore rispetto ai ceppi naturali, nei quali è presente un allele *MIP1* selvatico.

Bibliografia

- Acharya N., Haracska L., Johnson R. E., Unk I., Prakash S. and Prakash L. (2005). Complex formation of yeast Rev1 and Rev7 proteins: a novel role for the polymerase-associated domain. *Mol Cell Biol.* **25**, 9734-9740.
- Acharya N., Johnson R. E., Prakash S. and Prakash L. (2006). Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions. *Mol Cell Biol.* **26**, 9555-9563.
- Agostino A., Valletta L., Chinnery P. F., Ferrari G., Carrara F., Taylor R. W., Schaefer A. M., Turnbull D. M., Tiranti V. and Zeviani M. (2003). Mutations of ANT1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology.* **60**, 1354-1356.
- Aiyar A., Xiang Y. and Leis J. (1996). Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol Biol.* **57**, 177-191.
- Aknin-Seifer I. E., Touraine R. L., Lejeune H., Jimenez C., Chouteau J., Siffroi J. P., McElreavey K., Bienvenu T., Patrat C. and Levy R. (2005). Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility? A multi-centre French study. *Hum Reprod.* **20**, 736-740.
- Alberio S., Mineri R., Tiranti V. and Zeviani M. (2007). Depletion of mtDNA: syndromes and genes. *Mitochondrion.* **7**, 6-12.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1994). *Saccharomyces cerevisiae*. *Current protocols in molecular biology*. Vol. 2. Wiley, NY.
- Ayoub M. J., Legras J. L., Saliba R. and Gaillardin C. (2006). Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J Appl Microbiol.* **100**, 699-711.
- Baldacci G., Chérif-Zahar B. and Bernardi G. (1984). The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J.* **3**, 2115-2120.
- Baltimore D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* **226**, 1209-1211.
- Barker D. G., White J. H. and Johnston L. H. (1985). The nucleotide sequence of the DNA ligase gene (*CDC9*) from *Saccharomyces cerevisiae*: a gene which is cell-cycle regulated and induced in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8323-8337.
- Barrientos A. (2003). Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life.* **55**, 83-95.
- Baruffini E., Ferrero I. and Foury F. (2007). Mitochondrial DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* caused by functional interactions between DNA polymerase gamma mutations associated with disease in human. *Biochim Biophys Acta.* **1772**, 1225-1235.
- Baruffini E., Lodi T., Dallabona C., Puglisi A., Zeviani M. and Ferrero I. (2006). Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans. *Hum Mol Genet.* **15**, 2846-2855.
- Bendich A. J. (1996). Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **255**, 564-588.
- Bernardi G., Piperno G. and Fonty G. (1972). The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA. *J Mol Biol.* **65**, 173-189.
- Bienstock R. J. and Copeland W. C. (2004). Molecular insights into NRTI inhibition and mitochondrial toxicity revealed from a structural model of the human mitochondrial DNA polymerase. *Mitochondrion.* **4**, 203-213.
- Biousse V. and Newman N. J. (2003). Neuro-ophthalmology of mitochondrial diseases. *Current Opinion in Neurology.* **16**, 35-43.
- Blanco L., Bernad A. and Salas M. (1991). *MIP1* DNA polymerase of *S. cerevisiae*: structural similarity with the *E. coli* DNA polymerase I-type enzymes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 955.
- Bogenhagen D. F., Wang Y., Shen E. L. and Kobayashi R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics.* **2**, 1205-1216.
- Bolden A., Noy G. P. and Weissbach A. (1977). DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. *J Biol Chem.* **252**, 3351-3356.
- Bonneaud N., Ozier-Kalogeropoulos O., Li G. Y., Labouesse M., Minvielle-Sebastia L. and Lacroute F. (1991). A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast.* **7**, 609-615.
- Botstein D. (1991). Why yeast? *Hosp Pract.* **26**, 157-161.
- Bourgeron T., Chretien D., Rötig A., Munnich A. and Rustin P. (1993). Fate and expression of the deleted mitochondrial DNA differ between human heteroplasmic skin fibroblast and Epstein-Barr virus-transformed lymphocyte cultures. *J Biol Chem.* **268**, 19369-19376.
- Bowmaker M., Yang M. Y., Yasukawa T., Reyes A., Jacobs H. T., Huberman J. A. and Holt I. J. (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem.* **278**, 50961-50969.
- Brachmann C. B., Davies A., Cost G. J., Caputo E., Li J., Hieter P. and Boeke J. D. (1998). Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast.* **14**, 115-132.
- Brown W. M., George M. Jr and Wilson A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**, 1967-1971.
- Brusco A., Michielotto C., Gatta V., Foresta C., Matullo G., Zeviani M., Ferrari G., Dragone E., Calabrese G., Rossato M., Stuppia L. and Migone N. (2006). The polymorphic polyglutamine repeat in the mitochondrial DNA polymerase gamma gene is not associated with oligozoospermia. *J Endocrinol Invest.* **29**, 1-4.
- Budroni M., Zara S., Zara G., Pirino G. and Mannazzu I. (2005). Peculiarities of flor strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. *FEMS Yeast Res.* **5**, 951-958.
- Caldecott K. W., Aoufouchi S., Johnson P. and Shall S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4387-4394.
- Caldecott K. W., Tucker J. D., Stanker L. H. and Thompson L. H. (1995). Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex *in vitro* and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4836-4843.
- Carrodegua J. A., Kobayashi R., Lim S. E., Copeland W. C. and Bogenhagen D. F. (1999). The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol.* **19**, 4039-4046.
- Carrodegua J. A., Theis K., Bogenhagen D. F. and Kisker C. (2001). Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. *Mol Cell.* **7**, 43-54.
- Caspari T. (2000). How to activate p53. *Curr Biol.* **10**, R315-R317.
- Cavalieri D., Townsend J. P. and Hartl D. L. (2000). Manifest anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 12369-12374.
- Chabes A. L., Björklund S. and Thelander L. (2004). S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J Biol Chem.* **279**, 10796-10807.
- Chabes A., Domkin V. and Thelander L. (1999). Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J Biol Chem.* **17**, 36679-36683.

- Chabes A., Georgieva B., Domkin V., Zhao X., Rothstein R. and Thelander L. (2003). Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell*. **112**, 391-401.
- Chabes A. and Stillman B. (2007). Constitutively high dNTP concentration inhibits cell cycle progression and the DNA damage checkpoint in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**, 1183-1188.
- Chabes A. and Thelander L. (2000). Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J Biol Chem*. **275**, 17747-17753.
- Chan S. S. L., Longley M. J. and Copeland W. C. (2005). The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit. *J Biol Chem*. **280**, 31341-31346.
- Chan S. S., Longley M. J. and Copeland W. C. (2006). Modulation of the W748S mutation in DNA polymerase gamma by the E1143G polymorphism in mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet*. **15**, 3473-3483.
- Chen X. J., Wang X., Kaufman B. A. and Butow R. A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*. **307**, 714-717.
- Chi N. W. and Kolodner R. D. (1994a). Purification and characterization of *MSH1*, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. *J Biol Chem*. **269**, 29984-29992.
- Chi N. W. and Kolodner R. D. (1994b). The effect of DNA mismatches on the ATPase activity of *MSH1*, a protein in yeast mitochondria that recognizes DNA mismatches. *J Biol Chem*. **269**, 29993-29997.
- Chinnery P. F. (2003). Searching for nuclear-mitochondrial genes. *TRENDS in Genetics*. **19**, 60-62.
- Chinnery P. F., Johnson M. A., Wardell T. M., Singh-Kler R., Hayes C., Brown D. T., Taylor R. W., Bindoff L. A. and Turnbull D. M. (2000). The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol*. **48**, 188-193.
- Chinnery P. F. and Turnbull D. M. (2001). The epidemiology and treatment of mitochondrial disease. *Am. J. Med. Genet*. **106**, 94-101.
- Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H. and Hieter P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*. **110**, 119-122.
- Collins F. S. (1995). Positional cloning moves from predilectional to traditional. *Nat Genet*. **9**, 347-350.
- Contamine V. and Picard M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*. **64**, 281-315.
- Corda Y., Lee S. E., Guillot S., Walther A., Sollier J., Arbel-Eden A., Haber J. E. and Geli V. (2005). Inactivation of Ku-mediated end joining suppresses *mec1Δ* lethality by depleting the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 through a pathway controlled by Tel1 kinase and the Mre11 complex. *Mol Cell Biol*. **25**, 10652-10664.
- D'Souza S. and Walker G. C. (2006). Novel role for the C terminus of *Saccharomyces cerevisiae* Rev1 in mediating protein-protein interactions. *Mol Cell Biol*. **26**, 8173-8182.
- Davidzon G., Mancuso M., Ferraris S., Quinzii C., Hirano M., Peters H. L., Kirby D., Thorburn D. R. and Dimauro S. (2005). POLG mutations and Alpers syndrome. *Ann Neurol*. **57**, 921-923.
- Davis A. F., Ropp P. A., Clayton D. A. and Copeland W. C. (1996). Mitochondrial DNA polymerase gamma is expressed and translated in the absence of mitochondrial DNA maintenance and replication. *Nucleic Acids Res*. **24**, 2753-2759.
- De A. and Campbell C. (2007). A novel interaction between DNA ligase III and DNA polymerase gamma plays an essential role in mitochondrial DNA stability. *Biochem J*. **402**, 175-186.
- DeGregori J., Kowalik T. and Nevins J. R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol*. **15**, 4215-4224.
- De Lonlay P., Valnot I., Barrientos A., Gorbatyuk M., Tzagoloff A., Taaman J. W., Benayoun E., Chretien D., Kadhon N., Lomès A., De Baulny H. O., Niaudet P., Munnich A., Rustin P. and Rotig A. (2001). A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet*. **29**, 57-60.
- de Vries M. C., Rodenburg R. J., Morava E., van Kaauwen E. P., ter Laak H., Mullaart R. A., Snoeck I. N., van Hasselt P. M., Harding P., van den Heuvel L. P. and Smeitink J. A. (2007). Multiple oxidative phosphorylation deficiencies in severe childhood multi-system disorders due to polymerase gamma (POLG1) mutations. *Eur J Pediatr*. **166**, 229-234.
- de Zamaroczy M. and Bernardi G. (1985). Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast-a review. *Gene*. **37**, 1-17.
- de Zamaroczy M. and Bernardi G. (1986). The GC clusters of the mitochondrial genome of yeast and their evolutionary origin. *Gene*. **41**, 1-22.
- Defontaine A., Lecocq F. M. and Hallet J. N. (1991). A rapid miniprep method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. **19**, 185.
- Del Bo R., Bordon A., Sciacco M., Di Fonzo A., Galbiati S., Crimi M., Bresolin N. and Comi G. P. (2003). Remarkable infidelity of polymerase gammaA associated with mutations in POLG1 exonuclease domain. *Neurology*. **61**, 903-908.
- Desany B. A., Alcasabas A. A., Bachant J. B. and Elledge S. J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev*. **12**, 2956-2970.
- Di Fonzo A., Bordon A., Crimi M., Sara G., Bo R. D., Bresolin N. and Comi G. P. (2003). POLG mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions. *Hum Mutat*. **22**, 498-499.
- DiMauro S., Bonilla E., Davidson M., Hirano M. and Schon E. A. (1998). Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta*. **1366**, 199-210.
- Domkin V., Thelander L. and Chabes A. (2002). Yeast DNA damage-inducible Rnr3 has a very low catalytic activity strongly stimulated after the formation of a cross-talking Rnr1/Rnr3 complex. *J Biol Chem*. **277**, 18574-18578.
- Donahue S. L., Corner B. E., Bordone L. and Campbell C. (2001). Mitochondrial DNA ligase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. **29**, 1582-1589.
- Donnini C., Puglisi P. P. and Marmiroli N. (1983). The role of the nuclear gene "mitochondrial mutability control" (*MMC1*) in the process of mutability of the mitochondrial genome by different mutagens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. **190**, 504-10.
- Doudican N. A., Song B., Shadel G. S. and Doetsch P. W. (2005). Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **25**, 5196-5204.
- Dower W. J., Miller J. F. and Ragsdale C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*. **16**, 6127-6145.
- Duchen M. R. (2004). Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. **53**, S96-102.
- Duchniewicz M., Germaniuk A., Westermann B., Neupert W., Schwarz E. and Marszalek J. (1999). Dual role of the mitochondrial chaperone Mdj1p in inheritance of mitochondrial DNA in yeast. *Mol Cell Biol*. **19**, 8201-8210.
- Dujon B. (1981). Mitochondrial genetics and functions. *Molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Dzierzbicki P., Koprowski P., Fikus M. U., Malc E. and Ciesla Z. (2004). Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the *MSH1*-dependent pathway. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 403-411.
- Elledge S. J. and Davis R. W. (1987). Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Mol Cell Biol*. **7**, 2783-2793.

- Elledge S. J. and Davis R. W. (1990). Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.* **4**, 740-751.
- Elledge S. J., Zhou Z., Allen J. B. and Navas T. B. (1993). DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays.* **15**, 333-339.
- Ezekiel U. R. and Zassenhaus H. P. (1993). Localization of a cruciform cutting endonuclease to yeast mitochondria. *Mol Gen Genet.* **240**, 414-418.
- Fadic R., Russell J. A., Vedanarayanan V. V., Lehar M., Kunkel R. W. and Johns D. R. (1997). Sensory ataxic neuropathy as the presenting feature of a novel mitochondrial disease. *Neurology.* **49**, 239-245.
- Falkenberg M., Gaspari M., Rantanen A., Trifunovic A., Larsson N. G. and Gustafsson C. M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet.* **31**, 289-294.
- Fan L. and Kaguni L. S. (2001). Multiple regions of subunit interaction in *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase: three functional domains in the accessory subunit. *Biochemistry.* **40**, 4780-4791.
- Fangman W. L., Henly J. W. and Brewer B. J. (1990). *RPO41*-independent maintenance of [rho-] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **10**, 10-15.
- Fay J. C. and Benavides J. A. (2005). Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet.* **1**, 66-71.
- Fernandez-Vizcarra E., Bugiani M., Goffrini P., Carrara F., Farina L., Procopio E., Donati A., Uziel G., Ferrero I. and Zeviani M. (2007). Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet.* **16**, 1241-1252.
- Ferrari G., Lamantea E., Donati A., Filosto M., Briem E., Carrara F., Parini R., Simonati A., Santer R. and Zeviani M. (2005). Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase- γ . *Brain.* **128**, 723-731.
- Filosto M., Mancuso M., Nishigaki Y., Pancrudo J., Harati Y., Gooch C., Mankodi A., Bayne L., Bonilla E., Shanske S., Hirano M. and DiMauro S. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in progressive external ophthalmoplegia due to mutations in polymerase gamma. *Arch Neurol.* **60**, 1279-1284.
- Fisher R. P., Lisowsky T., Parisi M. A. and Clayton D. A. (1992). DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem.* **267**, 3358-3367.
- Fontanesi F., Palmieri L., Scarcia P., Lodi T., Donnini C., Limongelli A., Tiranti V., Zeviani M., Ferrero I. and Viola A. M. (2004). Mutations in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum Mol Genet.* **13**, 923-934.
- Foury F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem.* **264**, 20552-20560.
- Foury F. and Kucej M. (2001). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol.* **6**, 106-111.
- Foury F. and Lahaye A. (1987). Cloning and sequencing of the *PIF* gene involved in repair and recombination of yeast mitochondrial DNA. *EMBO J.* **6**, 1441-1449.
- Foury F., Roganti T., Lecrenier N. and Purnelle B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **440**, 325-331.
- Foury F. and Vanderstraeten S. (1992). Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity. *EMBO J.* **11**, 2717-2726.
- Frederico L. A., Kunkel T. A. and Shaw B. R. (1990). A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry.* **29**, 2532-2537.
- Fry M. and Loeb L. A. (1986). Animal Cell DNA Polymerases. **CRC Press, Boca Raton, FL.**
- Fukuohara H. and Wesolowski M. (1977). Preferential loss of a specific region of mitochondrial DNA by rho- mutation. *Mitochondria 1977: Genetics and biogenesis of mitochondria. DeGruyter, Berlin.*
- Gaisne M., Bécam A.-M., Verdière J. and Herbert C.J. (1999). A natural mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene *HAP1*(*CYP1*). *Curr Genet.* **36**, 195-200.
- Garesse R. and Vallejo C. G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene.* **263**, 1-16.
- Garrido N., Griparic L., Jokitalo E., Wartiovaara J., van der Bliek A. M. and Spelbrink J. N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell.* **14**, 1583-1596.
- Gasser T. and the EFNS Task Force on Molecular Diagnosis of Neurologic Disorders (2001). Guidelines for the molecular diagnosis of inherited neurological disorders. *Eur J Neurol.* **8**, 407-424.
- Gbelska Y., Subik J., Svoboda A., Goffeau A. and Kovac L. (1983). Intramitochondrial ATP and cell functions: yeast cells depleted of intramitochondrial ATP lose the ability to grow and multiply. *Eur J Biochem.* **130**, 281-286.
- Genga A., Bianchi L. and Foury F. (1986). A nuclear mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mitochondrial DNA replication and polymerase activity. *J Biol Chem.* **261**, 9328-9332.
- Germaniuk A., Liberek K. and Marszałek J. (2002). A bichaperone (Hsp70-Hsp78) system restores mitochondrial DNA synthesis following thermal inactivation of Mip1p polymerase. *J Biol Chem.* **277**, 27801-27808.
- Ghivizzani S. C., Madsen C. S., Nelen M. R., Ammini C. V. and Hauswirth W. W. (1994). In *organello* footprint analysis of human mitochondrial DNA: human mitochondrial transcription factor A interactions at the origin of replication. *Mol Cell Biol.* **14**, 7717-7730.
- Gibbs P. E., McDonald J., Woodgate R. and Lawrence C. W. (2005). The relative roles in vivo of *Saccharomyces cerevisiae* Pol eta, Pol zeta, Rev1 protein and Pol32 in the bypass and mutation induction of an abasic site, T-T (6-4) photoadduct and T-T cis-syn cyclobutane dimer. *Genetics.* **169**, 575-582.
- Gibbs P. E., Wang X. D., Li Z., McManus T. P., McGregor W. G., Lawrence C. W. and Maher V. M. (2000). The function of the human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *REV1* is required for mutagenesis induced by UV light. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 4186-4191.
- Gietz R. D. and Sugino A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* **74**, 527-534.
- Gietz R. D. and Woods R. A. (2002). Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/Peg method. *Methods in Enzymology.* **350**, 87-96.
- Giraud M. F. and Velours J. (1997). The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F₁. *Eur J Biochem.* **245**, 813-818.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. and Oliver S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science.* **274**, 546,563-567.
- Gonzalez-Vioque E., Blazquez A., Fernandez-Moreira D., Bornstein B., Bautista J., Arpa J., Navarro C., Campos Y., Fernandez-Moreno M. A., Garesse R., Arenas J. and Martin M. A. (2006). Association of novel POLG mutations and multiple mitochondrial DNA deletions with variable clinical phenotypes in a Spanish population. *Arch Neurol.* **63**, 107-111.

- Gordon N. (2006).** Alpers syndrome: progressive neuronal degeneration of children with liver disease. *Dev Med Child Neurol.* **48**, 1001-1003.
- Graziewicz M. A., Bienstock R. J. and Copeland W. C. (2007).** The DNA polymerase gamma Y955C disease variant associated with PEO and parkinsonism mediates the incorporation and translesion synthesis opposite 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Hum Mol Genet.* **16**, 2729-2739.
- Graziewicz M. A., Longley M. J., Bienstock R. J., Zeviani M. and Copeland W. C. (2004).** Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 770-776.
- Graziewicz M. A., Longley M. J. and Copeland W. C. (2006).** DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev.* **106**, 383-405.
- Grenson M., Mousset M., Wiame J. M. and Bechet J. (1966).** Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim Biophys Acta.* **127**, 325-338.
- Grossman L. I. and Shoubridge E. A. (1996).** Mitochondrial genetics and human disease. *Bioessay.* **18**, 983-991.
- Guo D., Wu X., Rajpal D. K., Taylor J. S. and Wang Z. (2001).** Translesion synthesis by yeast DNA polymerase zeta from templates containing lesions of ultraviolet radiation and acetylaminofluorene. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2875-2883.
- Hakonen A. H., Heiskanen S., Juvonen V., Lappalainen I., Luoma P. T., Rantamäki M., Goethem G. V., Lofgren A., Hackman P., Paetau A., Kaakkola S., Majamaa K., Varilo T., Udd B., Kaariainen H., Bindoff L. A. and Suomalainen A. (2005).** Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet.* **77**, 430-441.
- Haracska L., Unk I., Johnson R. E., Johansson E., Burgers P. M., Prakash S. and Prakash L. (2001).** Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev.* **15**, 945-954.
- Harmen D. (1972).** The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* **20**, 145-147.
- Harrower T., Stewart J. D., Hudson G., Houlden H., Warner G., O'Donovan D. G., Findlay L., Taylor R. W., De Silva R. and Chinnery P. F. (2008).** Mutations in POLG1 can present with autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch. Neurology.* (In Press).
- Hayashi J. I., Ohta S., Kikuchi A., Takemitsu M., Goto Y. and Nonaka I. (1991).** Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *PNAS.* **88**, 10614-10618.
- Hirano M. and Vu T. H. (2000).** Defects of intergenomic communication: where do we stand? *Brain Pathol.* **10**, 451-461.
- Hisama F. M., Mancuso M., Filosto M. and DiMauro S. (2005).** Progressive external ophthalmoplegia: a new family with tremor and peripheral neuropathy. *Am J Med Genet A.* **135**, 217-219.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* **77**, 51-59.
- Hoffman C. S. and Winston F. (1987).** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* **57**, 267-272.
- Hollingsworth N. M., Ponte L. and Halsey C. (1995).** MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev.* **9**, 1728-1739.
- Holt I. J., Harding A. E., Cooper J. M., Schapira A. H., Toscano A., Clark J. B. and Morgan-Hughes J. A. (1989).** Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol.* **26**, 699-708.
- Holt I. J., Harding A. E. and Morgan-Hughes JA (1988).** Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* **331**, 717-719.
- Holt I. J., Lorimer H. E. and Jacobs H. T. (2002).** Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell.* **100**, 515-524.
- Horvath R., Hudson G., Ferrari G., Futterer N., Ahola S., Lamantea E., Prokisch H., Lochmuller H., McFarland R., Ramesh V., Klopstock T., Freisinger P., Salvi F., Mayr J. A., Santer R., Tesarova M., Zeman J., Udd B., Taylor R. W., Turnbull D., Hanna M., Fialho D., Suomalainen A., Zeviani M. and Chinnery P. F. (2006).** Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase {gamma} gene. *Brain.* **129**, 1674-1684.
- Howell N. and Mackey D. A. (1998).** Low-penetrance branches in matrilineal pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet.* **63**, 1220-1224.
- Hu J. P., Vanderstraeten S. and Foury F. (1995).** Isolation and characterization of ten mutator alleles of the mitochondrial DNA polymerase-encoding MIP1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **160**, 105-110.
- Huang M. and Elledge S. J. (1997).** Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **17**, 6105-6113.
- Huang M., Zhou Z. and Elledge S. J. (1998).** The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell.* **94**, 595-605.
- Hübscher U., Kuenzle C. C. and Spadari S. (1979).** Functional roles of DNA polymerases beta and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**, 2316-2320.
- Hudson G., Deschauer M., Taylor R. W., Hanna M. G., Fialho D., Schaefer A. M., He L.-P., Blakely E., Turnbull D. M. and Chinnery P. F. (2006).** POLG1, C10ORF2 & ANT1 mutations are uncommon in sporadic PEO with multiple mtDNA deletions. *Neurology.* **66**, 1439-1441.
- Hurd H. K., Roberts C. W. and Roberts J. W. (1987).** Identification of the gene for the yeast ribonucleotide reductase small subunit and its inducibility by methyl methanesulfonate. *Mol Cell Biol.* **7**, 3673-3677.
- Insdorf N. F. and Bogenhagen D. F. (1989).** DNA polymerase gamma from *Xenopus laevis*. II. A 3'-->5' exonuclease is tightly associated with the DNA polymerase activity. *J Biol Chem.* **264**, 21498-21503.
- Ito J. and Braithwaite D. K. (1990).** Yeast mitochondrial DNA polymerase is related to the family A DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6716.
- Jacobs H. T., Lehtinen S. K. and Spelbrink J. N. (2000).** No sex please, we're mitochondria: a hypothesis on the somatic unit of inheritance of mammalian mtDNA. *Bioessays.* **22**, 564-572.
- Jensen M., Leffers H., Petersen J. H., Nyboe Andersen A., Jørgensen N., Carlsen E., Jensen T. K., Skakkebaek N. E. and Rajpert-De Meyts E. (2004).** Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermograms and unexplained subfertility. *Hum Reprod.* **19**, 65-70.
- Johnson A. L., Barker D. G. and Johnston L. H. (1986).** Induction of yeast DNA ligase genes in exponential and stationary phase cultures in response to DNA damaging agents. *Curr Genet.* **11**, 107-112.
- Johnson A. A., Tsai Y., Graves S. W. and Johnson K. A. (2000a).** Human mitochondrial DNA polymerase holoenzyme: reconstitution and characterization. *Biochemistry.* **39**, 1702-1708.
- Johnson R. E., Washington M. T., Haracska L., Prakash S. and Prakash L. (2000b).** Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature.* **406**, 1015-1019.
- Kaguni L. S. (2004).** DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem.* **73**, 293-320.

- Kaguni L. S. and Olson M. W. (1989). Mismatch-specific 3'→5' exonuclease associated with the mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**, 6469-6473.
- Kaiser C., Michaelis S. and Mitchell A. (1994). Methods in Yeast Genetics: a Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Campbell I. and Duffus J. H. (1988). Yeast, A Practical Approach. IRL Press, UK.
- Kalifa L. and Sia E. A. (2007). Analysis of Rev1p and Pol zeta in mitochondrial mutagenesis suggests an alternative pathway of damage tolerance. *DNA Repair (Amst)*. **6**, 1732-1739.
- Kane S. M. and Roth R. (1974). Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. *J Bacteriol*. **118**, 8-14.
- Kaufman B. A., Newman S. M., Hallberg R. L., Slaughter C. A., Perlman P. S. and Butow R. A. (2000). In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**, 7772-7777.
- Kaukonen J., Juselius J. K., Tiranti V., Kyttala A., Zeviani M., Comi G. P., Keranen S., Peltonen L. and Suomalainen A. (2000). Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*. **289**, 782-785.
- Kelso G. F., Porteous C. M., Coulter C. V., Hughes G., Porteous W. K., Ledgerwood E. C., Smith R. A. and Murphy M. P. (2001). Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem*. **276**, 4588-4596.
- Kleff S., Kemper B. and Sternglanz R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *EMBO J*. **11**, 699-704.
- Kollberg G., Jansson M., Perez-Bercoff A., Melberg A., Lindberg C., Holme E., Moslemi A. R. and Oldfors, A. (2005). Low frequency of mtDNA point mutations in patients with PEO associated with POLG1 mutations. *Eur J Hum Genet*. **13**, 463-469.
- Kollberg G., Moslemi A. R., Darin N., Nennesmo I., Bjarnadottir I., Uvebrant P., Holme E., Melberg A., Tulinius M. and Oldfors, A. (2006). POLG1 Mutations Associated With Progressive Encephalopathy in Childhood. *J Neuropathol Exp Neurol*. **65**, 758-768.
- Koprowski P., Fikus M. U., Mieczkowski P. and Ciesla Z. (2002). A dominant mitochondrial mutator phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* conferred by msh1 alleles altered in the sequence encoding the ATP-binding domain. *Mol Genet Genomics*. **266**, 988-994.
- Kornberg A. and Baker T. A. (1992). DNA Replication 2nd edition. Hardcover Publisher, W.H. Freeman & Company, NY.
- Krausz C., Guarducci E., Becherini L., Degl'Innocenti S., Gerace L., Balercia G. and Forti G. (2004). The clinical significance of the POLG gene polymorphism in male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. **89**, 4292-4297.
- Kunkel T. A. and Mosbaugh D. W. (1989). Exonucleolytic proofreading by a mammalian DNA polymerase. *Biochemistry*. **28**, 988-995.
- Kunkel T. A. and Soni A. (1988). Exonucleolytic proofreading enhances the fidelity of DNA synthesis by chick embryo DNA polymerase-gamma. *J Biol Chem*. **263**, 4450-4459.
- Lacroute F. (1968). Regulation of Pyrimidine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **95**, 824-832.
- Lahaye A., Stahl H., Thines-Sempoux D. and Foury F. (1991). PIF: a DNA helicase in yeast mitochondria. *EMBO J*. **10**, 997-1007.
- Lakshmipathy U. and Campbell C. (1999). The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Mol Cell Biol*. **19**, 3869-3876.
- Lakshmipathy U. and Campbell C. (2000). Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. *Nucleic Acids Res*. **28**, 3880-3886.
- Lakshmipathy U. and Campbell C. (2001). Antisense-mediated decrease in DNA ligase III expression results in reduced mitochondrial DNA integrity. *Nucleic Acids Res*. **29**, 668-676.
- Lamantea E., Tiranti V., Bordon A., Toscano A., Bono F., Servidei S., Papadimitriou A., Spelbrink H., Silvestri L., Casari G., Comi G. P. and Zeviani M. (2002). Mutations of mitochondrial DNA polymerase gamma are a frequent cause of autosomal dominant or recessive Progressive External Ophthalmoplegia. *Ann Neurol*. **52**, 211-219.
- Land J. M., Morgan-Hughes A., Hargreaves I. and Heales S. J. R. (2004). Mitochondrial disease: a historical, biochemical and london perspective. *Neurochem Res*. **29**, 483-491.
- Lang B. F., Gray M. W. and Burger G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*. **33**, 351-397.
- Larsson N. G., Holme E., Kristiansson B., Oldfors A. and Tulinius M. (1990). Progressive increase of mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr*. **28**, 131-136.
- Larsson N. G., Wang J., Wilhelmsson H., Oldfors A., Rustin P., Lewandoski M., Barsh G. S. and Clayton D. A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*. **18**, 231-236.
- Lawrence C. W. (2004). Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv Protein Chem*. **69**, 167-203.
- Lawrence C. W., Das G. and Christensen R. B. (1985). REV7, a new gene concerned with UV mutagenesis in yeast. *Mol Gen Genet*. **200**, 80-85.
- Lawrence C. W., Gibbs P. E., Murante R. S., Wang X. D., Li Z., McManus T. P., McGregor W. G., Nelson J. R., Hinkle D. C. and Maher V. M. (2000). Roles of DNA polymerase zeta and Rev1 protein in eukaryotic mutagenesis and translesion replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **65**, 61-69.
- Lawrence C. W. and Maher V. M. (2001). Eukaryotic mutagenesis and translesion replication dependent on DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Biochem Soc Trans*. **29**, 187-191.
- Lecrenier N. and Foury F. (1995). Overexpression of the *RNR1* gene rescues *Saccharomyces cerevisiae* mutants in the mitochondrial DNA polymerase encoding *MIP1* gene. *Mol Gen Genet*. **249**, 1-7.
- Lecrenier N. and Foury F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene*. **246**, 37-48.
- Lee D. Y. and Clayton D. A. (1998). Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J Biol Chem*. **273**, 30614-30621.
- Lefai E., Calleja M., Ruiz de Mena I., Lagina A. T. 3rd, Kaguni L. S. and Garesse R. (2000). Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase gamma results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*. **264**, 37-46.
- Lefebvre-Legendre L., Balguerie A., Duvezin-Caubet S., Giraud M. F., Slonimski P. P. and di Rago J. P. (2003). F₁-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mo. Microb*. **47**, 1329-1339.
- Lemontt J. F. (1971). Mutants of Yeast Defective in Mutation Induced by Ultraviolet Light. *Genetics*. **68**, 21-33.
- Lewis W., Day B. J., Kohler J. J., Hosseini S. H., Chan S. S., Green E. C., Haase C. P., Keebaugh E. S., Long R., Ludaway T., Russ R., Steltzer J., Tioleco N., Santoianni R. and Copeland W. C. (2007). Decreased mtDNA, oxidative stress, cardiomyopathy, and death from transgenic cardiac targeted human mutant polymerase gamma. *Lab Invest*. **87**, 326-335.
- Lewis D. L., Farr C. L., Wang Y., Lagina A. T. 3rd and Kaguni L. S. (1996). Catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Cloning, bacterial overexpression, and biochemical characterization. *J Biol Chem*. **271**, 23389-23394.
- Lewis L. K. and Resnick M. A. (2000). Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*. **451**, 71-89.
- Li K., Smagula C. S., Parsons W. J., Richardson J. A., Gonzalez M., Hagler H. K. and Williams R. S. (1994). Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J Cell Biol*. **124**, 871-882.

- Lim S. E., Longley M. J. and Copeland W. C. (1999). The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *J Biol Chem.* **274**, 38197-38203.
- Lin Z. P., Belcourt M. F., Cory J. G. and Sartorelli A.C. (2004). Stable suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by R2-targeted short interference RNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors. *J Biol Chem.* **279**, 27030-27038.
- Lin W., Wu X. and Wang Z. (1999). A full-length cDNA of hREV3 is predicted to encode DNA polymerase zeta for damage-induced mutagenesis in humans. *Mutat Res.* **433**, 89-98.
- Ling F., Makishima F., Morishima N. and Shibata T. (1995). A nuclear mutation defective in mitochondrial recombination in yeast. *EMBO J.* **14**, 4090-4101.
- Ling F., Morioka H., Ohtsuka E. and Shibata T. (2000). A role for *MHR1*, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast mtDNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4956-4963.
- Ling F. and Shibata T. (2002). Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *EMBO J.* **21**, 4730-4740.
- Ling F. and Shibata T. (2004). Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial mutagenic cells. *Mol Biol Cell.* **15**, 310-322.
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* **86**, 147-157.
- Lockshon D., Zweifel S. G., Freeman-Cook L. L., Lorimer H. E., Brewer B. J. and Fangman W. L. (1995). A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell.* **81**, 947-955.
- Lodi T., Bove C., Fontanesi F., Viola A. M. and Ferrero I. (2006). Mutation D104G in *ANT1* gene: complementation study in *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. *Biochem Biophys Res Commun.* **341**, 810-815.
- Longley M. J. and Mosbaugh D. W. (1991). Properties of the 3' to 5' exonuclease associated with porcine liver DNA polymerase gamma. Substrate specificity, product analysis, inhibition, and kinetics of terminal excision. *J Biol Chem.* **266**, 24702-24711.
- Longley M. J., Nguyen D., Kunkel T. A. and Copeland W. C. (2001). The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *J Biol Chem.* **276**, 38555-38562.
- Longley M. J., Prasad R., Srivastava D. K., Wilson S. H. and Copeland W. C. (1998a). Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 12244-12248.
- Longley M. J., Ropp P. A., Lim S. E. and Copeland W. C. (1998b). Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase gamma: identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity. *Biochemistry.* **37**, 10529-10539.
- Lorimer H. E., Brewer B. J. and Fangman W. L. (1995). A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol.* **15**, 4803-4809.
- Lowdon M. and Vitols E. (1973). Ribonucleotide reductase activity during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* **158**, 177-184.
- Luft R., Ikkos D., Palmieri G., Ernster L. and Afzelius B. A. (1962). A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical and morphological study. *J. Clin. Invest.* **41**, 1776-1804.
- Luo N. and Kaguni L. S. (2005). Mutations in the spacer region of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase affect DNA binding, processivity, and the balance between Pol and Exo function. *J Biol Chem.* **280**, 2491-2497.
- Luoma P. T., Eerola J., Ahola S., Hakonen A. H., Hellstrom O., Kivisto K. T., Tienari P. J. and Suomalainen A. (2007). Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology.* **69**, 1152-1159.
- Luoma P., Melberg A., Rinne J. O., Kaukonen J. A., Nupponen N. N., Chalmers R. M., Oldfors P. A., Rautakorpi I., Peltonen P. L., Majamaa P. K., Somer H. and Suomalainen A. (2004). Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet.* **364**, 875-882.
- MacAlpine D. M., Perlman P. S. and Butow R. A. (1998). The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 6739-6743.
- Mancuso M., Filosto M., Bellan M., Liguori R., Montagna P., Baruzzi A., DiMauro S. and Carelli V. (2004). POLG mutations causing ophthalmoplegia, sensorimotor polyneuropathy, ataxia, and deafness. *Neurology.* **62**, 316-318.
- Mariotti C., Tiranti V., Carrara F., Dallapiccola B., DiDonato S. and Zeviani M. (1994). Defective respiratory capacity and mitochondrial protein synthesis in transformant cybrids harboring the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with maternally inherited myopathy and cardiomyopathy. *J Clin Invest.* **93**, 1102-1107.
- Marmiroli N., Restivo F. M., Donnini C., Bianchi L. and Puglisi P. P. (1980). Analysis of rho mutability in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Effects of *mmc* and *pet-ts* alleles. *Mol Gen Genet.* **177**, 581-588.
- Martínez-Azorín F., Calleja M., Hernández-Sierra R., Farr C. L., Kaguni L. S. and Garesse R. (2007). Overexpression of the catalytic core of mitochondrial DNA polymerase in the nervous system of *Drosophila melanogaster* reduces median life span by inducing mtDNA depletion. *J Neurochem.* (In press).
- Mason P. A., Matheson E. C., Hall A. G. and Lightowlers R. N. (2003). Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1052-1058.
- Mathews S., Schweyen R. J. and Kaudewitz F. (1977). Preferential loss or retention of mitochondrial genes in rho⁻ clones. *Mitochondria 1977: Genetics and biogenesis of mitochondria.* De Gruyter, Berlin.
- McCulloch V., Seidel-Rogol B. L. and Shadel G. S. (2002). A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol.* **22**, 1116-1125.
- McHugh P. J. and Sarkar S. (2006). DNA interstrand cross-link repair in the cell cycle: a critical role for polymerase zeta in G1 phase. *Cell Cycle.* **5**, 1044-1047.
- McKenzie M., Liolitsa D. and Hanna M. G. (2003). Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res.* **29**, 589-600.
- Meeusen S., Tieu Q., Wong E., Weiss E., Schieltz D., Yates J. R. and Nunnari J. (1999). Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol.* **145**, 291-304.
- Melberg A., Nennesmo I., Moslemi A. R., Kollberg G., Luoma P., Suomalainen A., Holme E. and Oldfors, A. (2005). Alzheimer pathology associated with POLG1 mutation, multiple mtDNA deletions, and APOE4/4: premature ageing or just coincidence? *Acta Neuropathol (Berl).* **110**, 315-316.
- Michel B., Ehrlich S. D. and Uzzell M. (1997). DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J.* **16**, 430-438.
- Mita S., Rizzuto R., Moraes C. T., Shanske S., Arnaudo E., Fabrizi G. M., Koga Y., DiMauro S. and Schon E. A. (1990). Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.* **18**, 561-567.

- Miyakawa I., Sando N., Kawano S., Nakamura S. and Kuroiwa T. (1987). Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* **88**, 431-439.
- Mookerjee S. A., Lyon H. D. and Sia E. A. (2005). Analysis of the functional domains of the mismatch repair homologue Msh1p and its role in mitochondrial genome maintenance. *Curr Genet.* **47**, 84-99.
- Mookerjee S. A. and Sia E. A. (2006). Overlapping contributions of Msh1p and putative recombination proteins Cce1p, Din7p, and Mhr1p in large-scale recombination and genome sorting events in the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* **595**, 91-106.
- Moraes C. T., DiMauro S., Zeviani M., Lombes A., Shanske S., Miranda A. F., Nakase H., Bonilla E., Werneck L. C., Servidei S. et al. (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1293-1299.
- Morelli C., Mungall A. J., Negrini M., Barbanti-Brodano G. and Croce C. M. (1998). Alternative splicing, genomic structure, and fine chromosome localization of REV3L. *Cytogenet Cell Genet.* **83**, 18-20.
- Morrison A., Christensen R. B., Alley J., Beck A. K., Bernstine E. G., Lemontt J. F. and Lawrence C. W. (1989). REV3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J Bacteriol.* **171**, 5659-5667.
- Mortimer R. K. and Jhonston J. R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics.* **113**, 35-43.
- Murakumo Y. (2002). The property of DNA polymerase zeta: REV7 is a putative protein involved in translesion DNA synthesis and cell cycle control. *Mutat Res.* **510**, 37-44.
- Murakumo Y., Ogura Y., Ishii H., Numata S., Ichihara M., Croce C. M., Fishel R. and Takahashi M. (2001). Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J Biol Chem.* **276**, 35644-35651.
- Murakumo Y., Roth T., Ishii H., Rasio D., Numata S., Croce C. M. and Fishel R. (2000). A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. *J Biol Chem.* **275**, 4391-4397.
- Nakabeppu Y., Tsuchimoto D., Yamaguchi H. and Sakumi K. (2007). Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* **85**, 919-934.
- Nasmyth K. A. and Reed S. I. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* **77**, 2119-2123.
- Nelson J. R., Gibbs P. E., Nowicka A. M., Hinkle D. C. and Lawrence C. W. (2000). Evidence for a second function for *Saccharomyces cerevisiae* Rev1p. *Mol Microbiol.* **37**, 549-554.
- Nelson J. R., Lawrence C. W. and Hinkle D. C. (1996a). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science.* **272**, 1646-1649.
- Nelson J. R., Lawrence C. W. and Hinkle D. C. (1996b). Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature.* **382**, 729-731.
- Neupert W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* **66**, 863-917.
- Nguyen K. V., Østergaard E., Ravn S. H., Balslev T., Danielsen E. R., Vardag A., McKiernan P. J., Gray G. and Naviaux R. K. (2005). POLG mutations in Alpers syndrome. *Neurology.* **65**, 1493-1495.
- Nordlund P. and Reichard P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem.* **75**, 681-706.
- Nosek J. and Tomoska L. (2003). Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Curr. Genet.* **44**, 73-84.
- Novotny E. J. Jr, Singh G., Wallace D. C., Dorfman L. J., Louis A., Sogg R. L. and Steinman L. (1986). Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease. *Neurology.* **36**, 1053-1060.
- O'Rourke T. W., Doudican N. A., Zhang H., Eaton J. S., Doetsch P. W. and Shadel J. S. (2005). Differential involvement of the related DNA helicases Pif1p and Rrm3p in mtDNA point mutagenesis and stability. *Gene.* **354**, 86-92.
- Ochoa S. (1954). Enzymic mechanisms in the citric acid cycle. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* **15**, 183-270.
- Olson M. W. and Kaguni L. S. (1992). 3'→5' exonuclease in *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase. Substrate specificity and functional coordination of nucleotide polymerization and mispair hydrolysis. *J Biol Chem.* **267**, 23136-23142.
- Pagnamenta A. T., Taanman J. W., Wilson C. J., Anderson N. E., Marotta R., Duncan A. J., Bitner-Glindzicz M., Taylor R. W., Laskowski A., Thorburn D. R. and Rahman S. (2006). Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma. *Hum Reprod.* **21**, 2467-2473.
- Palmieri L., Alberio S., Pisano I., Lodi T., Meznaric-Petrusa M., Zidar J., Santoro A., Scarcia P., Fontanesi F., Lamantea E., Ferrero I. and Zeviani M. (2005). Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* **14**, 3079-3088.
- Perham R. N. (2000). Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu Rev Biochem.* **69**, 961-1004.
- Peterson T. A., Prakash L., Prakash S., Osley M. A. and Reed S. I. (1985). Regulation of CDC9, the *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes DNA ligase. *Mol Cell Biol.* **5**, 226-235.
- Petrini J. H., Xiao Y. and Weaver D. T. (1995). DNA ligase I mediates essential functions in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **15**, 4303-4308.
- Phadnis N. and Sia E. A. (2004). Role of the putative structural protein Sed1p in mitochondrial genome maintenance. *J Mol Biol.* **342**, 1115-1129.
- Phadnis N., Sia R. A. and Sia E. A. (2005). Analysis of repeat-mediated deletions in the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **171**, 1549-1559.
- Pinz K. G. and Bogenhagen D. F. (1998). Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol Cell Biol.* **18**, 1257-1265.
- Pinz K. G. and Bogenhagen D. F. (2000). Characterization of a catalytically slow AP lyase activity in DNA polymerase gamma and other family A DNA polymerases. *J Biol Chem.* **275**, 12509-12514.
- Pinz K. G. and Bogenhagen D. F. (2006). The influence of the DNA polymerase gamma accessory subunit on base excision repair by the catalytic subunit. *DNA Repair (Amst).* **5**, 121-128.
- Piskur J. (1997). The transmission disadvantage of yeast mitochondrial intergenic mutants is eliminated in the *mgt1* (*cce1*) background. *J Bacteriol.* **179**, 5614-5617.
- Ponamarev M. V., Longley M. J., Nguyen D., Kunkel T. A. and Copeland, W. C. (2002). Active Site Mutation in DNA Polymerase gamma Associated with Progressive External Ophthalmoplegia Causes Error-prone DNA Synthesis. *J Biol Chem.* **277**, 15225-15228.
- Prakash S., Johnson R. E. and Prakash L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem.* **74**, 317-353.
- Prats E., Noël M., Létourneau J., Tiranti V., Vaqué J., Debón R., Zeviani M., Cornudella L. and Ruiz-Carrillo A. (1997). Characterization and expression of the mouse endonuclease G gene. *DNA Cell Biol.* **16**, 1111-1122.
- Prigent C., Satoh M. S., Daly G., Barnes D. E. and Lindahl T. (1994). Aberrant DNA repair and DNA replication due to an inherited enzymatic defect in human DNA ligase I. *Mol Cell Biol.* **14**, 310-317.
- Quah S. K., von Borstel R. C. and Hastings P. J. (1980). The origin of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **96**, 819-839.

- Rantamäki M., Krahe R., Paetau A., Cormand B., Mononen I. and Udd B. (2001). Adult-onset autosomal recessive ataxia with thalamic lesions in a Finnish family. *Neurology*. 57,1043-9.
- Reenan R. A. and Kolodner R. D. (1992). Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *MSH1* and *MSH2* genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics*. 132, 975-85.
- Ropp P. A. and Copeland W. C. (1995). Characterization of a new DNA polymerase from *Schizosaccharomyces pombe*: a probable homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase gamma. *Gene*. 165, 103-107.
- Ropp P. A. and Copeland W. C. (1996). Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics*. 36, 449-458.
- Rosignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP and Letellier T (2003). Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 370, 751-762.
- Rotman G. and Shiloh Y. (1999). ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*. 18, 6135-6144.
- Rovio A. T., Marchington D. R., Donat S., Schuppe H. C., Abel J., Fritsche E., Elliott D. J., Laippala P., Ahola A. L., McNay D., Harrison R. F., Hughes B., Barrett T., Bailey D. M., Mehmet D., Jequier A. M., Hargreave T. B., Kao S. H., Cummins J. M., Barton D. E., Cooke H. J., Wei Y. H., Wichmann L., Poulton J. and Jacobs H. T. (2001). Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet*. 29, 261-262.
- Saada A. (2004). Deoxyribonucleotides and disorders of mitochondrial DNA integrity. *DNA Cell Biol*. 23, 797-806.
- Sambrook J. and Russel D. W. (2001). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schacherer J., Ruderfer D. M., Gresham D., Dolinski K., Botstein D. and Kruglyak L. (2007). Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains. *PLoS ONE*. 2, e322.
- Schinkel A. H., Koerkamp M. J., Touw E. P. and Tabak H. F. (1987). Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and interaction with core RNA polymerase. *J Biol Chem*. 262, 12785-12791.
- Schofield M. J., Lilley D. M. and White M. F. (1997). Sequence specificity of *CCE1*. *Biochem Soc Trans*. 25, S646.
- Schofield M. J., Lilley D. M. and White M. F. (1998). Dissection of the sequence specificity of the Holliday junction endonuclease *CCE1*. *Biochemistry*. 37, 7733-7740.
- Schwabe M. J., Dobyns W. B., Burke B. and Armstrong D. L. (1997). Valproate-induced liver failure in one of two siblings with Alpers disease. *Pediatr Neurol*. 16, 337-343.
- Sedman T., Kuusk S., Kivi S. and Sedman J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 20, 1816-24.
- Sembongi H., Di Re M., Bokori-Brown M. and Holt I. J. (2007). The yeast Holliday junction resolvase, Cce1, can restore wild-type mitochondrial DNA to human cells carrying rearranged mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet*. 16, 2306-2314.
- Sherman F. (1964). Mutants of yeast deficient in cytochrome c. *Genetics*. 49, 39-48.
- Sherman F., Fink G. R. and Hicks J. B. (1986). *Laboratory Course Manual For Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Skladal D., Halliday J. and Thorburn D. R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*. 126, 1905-1912.
- Sor F. and Fukuhara H. (1984). Erythromycin and spiramycin resistance mutations of yeast mitochondria: nature of the *rib2* locus in the large ribosomal RNA gene. *Nucleic Acids Res*. 12, 8313-8318.
- Spinazzola A., Viscomi C., Fernandez-Vizarra E., Carrara F., D'Adamo P., Calvo S., Marsano R. M., Donnini C., Weiher H., Strisciuglio P., Parini R., Sarzi E., Chan A., DiMauro S., Rötig A., Gasparini P., Ferrero I., Mootha V. K., Tiranti V., Zeviani M. (2006). MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 38, 570-575.
- Steinmetz L. M., Scharfe C., Deutschbauer A. M., Mokranjac D., Herman Z. S., Jones T., Chu A. M., Givner G., Prokisch H., Oefner P. J. and Davis R. W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*. 31, 400-404.
- Stohl L. L. and Clayton D. A. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* contains an RNase MRP that cleaves at a conserved mitochondrial RNA sequence implicated in replication priming. *Mol Cell Biol*. 12, 2561-2569.
- Stuart J. A. and Brown M. F. (2006). Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 1757, 79-89.
- Stuart G. R., Santos J. H., Strand M. K., Van Houten B. and Copeland W. C. (2006). Mitochondrial and nuclear DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet*. 15, 363-374.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prévost M. C., Alzari P. M. and Kroemer G. (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*. 189, 381-394.
- Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y. and Nakamura Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*. 404, 42-49.
- Taylor D. R., Zeyl C. and Cooke E. (2002). Conflicting levels of selection in the accumulation of mitochondrial defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 3690-3694.
- Taylor S. D., Zhang H., Eaton J. S., Rodeheffer M. S., Lebedeva M. A., O'Rourke T. W., Siede W. and Shadel G. S. (2005). The conserved Mec1/Rad53 nuclear checkpoint pathway regulates mitochondrial DNA copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 16, 3010-3018.
- Temin H. M. and Mizutani S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 226, 1211-1213.
- Thomas B. J. and Rothstein R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*. 56, 619-30.
- Thömmes P., Farr C. L., Marton R. F., Kaguni L. S. and Cotterill S. (1995). Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein from *Drosophila* embryos. Physical and biochemical characterization. *J Biol Chem*. 270, 21137-21143.
- Tiranti V., Savoia A., Forti F., D'Apolito M. F., Centra M., Rocchi M. and Zeviani M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPO) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet*. 6, 615-625.
- Tomkinson A. E., Vijayakumar S., Pascal J. M. and Ellenberger T. (2006). DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function. *Chem Rev*. 106, 687-699.
- Torpey L. E., Gibbs P. E., Nelson J. and Lawrence C. W. (1994). Cloning and sequence of *REV7*, a gene whose function is required for DNA damage-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10, 1503-1509.
- Townsend J. P., Cavalieri D. and Hartl D. L. (2003). Population Genetic Variation in Global Gene Expression. *Mol Biol Evol*. 20, 955-963.
- Tyynismä H., Sembongi H., Bokori-Brown M., Granycome C., Ashley N., Poulton J., Jalanko A., Spelbrink J. N., Holt I. J. and Suomalainen A. (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet*. 13, 3219-3227.

- Valente L., Tiranti V., Marsano R. M., Malfatti E., Fernandez-Vizarra E., Donnini C., Mereghetti P., De Gioia L., Burlina A., Castellan C., Comi G. P., Savasta S., Ferrero I. and Zeviani M. (2007). Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet.* **80**, 44-58.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**, 44-84.
- Valnot I., Von Kleist-Retzow J. C., Barrientos A., Gorbatyuk M., Taanman J. W., Mehaye B., Rustin P., Tzagoloff A., Munnich A. and Rotig A. (2000). A mutation in the human heme A farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet.* **9**, 1245-1249.
- Van Dyck E., Foury F., Stillman B. and Brill S. J. (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO J.* **11**, 3421-3430.
- Van Goethem G., Dermaut B., Lofgren A., Martin J. J. and Van Broeckhoven C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet.* **28**, 211-212.
- Van Goethem G., Luoma P., Rantamäki M., Al Memar A., Kaakkola S., Hackman P., Krahe R., Löfgren A., Martin J. J., De Jonghe P., Suomalainen A., Udd B. and Van Broeckhoven C. (2004). POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology.* **63**, 1251-1257.
- Van Goethem G., Martin J. J., Dermaut B., Lofgren A., Wibail A., Ververken D., Tack P., Dehaene I., Van Zandijcke M., Moonen M., Ceuterick C., De Jonghe P. and Van Broeckhoven C. (2003). Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord.* **13**, 133-142.
- Van Goethem G., Martin J.-J., Lofgren A., Dehaene I., Tack P., Van Zansijcke M., Ververken D., Ceuterick C. and Van Broeckhoven C. (1997). Unusual presentation and clinical variability in Belgian pedigrees with progressive external ophthalmoplegia and multiple deletions of mitochondrial DNA. *Eur J Neurol.* **4**, 476-484.
- Van Goethem G., Martin J. J. and Van Broeckhoven C. (2002). Progressive external ophthalmoplegia and multiple mitochondrial DNA deletions. *Acta Neurol. Belg.* **102**, 39-42.
- Van Houten B., Woshner V. and Santos J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* **5**, 145-152.
- Vanderstraeten S., Van den Brûle S., Hu J. and Foury F. (1998). The role of 3'-5' exonucleolytic proofreading and mismatch repair in yeast mitochondrial DNA error avoidance. *J Biol Chem.* **273**, 23690-23697.
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J., Gabor Miklos G. L., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau J., McKusick V. A., Zinder N., Levine A. J., Roberts R. J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Di Francesco V., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A. E., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T. J., Higgins M. E., Ji R. R., Ke Z., Ketchum K. A., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G. V., Milshina N., Moore H. M., Naik A. K., Narayan V. A., Neelam B., Nusskern D., Rusch D. B., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., Yao A., Ye J., Zhan M., Zhang W., Zhang H., Zhao Q., Zheng L., Zhong F., Zhong W., Zhu S., Zhao S., Gilbert D., Baumhueter S., Spier G., Carter C., Cravchik A., Woodage T., Ali F., An H., Awe A., Baldwin D., Baden H., Barnstead M., Barrow I., Beeson K., Busam D., Carver A., Center A., Cheng M. L., Curry L., Danaher S., Davenport L., Desilets R., Dietz S., Dodson K., Doup L., Ferreira S., Garg N., Gluecksmann A., Hart B., Haynes J., Haynes C., Heiner C., Hladun S., Hostin D., Houck J., Howland T., Ibegwam C., Johnson J., Kalush F., Kline L., Koduru S., Love A., Mann F., May D., McCawley S., McIntosh T., McMullen I., Moy M., Moy L., Murphy B., Nelson K., Pfannkoch C., Pratt S., Puri V., Qureshi H., Reardon M., Rodriguez R., Rogers Y. H., Romblad D., Ruhfel B., Scott R., Sitter C., Smallwood M., Stewart E., Strong R., Suh E., Thomas R., Tint N. N., Tse S., Vech C., Wang G., Wetter J., Williams S., Williams M., Windsor S., Winn-Deen E., Wolfe K., Zaveri J., Zaveri K., Abril J. F., Guigó R., Campbell M. J., Sjolander K. V., Karlak B., Kejariwal A., Mi H., Lazareva B., Hatton T., Narechania A., Diemer K., Muruganujan A., Guo N., Sato S., Bafna V., Istrail S., Lippert R., Schwartz R., Walenz B., Yooseph S., Allen D., Basu A., Baxendale J., Blick L., Caminha M., Carnes-Stine J., Caulk P., Chiang Y. H., Coyne M., Dahlke C., Mays A., Dombroski M., Donnelly M., Ely D., Esparham S., Folsler C., Gire H., Glanowski S., Glasser K., Glodek A., Gorokhov M., Graham K., Gropman B., Harris M., Heil J., Henderson S., Hoover J., Jennings D., Jordan C., Jordan J., Kasha J., Kagan L., Kraft C., Levitsky I., Lewis M., Liu X., Lopez J., Ma D., Majoros W., McDaniel J., Murphy S., Newman M., Nguyen T., Nguyen N., Nodell M., Pan S., Peck J., Peterson M., Rowe W., Sanders R., Scott J., Simpson M., Smith T., Sprague A., Stockwell T., Turner R., Venter E., Wang M., Wen M., Wu D., Wu M., Xia A., Zandieh A. and Zhu X. (2001). The sequence of the human genome. *Science.* **291**, 1304-1351.
- Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L. and Vaux D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* **102**, 43-53.
- Wallace D. C. (1999). Mitochondrial disease in man and mouse. *Science.* **283**, 1482-1488.
- Wallace D. C. (2001). Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet.* **106**, 71-93.
- Wallace D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* **39**, 359-407.
- Wang P. J., Chabes A., Casagrande R., Tian X. C., Thelander L. and Huffaker T. C. (1997a). Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol Cell Biol.* **17**, 6114-6121.
- Wang Y., Farr C. L. and Kaguni L. S. (1997b). Accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Cloning, molecular analysis, and association in the native enzyme. *J Biol Chem.* **272**, 3640-3646.
- Wang Y. and Kaguni L. S. (1999). Baculovirus expression reconstitutes *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem.* **274**, 28972-28977.
- Wanrooij S., Luoma P., van Goethem G., van Broeckhoven C., Suomalainen A. and Spelbrink J. N. (2004). Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3053-3064.
- Wei Y. H. and Lee H. C. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med.* **227**, 671-682.
- Weissbach A., Baltimore D., Bollum F., Gallo R. and Korn D. (1975). Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases. *Science.* **190**, 401-402.
- Wernette C. M., Conway M. C. and Kaguni L. S. (1988). Mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos: kinetics, processivity, and fidelity of DNA polymerization. *Biochemistry.* **27**, 6046-6054.
- White M. F. and Lilley D. M. (1996). The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* **257**, 330-341.

- White M. F. and Lilley D. M. (1997). The resolving enzyme *CCE1* of yeast opens the structure of the four-way DNA junction. *J Mol Biol.* **266**, 122-134.
- Willer M., Rainey M., Pullen T. and Stirling C. J. (1999). The yeast *CDC9* gene encodes both a nuclear and a mitochondrial form of DNA ligase I. *Curr Biol.* **9**, 1085-1094.
- Williams A. J., Wernette C. M. and Kaguni L. S. (1993). Processivity of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Effects of reaction conditions and enzyme purity. *J Biol Chem.* **268**, 24855-24862.
- Winterthun S., Ferrari G., He L., Taylor R. W., Zeviani M., Turnbull D. M., Engelsens B. A., Moen G. and Bindoff, L. A. (2005). Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology.* **64**, 1204-1208.
- Winzler E. A., Shoemaker D. D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J. D., Bussey H., Chu A. M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S. W., El Bakkoury M., Foury F., Friend S. H., Gentale E., Giaever G., Hegemann J. H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D. J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J. L., Riles L., Roberts C. J., Ross-MacDonald P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Storms R. K., Véronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T. R., Wysocki R., Yen G. S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M. and Davis R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* **285**, 901-906.
- Wong T. W. and Clayton D. A. (1985a). *In vitro* replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell.* **42**, 951-958.
- Wong T. W. and Clayton D. A. (1985b). Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. *J Biol Chem.* **260**, 11530-11535.
- Xu B. and Clayton D. A. (1992). Assignment of a yeast protein necessary for mitochondrial transcription initiation. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1053-1059.
- Yakubovskaya E., Chen Z., Carrodegua J. A., Kisker C. and Bogenhagen D. F. (2006). Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *J Biol Chem.* **281**, 374-82.
- Yamanaka H., Gatanaga H., Kosalaraksa P., Matsuoka-Aizawa S., Takahashi T., Kimura S. and Oka S. (2007). Novel Mutation of Human DNA Polymerase gamma Associated with Mitochondrial Toxicity Induced by Anti-HIV Treatment. *J Infect Dis.* **195**, 1419-1425.
- Yang M. Y., Bowmaker M., Reyes A., Vergani L., Angeli P., Gringeri E., Jacobs H. T. and Holt I. J. (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell.* **111**, 495-505.
- Yang C., Curth U., Urbanke C. and Kang C. (1997). Crystal structure of human mitochondrial single-stranded DNA binding protein at 2.4 Å resolution. *Nat Struct Biol.* **4**, 153-157.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**, 103-119.
- Yao R., Zhang Z., An X., Bucci B., Perlstein D. L., Stubbe J. and Huang M. (2003). Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**, 6628-6633.
- Yasukawa T., Yang M. Y., Jacobs H. T. and Holt I. J. (2005). A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell.* **18**, 651-662.
- Ye F., Carrodegua J. A. and Bogenhagen D. F. (1996). The gamma subfamily of DNA polymerases: cloning of a developmentally regulated cDNA encoding *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1481-1488.
- Young M. J., Theriault S. S., Li M. and Court D. A. (2006). The carboxyl-terminal extension on fungal mitochondrial DNA polymerases: identification of a critical region of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **23**, 101-116.
- Zassenhaus H. P., Hofmann T. J., Uthayashanker R., Vincent R. D. and Zona M. (1988). Construction of a yeast mutant lacking the mitochondrial nuclease. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3283-3296.
- Zelenaya-Troitskaya O., Newman S. M., Okamoto K., Perlman P. S. and Butow R. A. (1998). Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **148**, 1763-1776.
- Zeviani M., Amati P., Comi G., Fratta G., Mariotti C. and Tiranti V. (1995). Searching for genes affecting the structural integrity of the mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta.* **1271**, 153-158.
- Zeviani M. and Carelli V. (2003). Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol.* **16**, 585-594.
- Zeviani M. and Carelli V. (2007). Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol.* **20**, 564-571.
- Zeviani M. and Di Donato S. (2004). Mitochondrial disorders. *Brain.* **127**, 2153-2172.
- Zeviani M., Servidei S., Gellera C., Bertini E., DiMauro S. and DiDonato S. (1989). An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature.* **339**, 309-311.
- Zhang H., Barceló J. M., Lee B., Kohlhaagen G., Zimonjic D. B., Popescu N. C. and Pommier Y. (2001). Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 10608-10613.
- Zhang H., Chatterjee A. and Singh K. K. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* polymerase zeta functions in mitochondria. *Genetics.* **172**, 2683-2688.
- Zhao X., Chabes A., Domkin V., Thelander L. and Rothstein R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.* **20**, 3544-3553.
- Zhao X., Georgieva B., Chabes A., Domkin V., Ippel J. H., Schleucher J., Wijmenga S., Thelander L. and Rothstein R. (2000a). Mutational and structural analyses of the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 define its Rnr1 interaction domain whose inactivation allows suppression of *mec1* and *rad53* lethality. *Mol Cell Biol.* **20**, 9076-9083.
- Zhao R., Gish K., Murphy M., Yin Y., Notterman D., Hoffman W. H., Tom E., Mack D. H. and Levine A. J. (2000b). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* **14**, 981-993.
- Zhao X., Muller E. G. and Rothstein R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell.* **2**, 329-40.
- Zhao X. and Rothstein R. (2002). The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**, 3746-3751.
- Zimmermann F. K., Kern R. and Rasenberg H. (1975). A yeast for simultaneous detection of induced mitotic crossing-over, mitotic gene conversion and reverse mutation. *Mutat Res.* **28**, 381-388.
- Zitomer R. S. and Lowry C. V. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **56**, 1-11.
- Zweifel S. G. and Fangman W. L. (1991). A nuclear mutation reversing a biased transmission of yeast mitochondrial DNA. *Genetics.* **128**, 241-249.

Allegato 1:

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

Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans

Enrico Baruffini^{1,2,†}, Tiziana Lodi^{1,†}, Cristina Dallabona¹, Andrea Puglisi³, Massimo Zeviani^{4,*} and Iliana Ferrero¹

¹Department of Genetics, Biology of Microorganisms, Anthropology, Evolution, University of Parma, 43100 Parma, Italy, ²Institut des sciences de la vie, Faculté d'Ingénierie biologique, Université Catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium, ³Department of Molecular Biology and NCCR Program 'Frontiers in Genetics', University of Geneva, Sciences III, CH-1211, Geneva 4, Switzerland and ⁴Pierfranco and Luisa Mariani Center for Mitochondrial Disease, Division of Molecular Neurogenetics, National Neurological Institute 'C. Besta', 20126 Milano, Italy

Received June 20, 2006; Revised and Accepted August 2, 2006

The human POLG gene encodes the catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase γ (pol γ). Mutations in pol γ are associated with a spectrum of disease phenotypes including autosomal dominant and recessive forms of progressive external ophthalmoplegia, spino-cerebellar ataxia and epilepsy, and Alpers–Huttenlocher hepatocerebral poliodystrophy. Multiple deletions, or depletion of mtDNA in affected tissues, are the molecular hallmarks of pol γ mutations. To shed light on the pathogenic mechanisms leading to these phenotypes, we have introduced in *MIP1*, the yeast homologue of POLG, two mutations equivalent to the human Y955C and G268A mutations, which are associated with dominant and recessive PEO, respectively. Both mutations induced the generation of *petite* colonies, carrying either rearranged (ρ^-) or no (ρ^0) mtDNA. Mutations in genes that control the mitochondrial supply of deoxynucleotides (dNTP) affect the mtDNA integrity in both humans and yeast. To test whether the manipulation of the dNTP pool can modify the effects of pol γ mutations in yeast, we have overexpressed a dNTP checkpoint enzyme, ribonucleotide reductase, *RNR1*, or deleted its inhibitor, *SML1*. In both mutant strains, the *petite* mutability was dramatically reduced. The same result was obtained by exposing the mutant strains to dihydrolipoic acid, an anti-oxidant agent. Therefore, an increase of the mitochondrial dNTP pool and/or a decrease of reactive oxygen species can prevent the mtDNA damage induced by pol γ mutations in yeast and, possibly, in humans.

INTRODUCTION

Different mutations in POLG, the gene encoding the catalytic subunit of the mitochondrial DNA polymerase (polymerase gamma, pol γ) (1) are associated with a spectrum of human mitochondrial disorders, including autosomal dominant (ad) and autosomal recessive (ar) progressive external ophthalmoplegia (PEO), juvenile spino-cerebellar ataxia and epilepsy (2) and infantile hepatopatic poliodystrophy, or

Alpers–Huttenlocher syndrome (AHS) (3). Adult-onset adPEO and arPEO syndromes are characterized by the accumulation of multiple mtDNA deletions in affected tissues (4), whereas the most severe syndrome, AHS, shows marked reduction in the mtDNA copy number in liver (5) and, possibly, brain. Beside mutations in POLG, adPEO can also be caused by heterozygous mutations in ANT1, encoding the ADP/ATP translocator (6), and TWINKLE, encoding a mitochondrial helicase (7). ANT1 and POLG genes,

*To whom correspondence should be addressed at: Division of Molecular Neurogenetics, National Neurological Institute 'C. Besta' Via Temolo 4, 20126 Milano, Italy, Tel: +390 22394633; Fax: +390 22394619; Email: zeviani@istituto-besta.it

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

but not TWINKLE, are highly conserved from humans to the facultative budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the yeast *AAC2* gene corresponds to ANT1 (8), whereas *MIP1* corresponds to POLG (9). This makes it possible to introduce and study in *AAC2* and *MIP1* the mutations that are equivalent to those affecting mtDNA stability in humans (10–12).

Human pol γ is composed of a 140 kDa catalytic subunit A and a 55 kDa accessory subunit B, which increases the processivity of mtDNA synthesis. Pol γ A comprises a polymerase domain and an exonuclease proofreading domain, separated by a linker region of 482 amino acids. Over 60 PEO-associated mutations have been found in POLG (13,14). Most of the dominant POLG mutations are in the polymerase domain, whereas most of the recessive mutations are in the exonuclease or in the spacer domains. Only one mutation has been found in pol γ B (14).

In the present work, we have introduced in *MIP1* two mutations that are equivalent to two pathogenic mutations in pol γ A, the Y955C and the G268A. The first mutation is associated with arPEO (1), and the second is associated with arPEO (15). We have demonstrated that the equivalent yeast mutations behave as dominant and recessive traits, respectively, and, by inducing severe damage to, or the loss of mtDNA, determined an increase of either ρ^- or ρ^0 *petite* colonies. We have also shown that the yeast phenotype can be suppressed by increasing the mitochondrial dNTP pool, through the overexpression of *RNR1*, encoding the ribonucleotide reductase (*RNR1*) (16,17), or the deletion of its inhibitor, *SML1* (18,19). Finally, we have studied the effect of a reactive oxygen species (ROS) scavenger on our mutants. Our results indicate that ROS damage contributes to mtDNA instability in yeast.

RESULTS

Effect of *MIP1* alleles equivalent to PEO-associated hPOLG mutants on oxidative growth phenotype

Phenotypic analysis showed that the haploid *mip1^{Y757C}* mutant strain ($\Delta mip1//mip1^{Y757C}$) was unable to grow on 2% ethanol, indicating the absence of respiration. As exemplified by the experiment shown in Figure 1, the spectrum profile of mitochondria isolated from this strain consistently lacked the peaks specific to cytochromes b and aa3, which are part of the mtDNA-dependent complexes III and IV of the respiratory chain, whereas the peak specific to cytochrome c, a nucleus-encoded protein, was normal. Contrariwise, the haploid *mip1^{G224A}* mutant strain ($\Delta mip1//mip1^{G224A}$) was able to grow on ethanol, displayed a normal cytochrome profile (Fig. 1) and retained a normal respiratory activity (data not shown). The *MIP1*/ $\Delta mip1$ heterozygous diploid strain, carrying either the *mip1^{Y757C}* or the *mip1^{G224A}* mutant alleles (*MIP1*/ $\Delta mip1//mip1^{Y757C}$ and *MIP1*/ $\Delta mip1//mip1^{G224A}$) both failed to show a significant growth defect; the cytochrome profile and respiration were normal in both strains.

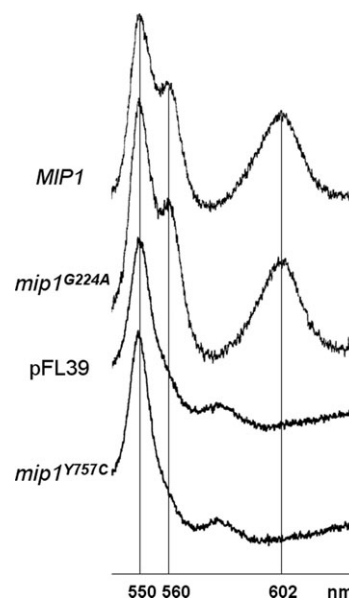


Figure 1. Oxidized versus reduced cytochrome spectra of the $\Delta mip1$ strain (DWM-5A), transformed with wt *MIP1*, pFL39 plasmid (no insert), *mip1^{G224A}* and *mip1^{Y757C}* mutant alleles cloned in pFL39. The peaks at 550, 560 and 602 nm (vertical bars) correspond to cytochromes c, b and aa3, respectively. The height of each peak relative to the baseline of each spectrum is an index of cytochrome content.

Determination of *petite* frequency and evaluation of the nature of the *petite* mutations

In humans, both G268A and Y955C mutations induce the accumulation of multiple deletions of mtDNA. In *S. cerevisiae*, deletions of mtDNA are known as *petite* mutations. Conditions that increase mtDNA mutability also increase the frequency of *petites* (20). In order to evaluate whether an effect similar to that observed in humans was produced by the equivalent mutations in yeast, we measured the frequency of *petite* mutants in haploid $\Delta mip1$ strains carrying either the *mip1^{G224A}* or the *mip1^{Y757C}* mutant allele. The results reported in Figure 2 indicate that, in the *mip1^{Y757C}* haploid strain, the *petite* frequency was 100%, as previously described (12). In the *mip1^{G224A}* haploid strain, the *petite* frequency was ~2.5-fold the frequency determined in $\Delta mip1$ haploid strains transformed with the *MIP1* wild-type allele.

In the *MIP1*/ $\Delta mip1$ diploid strain carrying the *mip1^{G224A}* mutant alleles, the *petite* frequency was equivalent to that of the background level observed in the same diploid strain carrying the *MIP1* allele. This result indicates that *mip1^{G224A}* behaves as a recessive allele in yeast, like the corresponding G268A mutation does in humans. In the same strain carrying the *mip1^{Y757C}* mutant allele, the *petite* frequency was ~21-fold, indicating that the mutation is dominant in yeast, as it is in humans.

Petite mutants can be either ρ^- (that is, cells in which the mtDNA is partially deleted) or ρ^0 (that is, cells in which the mtDNA is completely lost). When ρ^- mutants are crossed with a *mit*⁻ mutant carrying a point mutation, ρ^+ cells are produced by recombination, provided that the *mit*⁻ point mutation maps in a region conserved in the ρ^- mtDNA. Contrariwise, ρ^0 mutants, which are completely devoid of

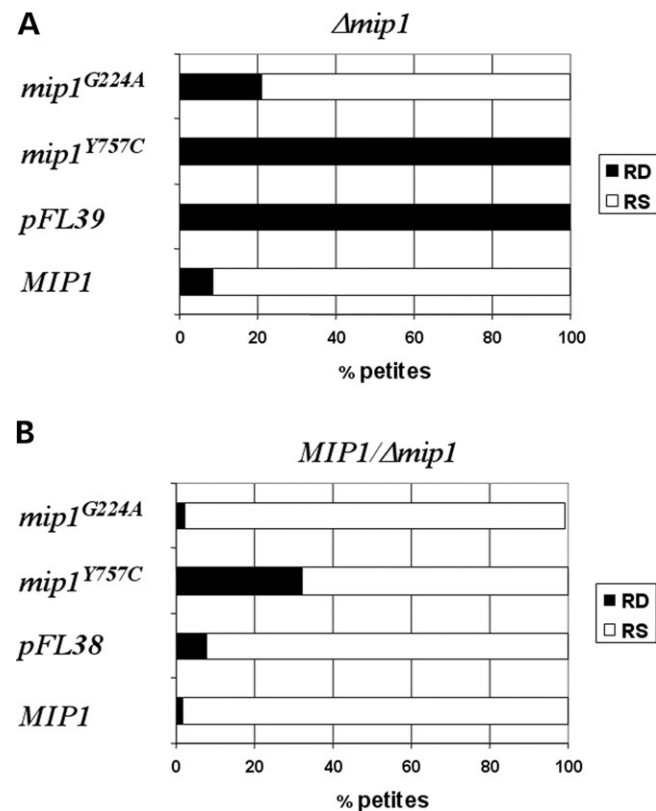


Figure 2. Determination of *petite* frequency in (A) haploid $\Delta mip1$ strain transformed with wt *MIP1*, pFL39 plasmid without insert, $mip1^{G224A}$ and $mip1^{Y757C}$ mutant alleles cloned in pFL39; (B) heterozygous diploid $MIP1/\Delta mip1$ transformed with wt *MIP1*, pFL38 plasmid without insert, $mip1^{G224A}$ and $mip1^{Y757C}$ mutant alleles cloned in pFL38. More than 4000 colonies/strain were scored. All values are means of three independent experiments. In no case, the variation was higher than 15%. RD, respiratory deficient cells; RS, respiratory sufficient cells.

mtDNA, are unable to produce ρ^+ cells. In order to evaluate the nature of the *petite* colonies produced by our mutant strains, we crossed 200 *petite* clones from the $\Delta mip1//MIP1$ strain and 200 *petite* clones from $\Delta mip1//mip1^{G224A}$ with four *mit*⁻ mutants. Each *mit*⁻ mutant harbours a different deleterious point mutation, namely, in the first and sixth exons of the *cob* gene, in the *cox2* gene and in the *cox3* gene (see Methods). The diploid clones resulting from the crosses were tested for their ability to grow on glycerol. Approximately 56% of the $\Delta mip1//MIP1$ and 54% of the $\Delta mip1//mip1^{G224A}$ *petite* clones were able to complement at least one of the *mit*⁻ mutations, indicating that these clones were ρ^- (Table 1). None of the clones derived from the $\Delta mip1//mip1^{Y757C}$ strain was able to complement any of the *mit*⁻ mutations, indicating that they were ρ^0 . This was consistently confirmed by Southern-blot analysis, as exemplified in Figure 3 (see also Methods).

The complementation test cannot be used to evaluate the nature of the *petite* mutants in wt/mutant diploid strains. To mimic the diploid condition, we have constructed heteroallelic strains by introducing the wt *MIP1* or the mutated $mip1^{Y757C}$ alleles in the haploid wt strain W303-1B. We first established that the heteroallelic $MIP1//mip1^{Y757C}$ and the homoallelic

Table 1. Percentage of *petite* ($\rho^0 + \rho^-$) and percentage of ρ^0 mutants produced in different genetic backgrounds

Relevant genotype	wt % <i>petites</i>	% ρ^0	<i>RNR1</i> % <i>petites</i>	% ρ^0	<i>Δsml1</i> % <i>petites</i>	% ρ^0
Haploid strains						
$\Delta mip1//MIP1$	9	4	1.9	0.6	1.8	0.9
$\Delta mip1//mip1^{G224A}$	21	10	3.2	1.1	3.9	1.3
Heteroallelic strains						
$MIP1//MIP1$	1.5	0.4	0.5	0.1	0.5	0.1
$MIP1//mip1^{Y757C}$	32	16	9.3	3.2	4.5	1.3

Petite frequencies were defined as the percentage of colonies showing the *petite* phenotype after 5 days incubation at 28°C. More than 4000 colonies/strains were scored. All values are means of three independent experiments. In no case the variation was higher than 15%. ρ^0 frequencies were calculated as the percentage of clones unable to complement any of *mit*⁻ mutants tested.

$MIP1//MIP1$ strains produced *petite* colonies with a frequency similar to that observed in diploid strains carrying the corresponding $mip1^{Y757C}$ and *MIP1* alleles (data not shown). The transformants were then crossed with the *mit*⁻ testers. Approximately 74% of 200 $MIP1//MIP1$ homoallelic *petite* clones was able to complement each of the *mit*⁻ mutations but only 49% of 500 heteroallelic $MIP1//mip1^{Y757C}$ *petite* clones was able to do so, again indicating that the $Y757C$ mutation induces the loss of mtDNA (Table 1).

Determination of mtDNA point mutations

We next analysed whether our *mip1* mutations increased the mtDNA point mutagenesis, as demonstrated by an increase in the frequency of erythromycin-resistant (*Ery*^R) mutants. Resistance to the drug erythromycin in yeast is acquired through specific point mutations in the mtDNA-encoded rRNA genes and therefore is a convenient, direct measurement of mtDNA point mutagenesis *in vivo* (21). Using this assay, we have measured mtDNA mutation frequencies in the haploid strain $\Delta mip1//mip1^{G224A}$ and in the diploid strains $MIP1/\Delta mip1//mip1^{G224A}$ and $MIP1/\Delta mip1//mip1^{Y757C}$. Both $mip1^{G224A}$ in haploid, and $mip1^{Y757C}$ in diploid conditions showed a 10-fold and a 20-fold increase, respectively, in mtDNA point mutagenesis, compared with that observed in the wild-type strain. However, the $MIP1//mip1^{G224A}$ heterozygous diploid strain failed to show any increase of *Ery*^R mutant frequency (Table 2), again indicating that this mutation behaves as a recessive trait also for this phenotype.

Effect of increasing dNTP pool on mitochondrial mutability

We next tested whether an increase in the level of the dNTP pool could rescue the mitochondrial mutability observed in the presence of the two pathological *mip1* mutations. The increase of the dNTP pool was obtained either by overexpressing the *RNR1* gene, which encodes the large subunit of the

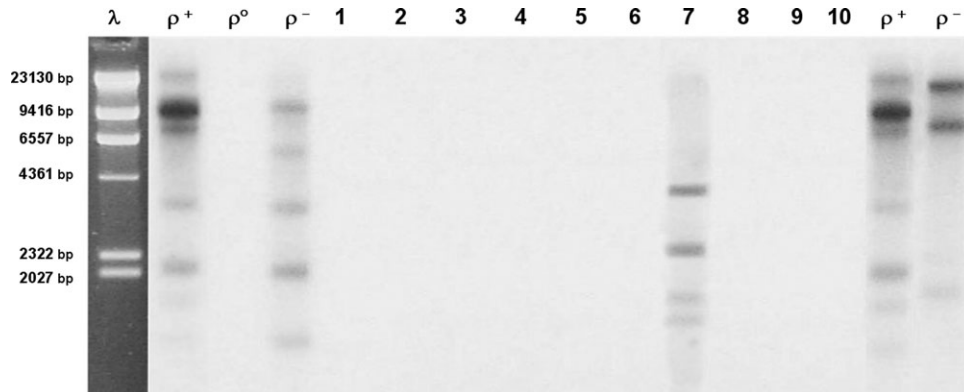


Figure 3. Southern-blot analysis of mtDNA isolated from *petite* clones unable to complement any of the *mit*[−] mutants tested (lanes 1–10). mtDNA was prepared and analysed as described in Materials and Methods from cells grown on YNB medium supplemented with 2% glucose. mtDNA (1 µg) was digested with *EcoRV* and hybridized with an mtDNA-specific probe. Lane 7 corresponds to an mtDNA-rearranged *ρ*[−] clone; lanes 1–6 and 8–10 correspond to mtDNA-less *ρ*⁰ clones. The mtDNA hybridization pattern of a respiratory sufficient *ρ*⁺ strain is shown as a normal control; examples of abnormal hybridization patterns were obtained from a respiratory-deficient mtDNA-less *ρ*⁰ strain, and from two respiratory-deficient, mtDNA-rearranged *ρ*[−] strains.

Table 2. Frequency of Ery^R mutants

Relevant genotype	wt	$\Delta sml1$
Haploid strains		
$\Delta mip1//MIP1$	1.1×10^{-8}	1.2×10^{-8}
$\Delta mip1//mip1^{G224A}$	9.8×10^{-8}	11.5×10^{-8}
Diploid strains		
$MIP1/\Delta mip1//MIP1$	1.0×10^{-8}	0.9×10^{-8}
$MIP1/\Delta mip1//pFL38$	3.2×10^{-8}	3.5×10^{-8}
$MIP1/\Delta mip1//mip1^{Y757C}$	11.4×10^{-8}	5.6×10^{-8}
$MIP1/\Delta mip1//mip1^{G224A}$	1.1×10^{-8}	1.1×10^{-8}

The frequency of erythromycin resistant mutants was calculated as number of Ery^R colonies/total number of colonies, as described in Materials and Methods.

ribonucleotide reductase (22) or by deleting the *SML1* gene, which encodes an inhibitor of the latter activity (18).

We transformed haploid and diploid strains harbouring the *mip1*^{G224A} or the *mip1*^{Y757C} alleles with a multicopy plasmid carrying the *RNR1* gene (plasmid pWJ841). We also constructed a haploid $\Delta sml1$, $\Delta mip1$ strain and a diploid $\Delta sml1/\Delta sml1$ *MIP1*/ $\Delta mip1$ strain, which were transformed with either one of three different plasmids: the first plasmid carried the wt *MIP1* allele, the second the *mip1*^{G224A} allele and the third the *mip1*^{Y757C} allele. The results reported in Figure 4 indicate that both conditions caused dramatic decreases of the *petite* frequencies in the mutant strains. The *petite* mutability was reduced approximately to the same extent, suggesting that the protective effect on mtDNA is likely due to the increase of the dNTP pool and not to an unrelated effect of the *RNR1* overexpression or of the *SML1* deletion.

Decreased *petite* mutability was associated with decreased *ρ*⁰ frequency (Table 1). In the presence of *RNR1* overexpression, the proportion of haploid $\Delta mip1//MIP1$ *ρ*⁰ clones was reduced from 46 to 33% and in the presence of the *SML1* deletion was reduced to 28%. Similar results were obtained in the haploid $\Delta mip1//mip1^{G224A}$ strain. The heteroallelic strain, *MIP1*/*mip1*^{Y757C} showed a reduction of *ρ*⁰ clones from 51

to 35% in the presence of overexpressed *RNR1* and to 29% in the presence of $\Delta sml1$, whereas no reduction was observed in the *MIP1*/*MIP1* homoallelic strain. The 4–5-fold decrease of *petite* mutability and the 7–10-fold decrease of *ρ*⁰ frequency suggest that the increase of the dNTP pool contributed to maintain mtDNA integrity and stability.

Since the effects obtained by *RNR1* overexpression were similar to those obtained with *SML1* deletion, we evaluated the effect on mtDNA point mutability only in the $\Delta sml1$ background. The number of Ery^R mutants was unchanged in the presence of the *mip1*^{G224A} mutation, but decreased by ~2-fold in the presence of the *mip1*^{Y757C} mutation (Table 2).

Role of ROS in mtDNA mutability

Increased production of ROS is associated with an increase in the accumulation of mtDNA rearrangements (23,24). To address this issue in our system, we analysed the effect of the ROS scavenger dihydrolipoic acid on the *petite* mutability of the heterozygous *MIP1*/ $\Delta mip1$ diploid strain carrying the *mip1*^{Y757C} allele, as well as of the $\Delta mip1$ haploid strain carrying the *mip1*^{G224A} allele. Exposure to dihydrolipoic acid decreased significantly the *petite* mutability in both cases by a factor of six to eight. A clear, albeit less prominent, effect was also observed in the *mip1* and *MIP1*/*mip1* strains carrying the wild-type *MIP1* allele (Fig. 5).

DISCUSSION

The human Y955C pol γ mutation is located in the polymerase domain. Its fidelity is 42-fold decreased in an exonuclease-deficient background and 2-fold decreased in an exonuclease-proficient background (25); its polymerase activity is 3000-fold decreased (26). The yeast mutation *mip1*^{Y757C}, corresponding to Y955C, behaved like the *mip1* null mutation when introduced into a $\Delta mip1$ haploid strain. It induced a dramatic loss of mitochondrial DNA, as shown by the production of 100% *petite* mutants that were all *ρ*⁰, that is, mtDNA-less cells. In a *MIP1*/*mip1* heterozygous diploid strain, the

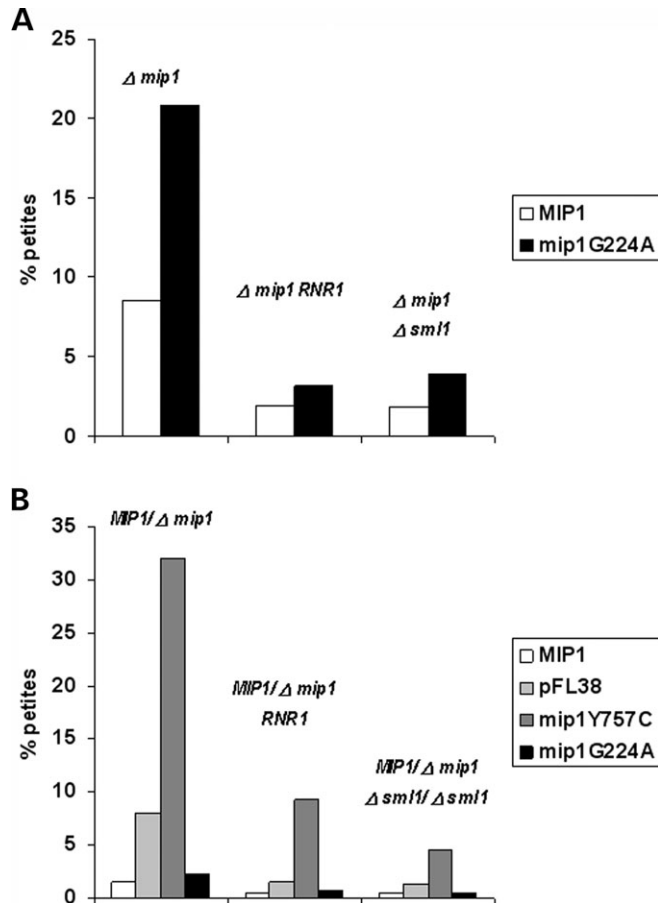


Figure 4. Determination of *petite* frequency in the presence of *RNR1* overexpression and *SML1* deletion. Relevant genotypes of different strains are indicated on top of the bars. Bars indicate transformants with *MIP1* or different *mip1* mutant alleles, as indicated. (A) Haploid strains transformed with wt *MIP1* and *mip1*^{G224A} mutant allele cloned in pFL39; (B) diploid transformed with wt *MIP1*, pFL38 plasmid without insert, *mip1*^{G224A} and *mip1*^{Y757C} mutant alleles cloned in pFL38. More than 4000 colonies/strains were scored. All values are means of three independent experiments. In no case the variation was higher than 15%.

mip1^{Y757C} mutation caused a 20-fold increase in *petite* mutability compared with the *MIP1* wt allele and a 4-fold increase compared to the *mip1* null allele. The *mip1*^{Y757C} mutation caused also an increase of point mutability of mtDNA, leading to a 10-fold increase of Ery^R mutations compared with the *MIP1* wt allele and a 3-fold increase compared with the $\Delta mip1$ null allele. These results indicate that the *mip1*^{Y757C} behaves as a dominant allele, since its presence is more deleterious to mtDNA than the absence of the *MIP1* gene itself. This behaviour mimics exactly what is observed in humans.

The human G268A is a missense mutation in the proofreading exonuclease domain of pol γ A. In homozygous conditions, the human G268A mutation causes the accumulation of both mtDNA deletions and point mutations (27). We have observed reduced fidelity of the homologous mutation also in yeast, where the equivalent *mip1*^{G224A} allele was associated with a 2.5-fold increase in the frequency of *petite* clones and a 10-fold increase in the point mutability of mtDNA. Therefore, the phenotype is recessive in yeast as it is in humans.

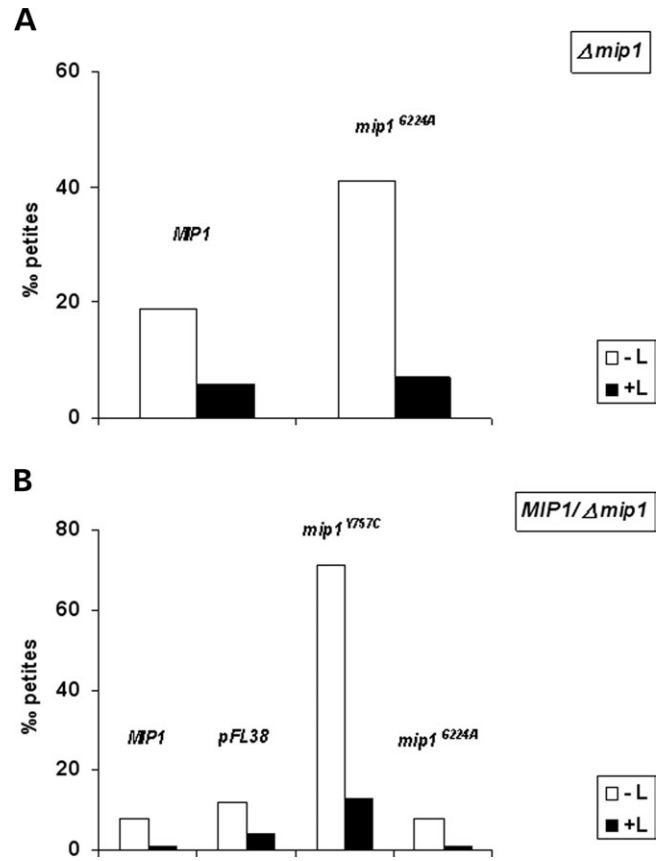


Figure 5. Determination of *petite* frequency in the presence/absence of 30 μ M dihydrolipoic acid (A) haploid $\Delta mip1$ strain transformed with wt *MIP1* and *mip1*^{G224A} mutant allele cloned in pFL39; (B) heterozygous diploid *MIP1/\Delta mip1* transformed with wt *MIP1*, pFL38 plasmid without insert, *mip1*^{G224A} and *mip1*^{Y757C} mutant alleles cloned in pFL38. More than 4000 colonies/strains were scored. All values are means of three independent experiments. In no case the variation was higher than 15%. -L, cells untreated with dihydrolipoic acid; +L, cells treated with dihydrolipoic acid.

The recessive phenotype is formally indicative of a complementation exerted by the wild-type allele and is possibly due to the ability of the wild-type *MIP1* polymerase to proofread errors introduced by the mutant polymerase.

Mutations in genes that control the mitochondrial supply of deoxynucleotides (dNTP) affect the mtDNA integrity in both humans (28) and yeast (29).

The level of dNTP pools is under an evolutionary conserved surveillance system that maintains genomic stability. One important checkpoint of this control system is the *RNR1*. In yeast, mutations in *RNR1* increase *petite* mutations (30). In both yeast and humans, the transcription of *RNR1* is induced after DNA damage. In addition, the yeast mtDNA-damage-checkpoint proteins also regulate the *RNR1* inhibitor Sml1p. After DNA damage or at S phase, the *MEC1* and *RAD53* gene products control the phosphorylation and the subsequent degradation of the Sml1 protein (31). This control contributes to increase the synthesis of dNTPs, necessary for DNA replication and repair. Overexpression of *RNR1* (32) or deletion of *SML1* (18), both are able to rescue the *petite*-inducing phenotype of a specific point mutation in yeast pol γ (*mip1-I*).

Here we show that either *RNR1* overexpression or *SML1* deletion, two conditions that increase the dNTP pools of the cell, including the mitochondrial pool (19), induced a 4–8-fold reduction in the production of *petite* colonies of our recombinant mutant strains. However, neither *RNR1* overexpression nor *SML1* deletion decreased the frequency of Ery^R clones, which is an index of the propensity of mtDNA to accumulate point mutations. This result is similar to previous data (33) and indicates that induction of large-scale rearrangements, rather than increased point mutagenesis, is responsible for the *petite* mutability induced by the two *mip* mutations considered in our work. The human Y955C mutation displays a 45-fold reduction in affinity for the incoming nucleotide (25). Reduced affinity could determine a stalling on homopolymeric runs due to frequent reiteration of a single nucleotide. This could result in local depletion of that nucleotide and make it difficult for a defective polymerase to incorporate the subsequent nucleotide (34). By preventing pol γ stalling, an increase of the dNTP pool could decrease the generation of mtDNA rearrangements, and thereby reduce the number of *petite* clones. However, the increase of the dNTP pool could also induce the rescue of *petites* by improving the efficiency of mtDNA repair, especially in the presence of the D268A mutation, which is an error-prone mutation, being contained in the proofreading domain of pol γ A. The existence of mtDNA repair is supported by the recent demonstration that mitochondria share several repair systems with the nucleus, in both yeast (35) and humans (36).

MtDNA is attached to the mitochondrial inner membrane in close proximity to the respiratory chain. Mitochondrial respiration is a major source of ROS, which makes mtDNA vulnerable to oxidative damage (23). The latter effect can lead to the production of more ROS by impairing the electron transport chain (37), which can in turn determine further mtDNA damage (38,39).

To evaluate whether the mitochondrial mutability consequent to POLG mutations could result from ROS damage on mtDNA, we analysed the effect of a ROS scavenger, dihydrolipoic acid. Exposure to dihydrolipoic acid caused a 6-fold decrease in the *petite* mutability of the heterozygous *MIP1/mip1* diploid carrying the *mip1*^{Y757C} dominant allele and of the Δ *mip1* haploid strain carrying the *mip1*^{G224A} recessive allele. However, we could not establish whether the polymerase mutations increase the amount of ROS or whether they make the mtDNA more sensitive to ROS.

We have previously reported that the presence of ROS scavengers reduced significantly the consequences of a mutation equivalent to an arPEO mutation in the human ANT1 gene (11). Likewise, the data presented in this paper ushers in the development of a rational anti-ROS strategy for patients with pol γ A mutations.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and media

Yeast strains are listed in Table 3. YP medium contained 1% Bacto-yeast extract and 2% Bacto-peptone (Difco). Minimal medium (YNB) contained 7 g/l yeast nitrogen base without amino acids (Difco) supplemented with appropriate amino acids and bases for auxotrophy. Various carbon sources were added at the indicated concentrations. N1 medium contained 1%

peptone, 1% yeast extract, 2% ethanol in 50 mM phosphate buffer at pH 6.3, supplemented with 4 g/l erythromycin (SIGMA).

Construction of yeast strains carrying *mip1* mutations

Saccharomyces cerevisiae strain W303-1B (40) was used for the construction of a null Δ *mip1* mutant by one step gene disruption using KanMX expression cassette (41). *MIP1* ORF was completely deleted and substituted by the Kan^r marker, whose correct target of at *MIP1* locus was verified by PCR. Oligonucleotides used for *MIP1* disruption and verification are listed in Table 3. Δ *mip1* mutant strain (strain OF1), ρ^0 , was then crossed with the isogenic strain W303-1A (40), giving rise to the diploid DWM *MIP1*/ Δ *mip1* ρ^+ . This strain was transformed with wt *MIP1* or *mip1*^{Y757C} or *mip1*^{G224A} mutant alleles, cloned in the centromeric vector pFL38 or with the empty plasmid. Diploid clones obtained will be named: *MIP1*/ Δ *mip1*//*MIP1*, *MIP1*/ Δ *mip1*//*mip1*^{Y757C}, *MIP1*/ Δ *mip1*//*mip1*^{G224A}, *MIP1*/ Δ *mip1*//pFL38, respectively.

Absence of *MIP1* determines the complete and irreversible loss of mtDNA. For this reason, we maintained wt *MIP1* expressed by a plasmid during the construction of the haploid mutant strains and eliminated it by plasmid shuffling once the mutant allele was already into the cell. For the construction of haploid strains, DWM strain transformed with the pFL38*MIP1* plasmid was sporulated. By tetrad analysis the haploid spore DWM-5A, carrying the Δ *mip1* disruption and the pFL38*MIP1*, and therefore ρ^+ , was selected. This strain was the host for wt *MIP1* or *mip1*^{Y757C} or *mip1*^{G224A} mutant allele, cloned in the pFL39 centromeric vector. By plasmid shuffling in the presence of 5-fluoro orotic acid (5FOA, SIGMA), it was then possible to isolate DWM-5A strain devoid of pFL38*MIP1*. Haploid clones obtained will be named: Δ *mip1*//*MIP1*, Δ *mip1*//*mip1*^{Y757C}, Δ *mip1*//*mip1*^{G224A} respectively.

Strains carrying Δ *sml1* mutation were derived from strain YG855, kindly obtained from Rodney Rothstein. This strain was crossed with DWM-5A (Δ *mip1*) thus obtaining the diploid YO81 heterozygous at Δ *sml1* and Δ *mip1* loci. By sporulation and tetrad analysis of this strain, we selected the spores YO81-3A (Δ *sml1*) and YO81-4B (Δ *mip1* Δ *sml1*). These clones were then crossed to obtain the diploid DYY *MIP1*/ Δ *mip1* Δ *sml1*// Δ *sml1*, used as the host for wt *MIP1* or *mip1*^{Y757C} or *mip1*^{G224A} mutant alleles cloned in pFL38. For the construction of haploid strains, DYY diploid strain, transformed with the pFL38*MIP1* plasmid, was sporulated. By tetrad analysis, the haploid spore DYY-4C Δ *mip1* Δ *sml1* carrying pFL38*MIP1*, therefore being ρ^+ , was selected. This strain was transformed by *mip1*^{G224A} mutant allele, cloned in the centromeric vector pFL39. By plasmid shuffling in the presence of 5-fluoro orotic acid, it was then possible to isolate the DYY-4C strain (Δ *mip1* Δ *sml1*) carrying *mip1*^{G224A} allele and devoid of pFL38*MIP1*. The same has been done also with *MIP1* wt allele in order to obtain strains transformed with the same plasmid pFL39 and consequently carrying the same selectable marker, *TRP1*.

Construction of mutant alleles

The *mip1*^{G224A} and *mip1*^{Y757C} mutant alleles were produced by site-directed mutagenesis, using the QuikChange Kit (STRATAGENE). The template DNA was the wt *MIP1* cloned in

Table 3. List of yeast strains

Haploid strains	Genotype	Origin
W303-1B	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100</i>	Thomas and Rothstein (41)
W303-1A	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100</i>	Thomas and Rothstein (41)
OF1	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR</i>	<i>mip1::KanR</i> derived from W303-1B
DWM-5A	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR</i>	Sporulation of DWM diploid strain
YG855	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 sml1::HIS3 adh4::URA3</i>	Rodney Rothstein
YO81-4B	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR sml1::HIS3</i>	Sporulation of YO81 diploid strain
YO81-3A	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 sml1::HIS3</i>	Sporulation of YO81 diploid strain
YO81-5D	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 sml1::HIS3</i>	Sporulation of YO81 diploid strain
DYY-4C	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR sml1::HIS3</i>	Sporulation of DYY diploid strain
M9-94-4B	<i>Mata adelcox2</i>	Françoise Foury
M7-40-5B	<i>Mata adelcob</i>	Françoise Foury
M17-162-4D	<i>Mata adelcob</i>	Françoise Foury
M9-3-5B	<i>Mata adelcox3</i>	Françoise Foury
M9-94/A1	<i>Mata met cox2</i>	Françoise Foury
M9-3/A3	<i>Mata met cox3</i>	Françoise Foury
M7-40/A1	<i>Mata met cob</i>	Françoise Foury
M17-162	<i>Mata met cob</i>	Françoise Foury
Diploid strains	Genotype	Cross
DWW	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100/ Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100</i>	W303-1B × W303-1A
DWM	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100/ Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR</i>	W303-1A × OF1
Y081	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 sml1::HIS3 adh4::URA3/ Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR</i>	YG855 × OF1
DYY	<i>Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 sml1::HIS3/ Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR sml1::HIS3</i>	YO81-3A × YO81-4B

pUC19 vector. To obtain this construction, we PCR-amplified a DNA fragment of 5110 bp, containing the ORF and the 5' and 3' flanking regions (851 and 441 bp, respectively), using genomic DNA of strain W303-1B as template and the forward primer MIP1C (containing a *SacI* site at the 5' end) and the reverse primer MIP1E (containing a *SalI* site at the 5' end).

The list of base changes, and corresponding modified primers used to generate mutated vectors, is reported in Table 4. In order to maximize the expression of these variants, the preferred yeast codons (42) were used in the oligonucleotide sequences used for mutagenesis: GCT for Alanine and TGT for Cysteine. Mutagenized inserts for each different construct were sequence-verified on both strands. The sequences of the oligonucleotide primers used for cloning and sequencing *MIP1* are also listed in Table 3.

Plasmids

MIP1 gene and mutant alleles were cloned in both the centromeric vectors pFL38 and pFL39 (43) at *SacI* and *SalI* sites. These vectors carry *URA3* and *TRP1* markers, respectively. *RNR1* gene, cloned in the multicopy vector pRS425 (plasmid pWJ841), was kindly obtained from Rodney Rothstein.

Mitochondrial DNA mutation frequency

Analysis of petite frequencies. Diploid and haploid strains transformed with wt or mutated *mip1* alleles were pregrown

overnight in YNB medium supplemented with 2% ethanol and then inoculated in the same medium supplemented with 2% glucose. After 15 generations of growth at 36°C, cells were plated on YNB agar plates supplemented with 2% ethanol and 0.25% glucose at a dilution that gave approximately 200 cells/plate. *Petite* frequencies were defined as the percentage of colonies showing the *petite* phenotype after a 5 day incubation at 28°C.

To test the effect of dihydrolipoic acid, cells were grown in YNB medium supplemented with 2% glucose in the presence or in the absence of 30 µM dihydrolipoic acid (SIGMA) for 15 generations at 28°C. These experiments were performed at 28°C because lipoic acid at 37°C determined high level of cells lethality.

Evaluation of the nature of *petite* clones

In order to evaluate the nature of the *petite* mutants produced by pathologic mutations, *petite* clones were crossed with *mit*⁻ strains harbouring point mutations in genes encoding respiratory proteins. The four *mit*⁻ mutations used for this analysis map in the first and in the sixth exons of *cob* gene, in the *cox2* gene and in the *cox3* gene, respectively. This choice was based on the observation that in the *petite* ρ⁻ mutants, the fragments that are most frequently retained encompass cytochrome *b*, *cox2* and *cox3* genes (44,45). The *petite* clones unable to complement any of the *mit*⁻ mutants could be either ρ⁰ (no mtDNA) or ρ⁻ carrying rearranged mtDNA

Table 4. List of oligonucleotides used

Amino acid change	Oligonucleotides used for site directed mutagenesis ^a
Y783C	Fw:GGTAGAATTTGTGGCGCTGGTGCTAAATTTGCGAGTCAGTTAC Rv:GTAAGTACTGCTCGAAATTTAGCACCAGCGCCACAAATTCTACC
G250A	Fw:GAATAAAGAGCAAGTAATAATTGCTCACAATGTTGCGTATGATAG Rv: TATCATACGCAACATTGTGAGCAATTATTACTTGCTCTTTATTC
	Oligonucleotides used for cloning and sequencing <i>MIP1</i> ^a
MIP1C	GGGGGAGCTCCAATCTGATGGCGGGCAATGC
MIP1E	GGCGCGTCGACCTGGAATCATGTGGAGCAGCAG
MIPF	CGT GGC CTG TTC TGT GCC TC
MIPG	GGG CGT TTC AAT TCT GAA CC
MIPH	CGG CCA CAA GCC AAG TGT TTG
MIPI	CGA AGG TAC AGA TTT GCA C
MIPL	CAG TTA GAG ATG GGT TAA ACC
MIPM	GGG AAC ACT GCA GAG TAC AGC C
MIPN	CGA CCC TTG GTT AAA TGT GTC
	Oligonucleotides used for the disruption of <i>MIP1</i> ^a
S ₁ MIP	GCC GCC ACT ACA AGG CG GTC GCT AGA TGA GCA TTT CCA GAA GCG TAC GCT GCA GGT CGA C
S ₂ MIP	CTC CTG TTC TCC AGC AAT TGC TTT TCT GGG ATT GCT GAA TCG ATC GAT GAA TTC GAG CTC G
K ₂	GAA AGA AGA ACC TCA GTG GC
K ₃	CTG CCT CGG TGA GTT TTC TCC

molecules which lack the three mutant genes. To distinguish between these two possibilities, we evaluated the presence/absence of mtDNA in a set of these clones by Southern analysis. Mitochondrial DNA was extracted by rapid mitochondrial preparation (46) from clones unable to complement any of the *mit*⁻, grown in YNB supplemented with 2% glucose. Aliquots of 1 µg of DNA were digested with *EcoRV* (Amersham). Southern-blot analysis was carried out as previously described (47). mtDNAs extracted from three ρ^+ , three ρ^- and from three ρ^0 independent strains were also hybridized as a control. Hybridization was performed by standard methods, with a 5'-[γ -³²P]ATP end-labelled yeast mtDNA-specific sequence repeat (5'-CTCCTTTCGGGGTTCGGCTCCCCG TGGCCGGGCCCCGG-3') as a probe. Among the 25 putative ρ^0 clones that were analysed with this method, no mtDNA was observed in all but two clones, in which the mtDNA was likely not to encompass any of the *mit*⁻ mutations (Fig. 3). These results indicate that the absence of *mit*⁻ complementation is a good indicator of a ρ^0 condition.

Erythromycin resistance assays

Fifteen independent colonies from each strain were inoculated in separate 10 ml cultures of YNB + glucose and allowed to reach the stationary phase. After 24 h, a small sample was removed to determine the total number of respiration-competent cells by plating onto YP supplemented with 2% ethanol. The remainder of each culture was plated onto solid N1 medium containing 4 mg/ml erythromycin (SIGMA) and grown at 28°C for 8 days until drug-resistant colonies formed. The experiment was carried out in duplicate. The mutation frequency was calculated as number of Ery^R colonies/total number of colonies.

Miscellaneous

Transformation of yeast strain was obtained by the lithium chloride method (48). Restriction enzyme digestions, *E. coli* transformation and plasmid extractions were performed using standard methods (47). Cytochrome spectra and respiration were determined as described previously (10).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Luigi Palmieri for suggestions in the experimental design and procedure. We thank Françoise Foury for critical discussion; Antonietta Cirasolo and Roberto Silva for their skilful technical assistance; Rodney Rothstein for the generous gift of strain YG855 and plasmid pWJ841. This work was funded by grants from Fondazione Telethon-Italy no. GGP030039, Fondazione Pierfranco and Luisa Mariani, and the European Community's sixth Framework Programme for Research (EUMITOCOMBAT consortium, contract no. LSHM-CT-2004-503116).

Conflict of Interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J.J. and Van Broeckhoven, C. (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat. Genet.*, **28**, 211–212.
2. Tzoulis, C., Engelsens, B.A., Telstad, W., Aasly, J., Zeviani, M., Winterthun, S., Ferrari, G., Aarseth, J.H. and Bindoff, L.A. (2006) The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study of 26 cases. *Brain*, **129**, 1685–1692.
3. Zeviani, M., Bonilla, E., De Vivo, D.C. and Di Mauro, S. (1989) Mitochondrial diseases. *Neurol. Clin.*, **7**, 123–156.
4. Zeviani, M., Bresolin, N., Gellera, C., Bordoni, A., Pannacci, M., Amati, P., Moggio, M., Seroidei, S., Scarlato, G. and DiDonato, S. (1990)

- Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: a new autosomal dominant disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **47**, 904–914.
5. Horvath, R., Hudson, G., Ferrari, G., Futterer, N., Ahola, S., Lamantea, E., Prokisch, H., Lochmuller, H., McFarland, R., Rameshm, V. *et al.* (2006) Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase {gamma} gene. *Brain*, **129**, 1674–1684.
 6. Kaukonen, J., Zeviani, M., Comi, G.P., Piscaglia, M.G., Peltonen, L. and Suomalainen, A. (1999) A third locus predisposing to multiple deletions of mtDNA in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, 256–261.
 7. Kaukonen, J., Juselius, J.K., Tiranti, V., Kytälä, A., Zeviani, M., Comi, G.P., Keränen, S., Peltonen, L. and Suomalainen, A. (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*, **289**, 782–785.
 8. Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L. *et al.* (2001) 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**, 223–231.
 9. Lawson, J.E. and Douglas, M.G. (1988) Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14812–14818.
 10. Foury, F. (1989) Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20552–20560.
 11. Fontanesi, F., Palmieri, L., Scarcia, P., Lodi, T., Donnini, C., Limongelli, A., Tiranti, V., Zeviani, M., Ferrero, I. and Viola, A.M. (2004) Mutations in *AAC2*, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 923–934.
 12. Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E. *et al.* (2005) Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocators associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 3079–3088.
 13. Stuart, G.R., Santos, J.H., Strand, M.K., Van Houten, B. and Copeland, W.C. (2006) Mitochondrial and nuclear DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in DNA polymerase γ associated with progressive external ophthalmoplegia. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 363–374.
 14. Longley, M.J., Ropp, P.A., Lim, S.E. and Copeland, W.C. (1998) Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase γ : identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity. *Biochemistry*, **37**, 10529–10539.
 15. Grawiec, M.A., Longley, M.J. and Copeland, W.C. (2006) DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev.*, **106**, 383–405.
 16. Di Fonzo, A., Bordon, A., Crimi, M., Galbiati, S., Del Bo, R., Bresolin, N. and Comi, G.P. (2003) *POLG* mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions. *Hum. Mutat.*, **22**, 498–499.
 17. Elledge, S.J. and Davis, R.W. (1987) Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2783–2793.
 18. Wang, P.J., Chabes, A., Casagrande, R., Tian, X.C., Thelander, L. and Huffaker, T.C. (1997) Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6114–6121.
 19. Zhao, X., Muller, E.G. and Rothstein, R. (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell*, **2**, 329–340.
 20. Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L. and Rothstein, R. (2001) The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.*, **20**, 3544–3553.
 21. Dujon, B. (1981) Mitochondrial genetics and functions. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 505–635.
 22. Chi, N.W. and Kolodner, R.D. (1994) Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. *J. Biol. Chem.*, **269**, 29984–29992.
 23. Elledge, S.J. and Davis, R.W. (1990) Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.*, **4**, 740–751.
 24. Wei, Y.H. and Lee, H.C. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.*, **227**, 671–682.
 25. Wallace, D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 359–407.
 26. Ponamarev, M.V., Longley, M.J., Bienstock, R.J., Zeviani, M. and Copeland, W.C. (2002) Active site mutation in DNA polymerase γ associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15225–15228.
 27. Grawiec, M.A., Longley, M.J., Bienstock, R.J., Zeviani, M. and Copeland, W.C. (2004) Structure–function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 770–776.
 28. Del Bo, R., Bordon, A., Sciacco, M., Di Fonzo, A., Galbiati, S., Crimi, M., Bresolin, N. and Comi, G.P. (2003) Remarkable infidelity of polymerase γ A associated with mutations in *POLG1* exonuclease domain. *Neurology*, **61**, 903–908.
 29. Saada, A. (2004) Deoxyribonucleotides and disorders of mitochondrial DNA integrity. *DNA Cell Biol.*, **23**, 797–806.
 30. O'Rourke, T.W., Doudican, N.A., Zhang, H., Eaton, J.S., Doetsch, P.W. and Shadel, J.S. (2005) Differential involvement of the related DNA helicases Pif1p and Rrm3p in mtDNA point mutagenesis and stability. *Gene*, **354**, 86–92.
 31. Huang, M. and Elledge, S.J. (1997) Identification of *RNR4*, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6105–6113.
 32. Zhao, X. and Rothstein, R. (2002) The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3746–3751.
 33. Lecrenier, N. and Foury, F. (1995) Overexpression of the *RNR1* gene rescues *Saccharomyces cerevisiae* mutants in the mitochondrial DNA polymerase encoding MIP1 gene. *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 1–7.
 34. Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R. and Thelander, L. (2003) Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell*, **112**, 391–401.
 35. Wanrooij, S., Luoma, P., Van Goethem, G., van Broeckhoven, C., Suomalainen, A. and Spelbrink, J.N. (2004) Twinkle and *POLG* defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3053–3064.
 36. Boiteux, S. and Guillet, M. (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1–12.
 37. Foury, F., Hu, J. and Vanderstraeten, S. (2004) Mitochondrial DNA mutators. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 2799–2811.
 38. Mandavilli, B.S., Santos, J.H. and Van Houten, B. (2002) Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat. Res.*, **509**, 127–151.
 39. McKenzie, M., Liolitsa, D. and Hanna, M.G. (2004) Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem. Res.*, **29**, 589–600.
 40. Doudican, N.A., Song, B., Shadel, G.S. and Doetsch, P.W. (2005) Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 5196–5204.
 41. Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619–630.
 42. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793–1808.
 43. Benetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982) Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3026–3031.
 44. Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G.Y., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L. and Lacroute, F. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/E. coli shuttle vectors. *Yeast*, **7**, 609–615.
 45. Fukuhara, H. and Wesolowski, M. (1977) Preferential loss of a specific region of mitochondrial DNA by rho⁻ mutation. In Bandlow, W. (ed.),

- Mitochondria 1977: Genetics and biogenesis of mitochondria*, De Gruyter, Berlin, pp. 123–131.
46. Mathews, S., Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F. (1977) Preferential loss or retention of mitochondrial genes in ρ^- clones. In Bandlow, W. (ed.), *Mitochondria 1977: Genetics and biogenesis of mitochondria*, De Gruyter, Berlin, pp. 133–139.
47. Defontaine, A., Lecocq, F.M. and Hallet, J.N. (1991) A rapid miniprep method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 185.
48. Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Allegato 2:

Baruffini E., Ferrero I. and Foury F. (2007). Mitochondrial DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* caused by functional interactions between DNA polymerase gamma mutations associated with disease in human. *Biochim Biophys Acta*. **1772**, 1225-1235.

Mitochondrial DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* caused by functional interactions between DNA polymerase gamma mutations associated with disease in human

Enrico Baruffini^{a,b}, Iliana Ferrero^a, Françoise Foury^{b,*}

^a Department of Genetics, Biology of Microorganisms, Anthropology, Evolution, University of Parma, 43100 Parma, Italy

^b Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

Received 27 August 2007; received in revised form 1 October 2007; accepted 2 October 2007

Available online 14 October 2007

Abstract

The yeast mitochondrial DNA (mtDNA) replicase Mip1 has been used as a model to generate five mutations equivalent to *POLG* mutations associated with a broad spectrum of diseases in human. All *mip1* mutations, alone or in combination in *cis* or in *trans*, increase mtDNA instability as measured by *petite* frequency and Ery^R mutant accumulation. This phenotype is associated with decreased Mip1 levels in mitochondrial extracts and/or decreased polymerase activity. We have demonstrated that (1) in the *mip1*^{G651S} (hG848S) mutant the high mtDNA instability and increased frequency of point Ery^R mutations is associated with low Mip1 levels and polymerase activity; (2) in the *mip1*^{A692T-E900G} (hA889T–hE1143G) mutant, A692T is the major contributor to mtDNA instability by decreasing polymerase activity, and E900G acts synergistically by decreasing Mip1 levels; (3) in the *mip1*^{H734Y/mip1}^{G807R} (hH932Y/hG1051R) mutant, H734Y is the most deleterious mutation and acts synergistically with G807R as a result of its dominant character; (4) the *mip1*^{E900G} (hI143G) mutation is not neutral but results in a temperature-sensitive phenotype associated with decreased Mip1 levels, a property explaining its synergistic effect with mutations impairing the polymerase activity. Thus, the human E1143G mutation is not a true polymorphism.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *POLG*; Mutation; Disease; Yeast; *mip1* mutant; mtDNA

1. Introduction

The mitochondrial genome is replicated by a specific DNA polymerase called DNA polymerase gamma (pol g) [1]. The catalytic subunit of pol g is phylogenetically related to the prokaryotic PolA family and its amino acid sequence has been well conserved during evolution from yeast to human. The N-terminal part of the protein contains two domains endowed with dRP-lyase and 3′–5′ exonuclease proofreading activities, respectively, and is separated from the C-terminal polymerase domain by a linker region whose length and complexity have increased from yeast to human. While yeast pol g contains a single catalytic polypeptide of ~140 kDa encoded by the *MIP1* gene [2], human pol g is a heterotrimer [3] formed by the

140 kDa catalytic subunit encoded by the *POLG* gene and two identical 55 kDa accessory subunits which increase the activity and processivity of the enzyme.

The first *POLG* mutations associated with an autosomal dominant form of progressive external ophtalmoplegia (adPEO) were reported in 2001 [4]. Six years later more than 80 exonic mutations have been identified. (Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database at <http://dir-apps.niehs.nih.gov/polg>). They are associated with a broad spectrum of mitochondrial disorders [5,6] including PEO, myopathy, Parkinsonism, premature menopause, psychological disorders, ataxia, encephalopathy, and the fatal Alpers syndrome. The affected tissues are characterized by multiple deletions or depletion of mtDNA. *POLG* mutations are often pathogenic as compound heterozygous. However, the mechanisms underlying symptom variability are not understood. Moreover, as several *POLG* mutations are often simultaneously present in the patients, it is difficult to

* Corresponding author. Tel.: +32 010474691; fax: +32 010473872.

E-mail address: foury@fysa.ucl.ac.be (F. Foury).

distinguish between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and pathogenic mutations. For instance, the E1143G substitution identified in 2–3% of the Northern population and met in healthy homozygous individuals has been considered as a SNP. However, it is also very often associated with pathogenic mutations in *cis* or in *trans* [7–11].

The *MIP1* gene has previously been used in *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study pathogenic *POLG* mutations [12,13]. Moreover, *S. cerevisiae* appears as an appropriate organism to search for genes and mechanisms rescuing the defects generated by deleterious *POLG* mutations [13,14]. In the present study five human *POLG* mutations mapping to the polymerase domain and associated with a large range of clinical symptoms, from mild PEO to severe neurological manifestations and Alpers syndrome, were introduced at the homologous positions in the *MIP1* gene, and compound heterozygous yeast strains as found in human patients were constructed. The effects of the *mip1* mutations on mtDNA stability and point mtDNA mutation rate, dominance/recessivity of the phenotypes and DNA polymerase activity were analysed. We found a good correlation between mtDNA maintenance in yeast and disease severity in humans.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and media

The *S. cerevisiae* strains used in this work are W303-1B (*Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100*), DWM-5A (*Mata ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 mip1::KanR*) and DWM-1A, its isogenic *Mata* counterpart. DWM-1A and DWM-5A are meiotic segregants derived from W303 [13].

The diploid DMM was obtained by crossing DWM-5A which harbours plasmid pFL38MIP1 (see below) and is *rho*⁺ with DWM-1A which harbours plasmid pFL39 (see below) and is *rho*⁰. A diploid that has lost pFL39 and retained pFL38MIP1 was then selected.

YP medium contained 1% Bacto-yeast extract and 2% Bacto-peptone (Difco). YPA medium was YP medium supplemented with 40 mg/l adenine. Synthetic defined (SD) medium contained 6.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids (Difco) supplemented with appropriate amino acids and bases. Synthetic complete (SC) medium contained 6.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and supplemented with 1 g/l of drop-out powder [15] containing all amino acids except those required for plasmid maintenance. Carbon substrates were added at the indicated concentration. YPAEG-ery contained 1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone (Difco), 40 mg/l adenine, 3% ethanol, 3% glycerol, 3 g/l erythromycin (SIGMA) and 25 mM potassium phosphate buffer at pH 6.5.

2.2. Construction of yeast *mip1* strains

The *mip1* mutations were obtained by site-directed mutagenesis of a *MIP1* gene fragment, using the overlap extension technique [16] and after appropriate restrictions the *MIP1* and *mip1* alleles were subcloned in the *SacI* and *SalI* sites of the centromeric pFL38 (*URA3* marker) or pFL39 (*TRP1* marker) plasmids [17]. The pFL39 plasmid-borne *MIP1* and *mip1* genes were transformed in the DWM-5A strain deleted for the *MIP1* gene and harbouring the pFL38 plasmid-borne *MIP1* gene to allow mtDNA maintenance. The plasmids were named pFL39MIP1 (or *mip1* followed by the name of the mutation) and pFL38MIP1 (or *mip1*). In a second step, the pFL39-borne *MIP1* or *mip1* alleles were selected through plasmid shuffling using 5-fluoroorotic acid as previously described [13]. Heteroallelic haploid strains were obtained by transformation of the pFL39MIP1 or pFL39*mip1* plasmid-bearing strains with pFL38-based plasmids.

The pGAL*mip1* plasmids containing the desired mutation were constructed by replacing the *NotI*–*NgoMIV* fragment of the wild-type *MIP1* gene borne by the pGALMIP1 plasmid [18] with the corresponding mutated fragment. Strain W303-1B was transformed with pGALZ3 (the empty plasmid), wild-type pGALMIP1 and pGAL*mip1* mutant plasmids. The presence of the *mip1* mutation was verified by DNA sequencing.

2.3. Nomenclature

DWM-5A strains harbouring *mip1* mutations were named as follows. The *mip1* symbol was followed by the residue number preceded by the one-letter-code symbol of the wild-type amino acid followed by the symbol of the mutant residue. Thus *mip1*^{G651S} means *mip1* mutant harbouring a mutation from glycine to serine at position 651 of the amino acid sequence. Heteroallelic strains harbouring pFL38 plasmid-borne *MIP1* and pFL39 plasmid-borne *MIP1* (or *mip1*) alleles, or empty pFL39 plasmid were designated as *MIP1*(or *mip1*)/*MIP1*, or *MIP1*/pFL39 strains. Strain *mip1*^{H734Y/mip1}^{G807R} was obtained by transforming the DWM-5A strain harbouring the pFL39 plasmid-borne G807 mutation with the pFL38 plasmid bearing the H734Y mutation. Strain *mip1*^{G651S/mip1}^{E900G} was obtained by the same procedure.

2.4. Determination of petite frequency and mtDNA retention

Strains containing *MIP1* or *mip1* alleles were grown on solid SC medium supplemented with 2% ethanol at 28 °C to counterselect the *petite* cells that could be present in the population. After approximately 60 h, strains were replica-plated on SC medium supplemented with 2% glucose and grown at 28 °C or 36 °C. After 24 h, strains were replica-plated on SC medium supplemented with 2% glucose and grown at 28 °C or 36 °C. After 24 h cells were diluted in water and plated on SC agar plates supplemented with 2% ethanol and 0.3% glucose at a dilution giving approximately 200 cells per plate. *Petite* frequency was defined as the percentage of colonies showing the *petite* phenotype after a 5 day-incubation at 28 °C. For each strain at least 4000 clones were analysed. When 100% *petites* were obtained, 10⁴ and 10⁵ cells were directly plated on YP plates supplemented with 3% glycerol to confirm that the cell population was only composed of *petites* and did not grow on glycerol.

To determine whether *petites* had retained mtDNA fragments, the clones in the DWM-5A background were crossed with *mit*[−] mutants, M9-94-4B (*Mata ade1 cox2*), M7-40-5B (*Mata ade1 cob*), M17-162-4B (*Mata ade1 cob*) and M9-3-5B (*Mata ade1 cox3*) [19] as previously described [13]. *Mit*[−] mutations are mtDNA point mutations conferring respiratory deficiency and loss of growth on a respiratory carbon source [20]. Briefly, for each haploid *mip1* mutant, at least 200 independent *petite* clones were crossed with the *mit*[−] mutants of opposite mating type on YP plates supplemented with 2% glucose and replica-plated on YP plates supplemented with 3% glycerol to select *rho*⁺ diploid strains. For the *mip1*^{G651S} mutant, 200 independent clones were crossed with *mit*[−] mutants immediately after isolation of the mutant strain.

2.5. Frequency of erythromycin resistant (*Ery*^R) mutants

Two independent series of 10 independent colonies grown on YP plates supplemented with 3% glycerol were inoculated in 2.5 ml cultures of YPA supplemented with 3% glycerol. After 48 h at 28 °C, 1.5 ml of each culture, corresponding to 6–8 × 10⁷ cells, were plated on YPAEG-ery medium and incubated at 28 °C for 9 days. A small aliquot of each culture was spread for single colonies on YP plates supplemented with 3% glycerol to determine the number of *rho*⁺ cells initially present in the cultures. The mutation frequency was calculated as the number of *Ery*^R colonies per 10⁸ *rho*⁺ cells. For heteroallelic strains containing both pFL39- and pFL38-derived plasmids, the same test was carried out, except that colonies were grown on SD plates supplemented with 2% glucose and then inoculated in 2.5-ml cultures of SC medium supplemented with 2% ethanol to avoid loss of one plasmid.

2.6. Southern hybridisation

Cells pre-grown on SC medium supplemented with 2% ethanol (except for mutant *mip1*^{G651S} which was supplemented with 2% glucose) were inoculated

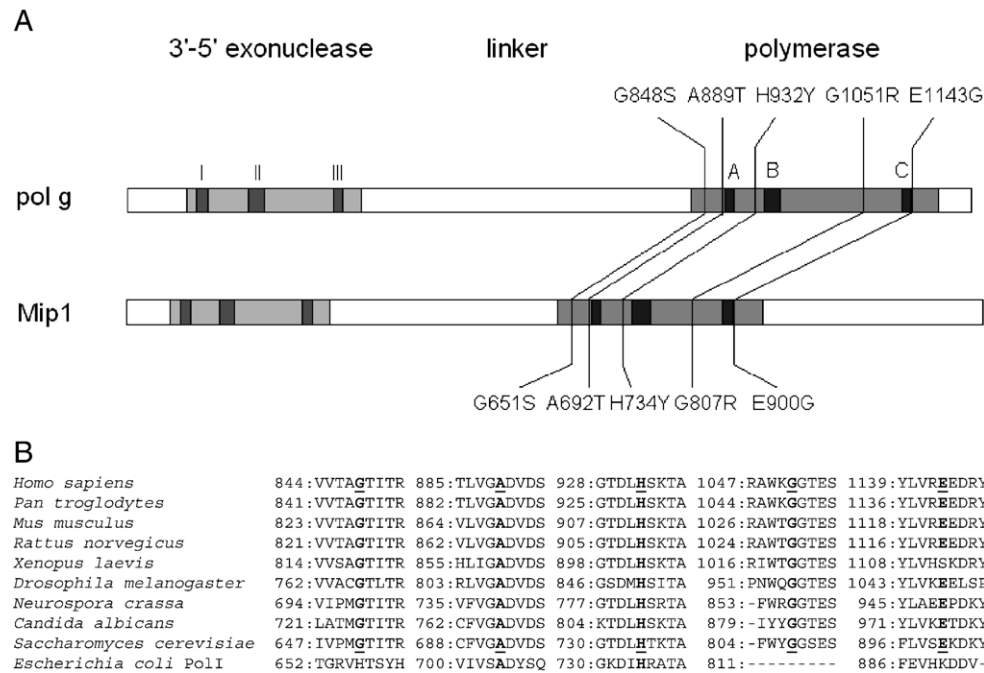


Fig. 1. Position and conservation of mutated amino acids associated with mitochondrial diseases in several DNA polymerases gamma and *E. coli* DNA polymerase I. A. Linear representation of human pol g and Mip1 polymerases. I, II and III refer to the ExoI, ExoII, and ExoIII conserved motifs of the 3'-5' exonuclease domain, and A, B and C refer to the polA, polB and polC conserved motifs of the polymerase domain. B. Multiple amino acid alignment of regions encompassing the mutated residues. Numbers refer to the position of the residues in the amino acid sequence. Mutated residues are in bold characters and underlined in *H. sapiens* and *S. cerevisiae*. Alignment of DNA was carried out by using CLUSTAL W program [37].

in 10 ml of SC medium supplemented with 2% glucose and grown overnight. Total DNA was extracted by standard procedures, digested with *Eco*RI, and subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel. The *TRP1* alleles harboured by the pFL39MIP1 plasmid and the genome are contained within DNA fragments of 4.8 and 1.45 kb, respectively. Hybridisation was performed by standard procedures with the *TRP1* gene as a probe using [α - 32 P]dCTP and the kit 'Rediprime II DNA Labeling System' (GE Healthcare). The *TRP1* probe was obtained by *Bgl*II digestion of the pFL39 plasmid. The signals were quantified after a 15-min exposure with a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

2.7. DNA polymerase assay

Mitochondrial extracts were obtained from strain W303-1B overexpressing the *MIP1* (*mip1*) alleles under the control of the *GAL1* promoter in a 2% galactose-containing SC medium for 15 h at 30 °C as previously reported [18]. The W303-1B strain harbouring the empty *GALZ3* plasmid was taken as the negative control. The gap-filling activity assay was carried out in a reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM dithiothreitol, 50 mM

MgCl₂, 25 μ M each dATP, dCTP, dGTP, 6 μ M [3 H]-dTTP, 150 μ g/ml calf thymus activated DNA and the mitochondrial extract. Samples were taken after 6 min of incubation at 30 °C. The activity was expressed in nmol dTTP incorporated into trichloroacetic precipitable material per h and per mg protein present in the extract or was reported to an arbitrary amount of Mip1 (100 for the wild-type).

3. Results

3.1. Choice of POLG mutations and construction of mip1 mutants

Positions of the mutations studied in this work are shown in Fig. 1A.

The recessive **G848S** mutation which affects a conserved glycine residue upstream of motif polA (Fig. 1B) in the

Table 1
Relevant pathologies, human *POLG* mutations and yeast *mip1* equivalents studied in this work

Human <i>POLG</i> mutations		Equivalent <i>mip1</i> mutations		Pathology
Allele 1 ^a	Allele 2 ^a	Allele 1	Allele 2	
G848S	T251I–P587L	G651S	NC ^b	PEO [25,26]
G848S	A467T	G651S	NC	Alpers [9,21,23,24]
G848S	W748S–E1143G	G651S	NC-E900G	Alpers [22,23]
A889T–E1143G	Wt ^c	A692T–E900G	Wt	Tremor or adPEO/neuropathy [8]
A889T	R579W	A692T	NC	PEO/neuropathy [27]
H932Y	G1051R	H734Y	G807R	PEO/neuropathy [28]

^a Alleles 1 and 2 are borne in *trans* by different chromosomes.

^b NC, not conserved.

^c Wt, wild-type.

polymerase domain is involved in diseases of variable severity, from PEO to the Alpers syndrome, according to the associated mutations in *trans* [9,21–26] (Table 1). The **A889T** mutation affects a conserved residue immediately upstream of motif polA (Fig. 1B). This mutation associated in *cis* with the SNP **E1143G** (Fig. 1B) has been reported as dominant in two brothers with PEO and severe neurological manifestations [8] (Table 1). Their mother and two grand-uncles, obligate mutation carriers, showed only tremors, suggesting that genetic or environmental factors modulate the severity of the phenotype. The A889T mutation has also been reported to be associated in *trans* with the R579W mutation in a brother and a sister with PEO, sensory ataxia, areflexia, and gastrointestinal dysmotility [27]. Since in this case parents were healthy A889T seems, when alone, to be a recessive mutation. However, since one *POLG* mutation in different families and individuals may cause different kinds of disorders it cannot be excluded that A889T alone is dominant. Nevertheless, the most likely hypothesis is that E1143G modifies the pathogenic effect of A889T.

The **H932Y** mutation affects a strictly conserved residue slightly upstream of motif polB (Fig. 1B). The **G1051R** mutation affects a residue located between motifs polB and polC within a region poorly conserved in prokaryotic DNA polymerases (Fig. 1B). H932Y/G1051R compound heterozygous patients developed a complex syndrome including PEO, polyneuropathy, ataxia, hearing loss and psychiatric disorders [28] (Table 1).

The equivalent *mip1* mutations G651S (hG848S), A692T (hA889T), H734Y (hH932Y), G807R (hG1051R) and E900G (hE1143G) obtained by site-directed mutagenesis (Fig. 1A) were introduced in the *MIP1* gene borne by a low copy centromeric vector and the *mip1* alleles were cloned in a yeast strain whose chromosomal *MIP1* gene was deleted. The *MIP1* allele used in this work is found in several commonly used laboratory strains including the S288c reference strain and W303. It contains an alanine at position 661. However, T661 is a strictly conserved residue from fungi to human, and all natural *S. cerevisiae* strains contain a threonine at this position. We have recently shown that the T661A substitution is a mutation increasing mtDNA instability in a temperature-dependent manner [29]. Here, the choice of the A661 context is based on two previous reports on the effect of pathogenic *POLG* mutations which were using the Ala661-containing *MIP1* gene as a model [12,13]. In the last section we present a comparison of the mutant phenotypes obtained in the A661 and T661 contexts.

Southern blotting experiments were performed to estimate the average copy number of pFL39 plasmid-borne *MIP1* (*mip1*) gene. Even though it was not excluded that mutants *mip1*^{G651S} and *mip1*^{H734Y} contained on average slightly more than one copy per cell, chromosomal and plasmid DNAs were grossly in stoichiometric amounts in all mutants (Fig. 2), indicating that the copy number of the *mip1* alleles was not influenced by their presence on a centromeric vector.

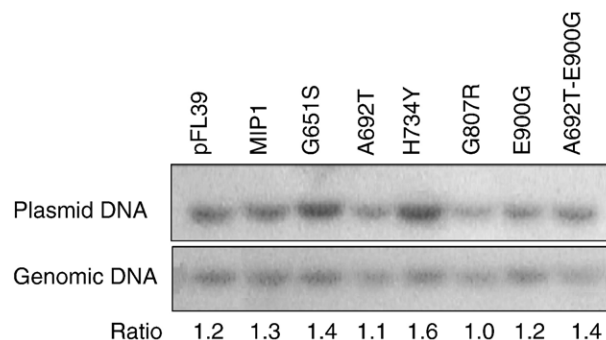


Fig. 2. Estimation of the copy number of pFL39-borne *MIP1* (*mip1*) genes in wild-type and mutants. The *MIP1* (*mip1*) genes were borne by the pFL39 plasmid. The standard deviation of the ratio of the plasmid to genomic DNA was in the range of 0.1–0.3. Southern blotting was performed as described in Materials and methods.

3.2. Effect of *mip1* mutations on oxidative growth phenotype

The analysis of cellular growth on an obligatory respiratory carbon source such as ethanol or glycerol is a simple method to test mitochondrial function. All mutants except *mip1*^{G651S} were able to grow on ethanol at 28 °C (Fig. 3A). Whereas mutants *mip1*^{G807R} and *mip1*^{E900G} were growing like the wild-type, cellular growth of mutants *mip1*^{A692T} and *mip1*^{H734Y}, and to a greater extent that of mutant *mip1*^{A692T-E900G}, was impaired. In all mutants the growth defect was more pronounced at 36 °C (Fig. 3B).

3.3. Effect of single *mip1* mutations on petite accumulation

The patients harbouring the mutations studied here present multiple deletions or depletion of mtDNA. While in human cells deleted and intact mtDNA molecules are coexisting, *S. cerevisiae* has the unique property to produce cells with homoplasmic deleted mtDNA molecules, which are referred to as *petites* or *rho*[−] mutants [30]. These mutants do not grow on respiratory carbon sources but they can grow on glucose thanks to the energy produced by fermentation. In all *mip1* mutants the frequency of *petites* was increased at 28 °C, being quite low in *mip1*^{E900G} (6%), moderate in *mip1*^{G807R} (25%) and high in *mip1*^{A692T} and *mip1*^{H734Y} (80 and 99%, respectively) (Table 2). In all strains *petite* frequency was increased at 36 °C. The temperature-sensitive trait was specially marked for the G807R and E900G mutations, which yielded 99% and 92% *petites*, respectively (Table 2). No *rho*⁺ colony was obtained for mutant *mip1*^{G651S}, suggesting that mtDNA maintenance was incompatible with the G651S mutation. *Petite* cells either contain amplified mtDNA fragments mapping to various positions of the mtDNA molecule, and are referred here to as *rho*[−], or are completely devoid of mtDNA and referred to as *rho*⁰. To distinguish between *rho*[−] and *rho*⁰ clones we used a genetic test based on the capacity of the mtDNA fragments

Fig. 3. Oxidative growth phenotype of wild-type, *mip1* and heteroallelic strains. Cell growth was tested on SC medium supplemented with 2% ethanol at 28 °C, and on YP medium supplemented with 2% ethanol at 36 °C (cells were unable to grow on ethanol supplemented SC medium at 36 °C). For each strain, 10⁵, 10⁴, 10³ and 10² cells were spotted. Pictures were taken after 4 days. A. *mip1* mutants at 28 °C. B. *mip1* mutants at 36 °C. C. Heteroallelic haploid strains at 28 °C.

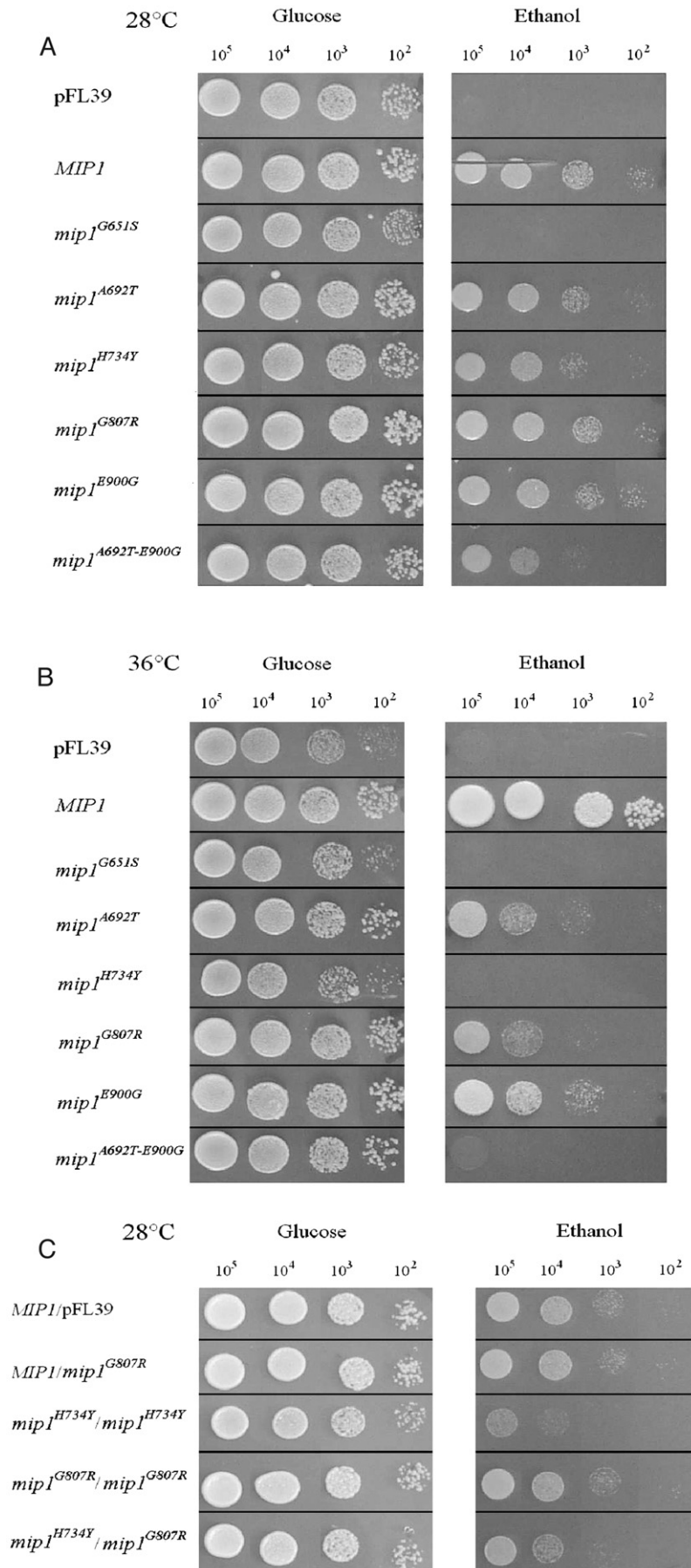


Table 2
Petite and Ery^R mutant frequency in *mip1* mutants

Haploid strain ^a	28 °C		36 °C		Ery ^R mutant frequency ^b	
	% petites ^c	% rho ⁰ ^d	% petites	% rho ⁰	Ery ^R (×10 ⁸)	Fold increase
<i>MIP1</i>	2.7±0.3	13	21.0±2.4	37	6.0±0.4	1.0
<i>mip1</i> ^{G651S}	100±0	100	–	–	ND ^e	–
<i>mip1</i> ^{A692T}	80.3±1.7	86	99.7±0.1	100	22.2±2.7	3.7
<i>mip1</i> ^{H734Y}	99.7±0.1	94	100±0	100	ND	–
<i>mip1</i> ^{G807R}	25.5±2.8	55	99.2±0.2	99	61.6±6.1	10.2
<i>mip1</i> ^{E900G}	6.0±0.6	33	91.7±3.9	88	11.6±1.3	1.9
<i>mip1</i> ^{A692T-E900G}	96.6±1.5	96	100±0	100	20.4±1.3	3.4

^a The DWM-5A strain contains the *MIP1* (or *mip1*) gene borne by the pFL39 plasmid.

^b The frequency of Ery^R mutants was calculated as the ratio of the number of Ery^R mutants to the number of rho⁺ cells plated on the Petri dish. The 'fold increase' was calculated by normalization of the wild-type *MIP1* strain relative frequency to 1.

^c In this work 'petites' designates both rho⁻ clones with mtDNA deletions and rho⁰ clones. For each *MIP1* (*mip1*) strain the data are averages obtained from three independent experiments and two independent transformants.

^d Although not formally demonstrated a *petite* mutant which does not restore any of the four *mit*-tester strains is referred to as rho⁰. Rho⁰ frequencies are calculated as the ratio of the number of rho⁰ to the number of *petite* cells.

^e ND, not determined.

retained by *petite* clones to rescue *mit*⁻ mutations by homologous recombination [31]. The *mit*⁻ mutations were selected in the *cox2*, *cox3* and *cob* genes, because these correspond to the most frequently retained loci in rho⁻ mutants [32]. Absence of restoration of these *mit*⁻ mutants to wild-type by a large number of *petite* clones provides good evidence that the *mip1* mutation leads to a total loss of mtDNA. Our data show that there was a good correlation between *petite* frequency and the loss of mtDNA (Table 2). In particular, they strongly suggest that the *mip1*^{G651S} mutant is not able to maintain a fragment of mtDNA, implying a severe defect in mtDNA replication.

3.4. Effect of single *mip1* mutations on Ery^R mutant frequency

The fidelity of mtDNA replication was estimated by the frequency of erythromycin (Ery^R) mutants. Ery^R mutations are caused by mutations in the mtDNA 21S rRNA gene (nucleotides 59965–59967 on the mtDNA map in SGD database <http://www.yeastgenome.org/>) [33]. All types of substitutions can be obtained. An increased frequency of Ery^R mutants was observed in all tested *mip1* mutants, but there was no relationship between Ery^R and *petite* mutant frequencies (Table 2).

3.5. Dominance/recessivity of *mip1* mutations

Dominance/recessivity of each *mip1* mutation was determined in diploids in which both chromosomal *MIP1* genes were deleted and replaced by a pFL38-borne wild-type *MIP1* gene and a pFL39-borne wild-type *MIP1* or mutant *mip1* gene (Table 3). A diploid strain containing two copies of the *MIP1*

gene produced less than 1% *petites* at 28 °C. When one *MIP1* copy was replaced by the empty plasmid (pFL39), the *petite* frequency was two-fold higher at 28 °C and further increased at 36 °C. *Petite* accumulation in the presence of a single copy of *MIP1* is a sign of haploinsufficiency suggesting that Mip1 is a limiting factor in mtDNA replication.

At 28 °C, the percentage of *petites* was similar in the *MIP1/mip1*^{E900G} and *MIP1/MIP1* strains, indicating that the *mip1*^{E900G} allele is functional. All other *MIP1/mip1* strains showed haploinsufficiency, to various extents, suggesting that the *mip1* alleles in diploids are poorly functional. In the *MIP1/mip1*^{H734Y} strain *petite* accumulation was significantly higher (7.4%) than in a strain bearing a single copy of wild-type *MIP1* (2.1%), indicating that the *mip1*^{H734Y} allele is dominant (Table 3). In all strains Ery^R mutant accumulation was recessive (data not shown).

3.6. Functional interactions of *mip1* mutations in *cis* or in *trans*

In order to simulate human situations, mutants carrying several mutations in *cis* or in *trans* were constructed both in diploid (Table 3) and haploid states (data not shown). In the latter context, the frequency of rho⁰ clones could be determined in crosses with *mit*⁻ mutants. The presence of the E900G mutation in *cis* with the A692T mutation exacerbated the mtDNA defects produced by the A692T mutation, but did not further increase the frequency of Ery^R mutants (Table 2). No difference was observed between the *MIP1/mip1*^{A692T} and *MIP1/mip1*^{A692T-E900G} diploid strains (Table 3), leading to the conclusion that the presence of the E900G mutation in *cis* does not result in a dominant phenotype, as suggested in human for the E1143G substitution associated in *cis* with the A889T mutation.

When two plasmid-borne *MIP1* (or *mip1*) genes were introduced into a haploid instead of a diploid strain, *petite* frequency was quite similar (compare *MIP1/MIP1*, *mip1/pFL39*, *MIP1/mip1*^{G807R}, *MIP1/mip1*^{H734Y} in Tables 3 and 4). Strains *mip1*^{H734Y}/*mip1*^{H734Y} and *mip1*^{G807R}/*mip1*^{G807R} produced 97.8% and 8.7% *petites*, respectively (Table 4). *Petite* accumulation in the heteroallelic haploid *mip1*^{H734Y}/*mip1*^{G807R} strain reached 70.7% (versus 83.9 in a diploid strain in Table 3),

Table 3
Petite mutant frequency in heteroallelic diploid strains

Diploid strains	% petites at 28 °C
<i>MIP1/MIP1</i>	0.8±0.1
<i>MIP1/pFL39</i>	2.1±0.1
<i>MIP1/mip1</i> ^{G651S}	1.8±0.2
<i>MIP1/mip1</i> ^{A692T}	2.6±0.1
<i>MIP1/mip1</i> ^{H734Y}	7.4±0.9
<i>MIP1/mip1</i> ^{G807R}	1.6±0.1
<i>MIP1/mip1</i> ^{E900G}	0.8±0.1
<i>MIP1/mip1</i> ^{A692T-E900G}	2.5±0.1
<i>mip1</i> ^{H734Y} / <i>mip1</i> ^{G807R}	83.9±2.7
<i>mip1</i> ^{G651S} / <i>mip1</i> ^{E900G}	6.9±0.5

The DWM-5A strain contains pFL38 and pFL39 plasmid-borne *MIP1* and *mip1* genes, respectively, as reported under Materials and methods. Experimental conditions were as described in Table 2.

Table 4
Synergistic effects of the G807R and H734Y mutations

Haploid heteroallelic strain	% <i>petites</i>	% <i>rho</i> ⁰	Ery ^R mutant frequency ($\times 10^8$)
<i>MIP1/MIP1</i>	1.0 $\pm$ 0.1	11	2.2 $\pm$ 0.4
<i>MIP1/pFL39</i>	2.7 $\pm$ 0.3	24	8.0 $\pm$ 0.8
<i>MIP1/mip1</i> ^{G807R}	1.7 $\pm$ 0.3	21	6.2 $\pm$ 0.5
<i>MIP1/mip1</i> ^{H734Y}	6.7 $\pm$ 0.7	22	3.5 $\pm$ 0.3
<i>mip1</i> ^{H734Y} / <i>mip1</i> ^{H734Y}	97.8 $\pm$ 0.2	91	ND
<i>mip1</i> ^{G807R} / <i>mip1</i> ^{G807R}	8.7 $\pm$ 1.8	29	48.6 $\pm$ 3.6
<i>mip1</i> ^{H734Y} / <i>mip1</i> ^{G807R}	70.7 $\pm$ 4.8	82	41.2 $\pm$ 4.4

The DWM-5A strain contains pFL38 and pFL39 plasmid-borne *MIP1* and *mip1* genes, respectively, as reported under Materials and methods. Experimental conditions were as described in Table 2. ND, not determined.

with a high frequency of cells devoid of mtDNA (Table 4), indicating that the mild G807R mutation was unable to compensate for the deleterious effects of the H734Y mutation. In agreement with these data the *mip1*^{H734Y}/*mip1*^{G807R} strain grew on ethanol-containing medium slightly better than the *mip1*^{H734Y}/*mip1*^{H734Y} strain but more slowly than the *MIP1/pFL39* and *MIP1/mip1*^{G807R} strains (Fig. 2C). The dominant trait of the H734Y mutation was thus confirmed, providing support to the view that the human equivalent H932Y is dominant. The frequency of Ery^R mutants was hardly decreased in the compound heterozygous strain compared to the *mip1*^{G807R}/*mip1*^{G807R} strain (Table 4), implying that the contribution of Mip1^{H734Y} polymerase to the fidelity of mtDNA replication was small.

In haploid or diploid *mip1*^{E900G}/*mip1*^{G651S} strains *petite* frequency reached 6–6.9%, a percentage higher than in the strain homozygous for the E900G mutation (~2%) and similar to that of a strain bearing a single copy of the E900G mutation,

supporting further the hypothesis that *mip1*^{G651S} behaves like a null allele.

3.7. Levels and gap-filling activity of wild-type and mutant Mip1p

POLG mutations in the polymerase domain can be ranged into two broad classes. a) Mutations altering protein conformation, as a result of an intrinsic folding defect or an alteration of protein interactions with the DNA substrate. b) Mutations impairing polymerase activity, and altering, or not, the protein structure.

Mip1 is naturally poorly expressed and gives a very faint signal in Western blots (Fig. 4A). Therefore, soluble mitochondrial extracts were prepared from cells overexpressing the *MIP1* gene from the strong inducible *GAL1* promoter. We first verified that *MIP1* gene expression was similar in all strains (data not shown). However, in all mutants, the amount of Mip1 in the mitochondrial extracts was lower than that in the wild-type (Fig. 4B and C, and Table 5), but to various extents. Whereas the amounts of Mip1^{A692T} were quite comparable to that of the wild-type, those of Mip1^{G651S}, Mip1^{G807R} and Mip1^{A692T-E900G} were very low (<10% of wild-type Mip1), and those of Mip1^{H734Y} and Mip1^{E900G} were substantially reduced (Fig. 4B and C and Table 5). By comparison, the extracts of a strain expressing the chromosomal *MIP1* gene contained 1.5–2% of the amount present in the overproducing wild-type strain (Table 5).

Gap-filling activity measures the capacity of incorporating nucleotides into short gaps of excess duplex DNA and is thus independent of the processivity of the enzyme. A decrease in this activity reflects mainly a defect in catalysis or a decrease in

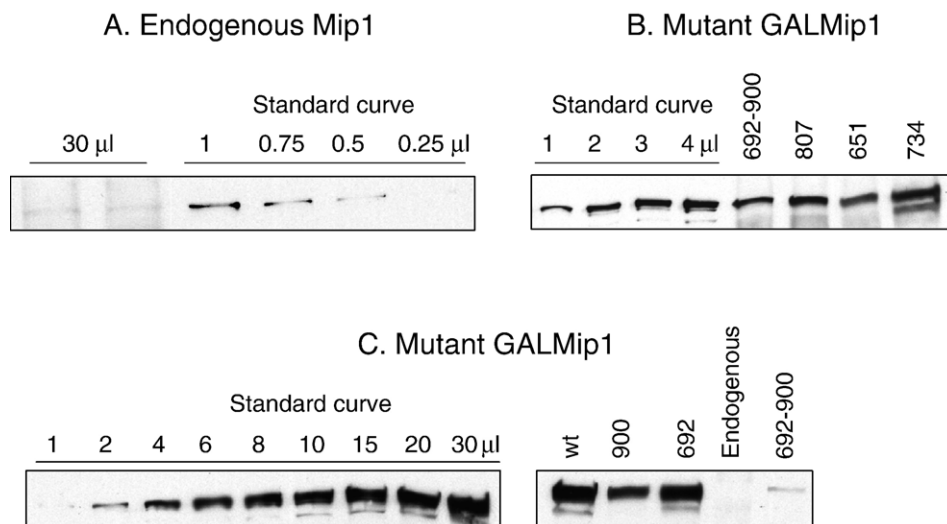


Fig. 4. Estimation of wild-type and mutant Mip1 levels in mitochondrial extracts. The extracts prepared as reported in Materials and methods were subjected to SDS-PAGE in a 7% polyacrylamide gel and Mip1 was detected by Western blotting using a polyclonal antibody raised against Mip1. For each strain, 30 µl of extract in the solubilisation buffer were loaded onto the gel and the intensity of the signal was compared to that obtained by increasing amounts of the standard wild-type Mip1 expressed under the control of the *GAL1* promoter. The wild-type mitochondrial extract contained 2 mg/ml protein. Western blots A, B and C were run independently. A. Mip1 was expressed from the chromosomal *MIP1* gene in cells containing the empty GALZ3 plasmid and its level was estimated by using a standard Mip1 curve from 0.25 to 1 µl of extract. B and C. The levels of Mip1^{A692T-E900G}, Mip1^{G807R}, Mip1^{G551S}, Mip1^{H734Y} and Mip1, Mip1^{E900G} and Mip1^{A692T} expressed under the control of the *GAL1* promoter were estimated by using a standard curve from 1 to 4 µl (B) or 1 to 30 µl (C).

K_m (dNTP). In all strains data were normalized to a same amount of Mip1 protein in the assay. Gap-filling activities of Mip1^{E900G} and Mip1^{G807R} were not modified (Mip1^{E900G}) or close (Mip1^{G807R}) to that of the wild-type (Table 5). Together with the observation that in these mutants Mip1 levels are decreased, these data suggest that the mtDNA replication defects of these mutants mainly result from limiting amounts of Mip1. In contrast, the activity of Mip1^{A692T} reached only 30% of that of the wild-type. Since Mip1^{A692T} levels were close to that of wild-type, it could be concluded that the mtDNA replication defects produced by the A692T mutation are mainly caused by an intrinsic defect in the polymerase activity of the enzyme. The gap-filling activity of Mip1^{A692T-E900G} was similar to that of Mip1^{A692T} (Table 5). Since the major effect of the E900G mutation in the presence of the A692T mutation was a dramatic decrease of Mip1 levels in the extracts (Fig. 4 and Table 5), the low mtDNA replication capacity of the *mip1*^{A692T-E900G} mutant was better explained by the cumulative effects of low polymerase activity caused by A692T and low protein levels caused by E900G. The Mip1^{G651S}, and to a lesser extent, Mip1^{H734Y} polymerases combined decreased gap-filling activity and lower expression.

3.8. Comparison of the *MIP1*^{T661} and *MIP1*^{A661} alleles

As mentioned earlier in this paper the T661A substitution present in the *MIP1* gene used in this work decreases mtDNA stability of ‘wild-type’ laboratory strains [29]. To determine the influence of the T661A substitution, the mutant phenotypes were compared in the A661 and T661 contexts (Tables 2 and 6). Although mutability and temperature sensitivity were remarkably more pronounced in the presence of A661, there was no fundamental discrepancy in the two genetic contexts. (1) G651S and H734Y strongly increased *petite* frequency; (2) E900G increased *petite* frequency approximately by two-fold; (3) A692T

Table 6

Petite and Ery^R mutant frequency in *mip1* mutants in the T661 context

Haploid strain	% <i>petites</i>		Ery ^R mutant frequency	
	28 °C	36 °C	Ery ^R ($\times 10^8$)	Fold increase
<i>MIP1</i>	0.8±0.1	1.0±0.1	2.4±0.4	1.0
<i>mip1</i> ^{G651S}	45.7±4.9	99.7±0.2	37.3±4.7	15.5
<i>mip1</i> ^{A692T}	17.1±1.6	40.1±0.3	3.2±0.2	1.3
<i>mip1</i> ^{H734Y}	97.8±0.4	98.8±0.3	ND	–
<i>mip1</i> ^{G807R}	2.1±0.2	9.5±0.8	7.9±0.8	3.3
<i>mip1</i> ^{E900G}	1.3±0.1	5.0±0.1	3.8±0.2	1.6
<i>mip1</i> ^{A692T-E900G}	35.5±2.0	78.1±3.2	3.3±0.2	1.4

All experimental conditions were the same as in Table 2 except that a threonine instead of an alanine is present at position 661 of the Mip1 amino acid sequence. ND, not determined.

and G807R increased *petite* frequency at an intermediate level; (4) E900G behaved as a phenotypic modifier of A692T in *cis*; (5) in all mutants the frequency of point Ery^R mutants was increased. (6) The dominant or recessive character of the mutations, and more specifically H734Y dominance, were not influenced by the A661 or T661 context (data not shown). However, the haploinsufficiency observed in the presence of a single *MIP1* copy instead of two had disappeared in the T661 context (data not shown). Moreover, whereas in *mip1*^{G651S} mutant mtDNA was not maintained in the A661 context, preventing further analysis of point mutant accumulation, in the T661 context almost half of the cell population was still *rho*⁺ at 28 °C and showed an increased rate of Ery^R point mutations (Table 6).

4. Discussion

The question addressed in this work was: Is *S. cerevisiae* a good model to determine the effect of each individual mutation in patients harbouring several *POLG* mutations in *cis* or as compound heterozygous? Indeed, except in the case of dominant PEO, the patients often carry more than one *POLG* mutation in *cis* or in *trans*, and thus the specific contribution of each mutation to the disease cannot easily be established.

In this work we have shown that all the single substitution *mip1* mutations studied here cause mtDNA defects, increasing the frequency of deletions and in some cases the frequency of point mutations. We have found a good correlation between decreased cellular oxidative growth, *petite* frequency and loss of mtDNA. In contrast, there is no clear relationship between *petite* and point mutation frequencies. Although the two *MIP1* alleles used in our study, T661 and A661, confer very different levels in mtDNA instability, the classification of these mutations is similar. From the highest to lowest severity the ranking is G651S (hG848S) and H734Y (hH932Y)>A692T (hA889T)>G807R (hG1051R)>E900G (hE1143G).

The extreme severity of the G651S mutation fits with the observation that patients who compound heterozygous for G848S and A467T, or G848S and W748S-E1143G mutations, present with the fatal Alpers syndrome [22–24].

Whereas the relative contribution of mutations H932Y and G1051R in *trans* could not be established in the patients, comparison of the severity of the yeast H734Y and G807R

Table 5

Mip1 levels and gap-filling activity in mitochondrial extracts

Strain	Mip1 level ^a (% wt)	Specific gap-filling ^b activity (% wt)
GALMip1	100	100
GALZ3 ^c	1.5–2.0	100–130 ^d
G651S	7–10	42–55
A692T	100	29–30
H734Y	10–20	30–46
G807R	9–15	65–86
E900G	20–50	107–139 ^d
A692T-E900G	3–6	30–40

^a The amounts of Mip1 in the mitochondrial extracts were estimated by using Mip1 standard curves as reported in Fig. 4. For each strain the extreme ranges obtained for mitochondrial extracts from different cultures are indicated.

^b Wild-type GALMip1 incorporates 456±50 nmol dTTP/mg extract protein/h into trichloroacetic acid precipitable material. The gap-filling activity was normalized to the same amount of Mip1 for all strains and expressed as a percentage of wild-type activity (100%).

^c GALZ3 corresponds to the wild-type strain containing the empty GALZ3 plasmid.

^d These values are not significantly different from those reported for GALMip1.

mutations strongly suggests that the major contributor to the disease is H932Y, and moreover, our data show a strong synergistic deleterious effect of the two mutations associated in *trans*. In addition, the family history shows that individuals heterozygous for the H932Y mutation were developing mild symptoms or were asymptomatic, but conclusions were obscured by the presence of migraines and psychiatric disorders of unknown origin in several members of the family [28]. Our data in yeast have demonstrated that both in the A661 and T661 contexts, H734Y is dominant, suggesting that heterozygosity for H932Y has potential to cause symptoms in human.

Because A889T, the human equivalent of yeast A692T, was associated either with R579W in *trans* [27] or with E1143G in *cis* (the equivalent of yeast E900G), it was not possible to determine the individual contribution of A889T to the disease. Our data in yeast show that, when alone, A692T increases mtDNA instability significantly and E900G has a very mild phenotype. Therefore, it can be concluded that A889T significantly contributes to the disease. However, the association of E900G and A692T in *cis* has a strong deleterious synergistic effect resulting probably from the combination of a folding defect produced by E900G which decreases pol g levels and an intrinsic polymerisation defect produced by A692T. Therefore, it is possible that in humans symptoms are worsened by E1143G. Since in the carrier family the A692T–E900G mutations were dominant, though to different severity levels, it was concluded that E900G could be responsible for the dominant character. Our data show that the very weak dominant phenotype detected in the *mip1*^{A692T} mutant is not further increased in the *mip1*^{A692T–E900G} mutant, demonstrating that E900G does not confer a dominant phenotype and suggesting that the strong dominant phenotype observed in some members of the family [8] was not caused by E1143G but more likely by other factors interacting with *POLG*.

As discussed above our data show that E900G is not a silent mutation. When alone, it confers a strong temperature-sensitive phenotype in the A661 context, and even in the T661 context, a 5-fold increase in *petite* frequency is observed at 36 °C. This temperature-sensitive trait associated with the observation that Mip1 levels are decreased in mitochondrial extracts suggests that the E900G mutation acts on Mip1 structure. Thus, the deleterious synergistic effect of E900G mutation would be better explained by the combination of decreased amounts of protein caused by E900G and decreased polymerase activity caused by A692T. In contrast with these data, it has been reported that when associated with the W748S mutation in *cis* as found in patients, E1143G partially rescues the deleterious defects of the W748S mutation in vitro by improving the catalytic activity and the affinity for DNA of the mutant protein [34]. As this is the case in yeast for E900G associated with A692T, the E1143G substitution increases instability of W748S–E1143G pol g, and thus its unfolding propensity at body temperature. However, we do not think that these data, obtained in yeast and human for different mutations, are necessarily contradictory. They rather suggest that the effect of E1143G, by modifying protein structure, may depend on the second mutation it is combined with. The effect of the combination of the W748S

and E1143G equivalents in yeast could not be studied since Trp748 is not conserved in Mip1.

A matter of debate is whether accumulation of point mutations in mtDNA contributes to the disease. It has been postulated that point mutations near direct repeats are an early event in PEO which contributes to the formation of deletions [35]. On the other hand, muscle sample analysis of PEO patients with enhanced levels of point mutations and deletions [36] revealed that in young patients deletions were observed before any point mutation accumulation (point mutations occurring in an age-dependent manner). In addition, point mutation overload was specifically observed in the control region of mtDNA, whereas deletion break-points were mainly produced close to homopolymeric runs, suggesting that replication stalling was the primary cause of deletions [36]. Moreover, no point mutations were found in 136 single COX-negative fibres from biopsies of PEO patients harbouring multiple deletions [26]. It was concluded that the clonal expansion of mtDNA deletions accounts solely for the pathogenesis of mitochondrial diseases. The frequency of point Ery^R mutations is increased in all *mip1* mutants, suggesting that fidelity of mtDNA replication is decreased or mutation fixation is increased. However, each mutant behaves differently, with no correlation between the frequency of point mutations and deletions. The *mip1*^{A692T} mutant produces a greater number of *petites* than the *mip1*^{G807R} mutant, but a smaller number of Ery^R mutations. The percentage of *petites* is substantially increased in the *mip1*^{A692T–E900G} mutant, compared to the single substitution *mip1*^{A692T} mutant, but the frequency of Ery^R mutants is unchanged. The *mip1*^{H734Y} allele is dominant with regards to *petite* frequency, but it is recessive for Ery^R mutant frequency. This suggests that mtDNA instability is caused in general by different mechanisms from those producing single point mutation, although it cannot be excluded that increased point mutability could be involved for some *POLG* mutations. For example, the G651S mutation in the T661 context leads to the highest accumulation of *rho*[−] clones and point mutations. A better understanding of the role of the mutated pol g residue and mechanisms leading to mtDNA instability will allow to establish the relationship between point mutations and deletions in the different mutants.

Finally, we would like to discuss reasons for using A661 or T661 alleles. The present work has been centred on the A661 allele in order to facilitate comparisons with two previous works on *POLG* mutations [12,13], and also because the reference *S. cerevisiae* strain used for large scale functional analyses contains Ala661. In all mutants, except *mip1*^{H734Y}, mtDNA defects were dramatically increased in the A661 background. This was particularly marked for the G651S and E900G mutations. When borne by the A661 allele the G651S mutation results in a null *rho*⁰ phenotype whereas in the T661 context it allows mtDNA maintenance in almost half of the cells at the permissive temperature. Similarly, the temperature-sensitive properties of the E900G mutation in the A661 context are remarkably less pronounced in the T661 context. Thus, although the A661 allele may introduce bias in interpretation of the data, it can also emphasize subtle phenotypes and facilitate a systematic search for phenotypic suppressors.

Acknowledgements

This work was funded by the Belgian National Fund for Scientific Research, the Interuniversity Attraction Programme, Belgian Science Policy and the Association Française contre les Myopathies (to FF), and by Fondazione Telethon-Italy no. GGP030039 and no. GGP07019, and MIUR, no. 2006069034_003 (to IF).

References

- [1] L.S. Kaguni, DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 293–320.
- [2] F. Foury, S. Vanderstraeten, Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity, *EMBO J.* 11 (1992) 2717–2726.
- [3] E. Yakubovskaya, Z. Chen, J.A. Carrodegua, C. Kisker, D.F. Bogenhagen, Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 374–382.
- [4] G. Van Goethem, B. Dermaut, A. Lofgren, 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.
- [5] M.J. Longley, M.A. Graziewicz, R.J. Bienstock, W.C. Copeland, Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma, *Gene* 354 (2005) 125–131.
- [6] G. Hudson, P.F. Chinnery, Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) R244–R252.
- [7] A. Di Fonzo, A. Bordoni, M. Crimi, G. Sara, R.D. Bo, N. Bresolin, G.P. Comi, *POLG* mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 498–499.
- [8] F.M. Hisama, M. Mancuso, M. Filosto, S. DiMauro, Progressive external ophthalmoplegia: a new family with tremor and peripheral neuropathy, *Am. J. Med. Genet. A.* 135 (2005) 217–219.
- [9] R. Horvath, G. Hudson, G. Ferrari, N. Futterer, S. Ahola, E. Lamantea, H. Prokisch, H. Lochmuller, R. McFarland, V. Ramesh, T. Klopstock, P. Freisinger, F. Salvi, J.A. Mayr, R. Santer, M. Tesarova, J. Zeman, B. Udd, R.W. Taylor, D. Turnbull, M. Hanna, D. Fialho, A. Suomalainen, M. Zeviani, P.F. Chinnery, Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene, *Brain* 129 (2006) 1674–1684.
- [10] S. Winterthun, G. Ferrari, L. He, R.W. Taylor, M. Zeviani, D.M. Turnbull, B.A. Engelsens, G. Moen, L.A. Bindoff, Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations, *Neurology* 64 (2005) 1204–1208.
- [11] G. Van Goethem, P. Luoma, M. Rantamaki, A. Al Memar, S. Kaakkola, P. Hackman, R. Krahe, A. Lofgren, J.J. Martin, P. De Jonghe, A. Suomalainen, B. Udd, C. Van Broeckhoven, *POLG* mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement, *Neurology* 63 (2004) 1251–1257.
- [12] G.R. Stuart, J.H. Santos, M.K. Strand, B. Van Houten, W.C. Copeland, Mitochondrial and nuclear DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 363–374.
- [13] E. Baruffini, T. Lodi, C. Dallabona, A. Puglisi, M. Zeviani, I. Ferrero, Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 2846–2855.
- [14] N. Lecrenier, F. Foury, Overexpression of the *RNR1* gene rescues *Saccharomyces cerevisiae* mutants in the mitochondrial DNA polymerase-encoding *MIPI* gene, *Mol. Gen. Genet.* 249 (1995) 1–7.
- [15] C. Kaiser, S. Michaelis, A. Mitchell, Methods in Yeast Genetics: a Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994.
- [16] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* 77 (1989) 51–59.
- [17] N. Bonneaud, O. Ozier-Kalogeropoulos, G.Y. Li, M. Labouesse, L. Minvielle-Sebastia, F. Lacroute, A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/E. coli shuttle vectors, *Yeast* 7 (1991) 609–615.
- [18] F. Foury, S. Vanderstraeten, Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity, *EMBO J.* 11 (1992) 2717–2726.
- [19] P.P. Slonimski, A. Tzagoloff, Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH2-cytochrome c reductase, *Eur. J. Biochem.* 61 (1976) 27–41.
- [20] A. Tzagoloff, R.B. Needleman, A. Akai, G. Zulch, Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 8236–8242.
- [21] G. Ferrari, E. Lamantea, A. Donati, M. Filosto, E. Briem, F. Carrara, R. Parini, A. Simonati, R. Santer, M. Zeviani, Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gamma A, *Brain* 128 (2005) 723–731.
- [22] G. Davidzon, M. Mancuso, S. Ferraris, C. Quinzii, M. Hirano, H.L. Peters, D. Kirby, D.R. Thorburn, S. DiMauro, *POLG* mutations and Alpers syndrome, *Ann. Neurol.* 57 (2005) 921–923.
- [23] K.V. Nguyen, E. Ostergaard, S.H. Ravn, T. Balslev, E.R. Danielsen, A. Vardag, P.J. McKiernan, G. Gray, R.K. Naviaux, *POLG* mutations in Alpers Syndrome, *Neurology* 65 (2005) 1493–1495.
- [24] G. Kollberg, A.R. Moslemi, N. Darin, I. Nennesmo, I. Bjarnadottir, P. Uvebrant, E. Holme, A. Melberg, M. Tulinius, A. Oldfors, *POLG1* mutations associated with progressive encephalopathy in childhood, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65 (2006) 758–768.
- [25] E. Lamantea, V. Tiranti, A. Bordoni, A. Toscano, F. Bono, S. Servidei, A. Papadimitriou, H. Spelbrink, L. Silvestri, G. Casari, G.P. Comi, M. Zeviani, Mutations of mitochondrial DNA polymerase gamma are a frequent cause of autosomal dominant or recessive Progressive External Ophthalmoplegia, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 211–219.
- [26] G. Kollberg, M. Jansson, A. Perez-Bercoff, A. Melberg, C. Lindberg, E. Holme, A.R. Moslemi, A. Oldfors, Low frequency of mtDNA point mutations in patients with PEO associated with *POLG1* mutations, *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (2005) 463–469.
- [27] M. Filosto, M. Mancuso, Y. Nishigaki, J. Pancrudo, Y. Harati, G. Gooch, A. Mankodi, L. Bayne, E. Bonilla, S. Shanske, M. Hirano, S. DiMauro, Clinical and genetic heterogeneity in progressive external ophthalmoplegia due to mutations in polymerase gamma, *Arch. Neurol.* 60 (2003) 1279–1284.
- [28] M. Mancuso, M. Filosto, M. Bellan, R. Liguori, P. Montagna, A. Baruzzi, S. DiMauro, V. Carelli, *POLG* mutations causing ophthalmoplegia, sensorimotor polyneuropathy, ataxia, and deafness, *Neurology* 62 (2004) 316–318.
- [29] E. Baruffini, T. Lodi, C. Dallabona, F. Foury, A single nucleotide polymorphism in the DNA polymerase gamma gene of *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains is responsible for increased mitochondrial DNA mutability, *Genetics* 177 (2007) 1227–1231.
- [30] B. Dujon, Mitochondrial genetics and function, in: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 505–635.
- [31] A. Tzagoloff, A. Akai, R.B. Needleman, G. Zulch, Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 8236–8242.
- [32] S. Mathews, R.J. Schweyen, F. Kaudewitz, Preferential loss or retention of mitochondrial genes in *rho*⁻ clones, *Mitochondria, Genetics and biogenesis of mitochondria*, Walter de Gruyter, Berlin, NY, 1977, pp. 133–138.
- [33] F. Sor, H. Fukuhara, Erythromycin and spiramycin resistance mutations of yeast mitochondria: nature of the *rib2* locus in the large ribosomal RNA gene, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 8313–8318.
- [34] S.S. Chan, M.J. Longley, W.C. Copeland, Modulation of the W748S mutation in DNA polymerase gamma by the E1143G polymorphism in mitochondrial disorders, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 3473–3483.

- [35] M.V. Ponamarev, M.J. Longley, D. Nguyen, T.A. Kunkel, W.C. Copeland, Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 15225–15228.
- [36] S. Wanrooij, P. Luoma, G. Van Goethem, C. Van Broeckhoven, A. Suomalainen, J.N. Spelbrink, Twinkle and *POLG* defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 3053–3064.
- [37] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.

Allegato 3:

Baruffini E., Lodi T., Dallabona C. and Foury F. (2007). A single nucleotide polymorphism in the DNA polymerase gamma gene of *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains is responsible for increased mitochondrial DNA mutability. *Genetics*. **177**, 1227-1231.

Note

A Single Nucleotide Polymorphism in the DNA Polymerase Gamma Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Laboratory Strains Is Responsible for Increased Mitochondrial DNA Mutability

Enrico Baruffini,^{*,†} Tiziana Lodi,[†] Cristina Dallabona[†] and Françoise Foury^{*,1}

^{*}Unité de Biochimie Physiologique, Université Catholique de Louvain, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium and

[†]Department of Genetics, Biology of Microorganisms, Anthropology, Evolution, University of Parma, 43100 Parma, Italy

Manuscript received July 25, 2007

Accepted for publication August 5, 2007

ABSTRACT

In the *Saccharomyces cerevisiae* strains used for genome sequencing and functional analysis, the mitochondrial DNA replicase Mip1p contains a single nucleotide polymorphism changing the strictly conserved threonine 661 to alanine. This substitution is responsible for the increased rate of mitochondrial DNA point mutations and deletions in these strains.

THE yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the few eukaryotic organisms that can survive in the absence of mitochondrial DNA (mtDNA). When grown on glucose-containing medium, *S. cerevisiae* produces respiratory-deficient mutants that form small colonies and thus are referred to as “cytoplasmic *petites*” (SLONIMSKI and EPHRUSSI 1949). They either contain deletions in their mtDNA (*rho*[−]) or are devoid of mtDNA (*rho*⁰) (DUJON 1981). *petite* frequency varies within a large range among laboratory strains (MARMIROLI *et al.* 1980), a not surprising feature with regards to the numerous genes that control *petite* accumulation (CONTAMINE and PICARD 2000). One of these is *MIPI*, which encodes the mitochondrial polymerase (DNA polymerase gamma) (FOURY 1989). Previous studies using the *MIPI* gene isolated from a genomic library constructed with strain Σ 1278b (GRENSON *et al.* 1966), referred to as *MIPI*[Σ], have shown that Mip1p is an accurate replicase (FOURY and VANDERSTRAETEN 1992; HU *et al.* 1995; VANDERSTRAETEN *et al.* 1998). However, recent works using the *MIPI* allele from S288c-related strains, referred to as *MIPI*[S], have pointed to higher mutation rates of the mitochondrial genome (BARUFFINI *et al.* 2006; STUART *et al.* 2006). Here we show that this increase in mtDNA instability results from a single nucleotide substitution in the *MIPI* gene, changing a strictly conserved threonine at position 661 to alanine.

***MIPI*[S] allele increases mtDNA instability:** *petite* mutant frequency was determined in the DWM-5A- Δ mip1 strain (BARUFFINI *et al.* 2006) carrying pFL39 plasmid-borne versions of either *MIPI*[S] or *MIPI*[Σ]. A fourfold increase in *petite* accumulation was observed at 28° in the presence of *MIPI*[S] compared to *MIPI*[Σ] (Figure 1A). Moreover, in the *MIPI*[S] context, and in contrast to the *MIPI*[Σ] context, *petite* accumulation was highly dependent on temperature (Figure 1A). On the basis of the capacity of independent *petite* clones to restore *mit*[−] mutations to wild type (SLONIMSKI and TZAGOLOFF 1976), it was concluded that, in both *MIPI* contexts, most *petites* had retained mtDNA fragments and were *rho*[−], even though, in the *MIPI*[S] context, the fraction of *rho*⁰ clones at 36° was significantly higher (Figure 1B). The frequency of Ery^R mutants, which are caused by mtDNA mutations in the 21S rRNA gene (SOR and FUKUHARA 1984), gives an estimate of the frequency of mtDNA point mutations. A sixfold increase in Ery^R mutants was observed in the *MIPI*[S] context compared to the *MIPI*[Σ] context (Figure 1C). These data show that in the same nuclear background the mitochondrial genome is less stable in the presence of the *MIPI*[S] allele, suggesting that this trait could be ascribed to differences in the amino acid sequence of the two Mip1p isoforms.

T661A substitution in the *MIPI*[S] allele is the cause of temperature-sensitive *petite* accumulation: DNA sequence analysis revealed 26 single nucleotide polymorphisms (SNPs) between *MIPI*[S] and *MIPI*[Σ] alleles (Table 1). The *MIPI* sequence was identical in W303-1B and S288c, confirming the close origin of these strains

¹Corresponding author: Unité de Biochimie Physiologique, Croix du Sud 5-15, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium. E-mail: foury@fysa.ucl.ac.be

(SCHACHERER *et al.* 2007). Sixteen SNPs were silent and 10 produced nonsynonymous substitutions. Multiple amino acid alignments with several fungi and animal pol g sequences showed that these modifications affected mostly poorly conserved residues (data not shown). However, Thr661, which is found in Mip1p[Σ] and is strictly conserved in all species from yeasts to humans, is changed to alanine in Mip1p[S] due to an A-to-G transition at position 1981 of the *MIP1* sequence. Moreover, Thr661 has been found in two recently sequenced *S. cerevisiae* strains, YJM789 (GU *et al.* 2005) and RM11-1a (LEE *et al.* 2006), which have a *MIP1*[S]-like allele.

To determine whether the T661A substitution was the cause of *petite* accumulation in the *MIP1*[S] context, a *MIP1*[S]^{A661T} variant was constructed. In the presence of this new allele, *petite* frequency was similar to that observed with the *MIP1*[Σ] allele and, moreover, the temperature-sensitive trait had disappeared (Figure 1A). The frequency of Ery^R mutants was also reduced (Figure 1C). In a heteroallelic *MIP1*[S]^{A661T}/*MIP1*[S] strain, *petite* and Ery^R mutant frequencies were similar to those observed in a strain containing *MIP1*[S]^{A661T} only, indicating that the *MIP1*[S] allele is recessive (data not shown).

We measured *petite* frequency in several laboratory strains. Σ 1278b, D273-10B/A1 (SHERMAN 1964), and FL100 (LACROUTE 1968), which possess the *MIP1*[Σ]

allele (E. BARUFFINI, unpublished data), had low levels of *petites* (Table 2). W303-1B (THOMAS and ROTHSTEIN 1989) and BY4742 (BRACHMANN *et al.* 1998), which possess the *MIP1*[S] allele (and thus Ala661), accumulated *petites* at higher levels and in a temperature-dependent manner (Table 2). To further demonstrate that increased instability of the mitochondrial genome could be ascribed to Ala661 rather than to the genetic background of these strains, the pFL38 plasmid-borne *MIP1*[S]^{A661T} and *MIP1*[S] alleles were introduced in a *mip1* Δ derivative of D273-10B/A1. *petite* frequency was low in the presence of *MIP1*[S]^{A661T} and increased in the presence of *MIP1*[S] (Table 3). Altogether, these data demonstrate that the T661A substitution in Mip1p is the cause of the higher accumulation of *petites* in S288c, BY4742, and W303-1B strains.

Natural isolates contain a threonine residue at position 661: To determine whether T661A was a widespread mutation, we analyzed 20 strains isolated from grapes of different Italian regions or used as industrial starters for wine or bread production. Adenine at position

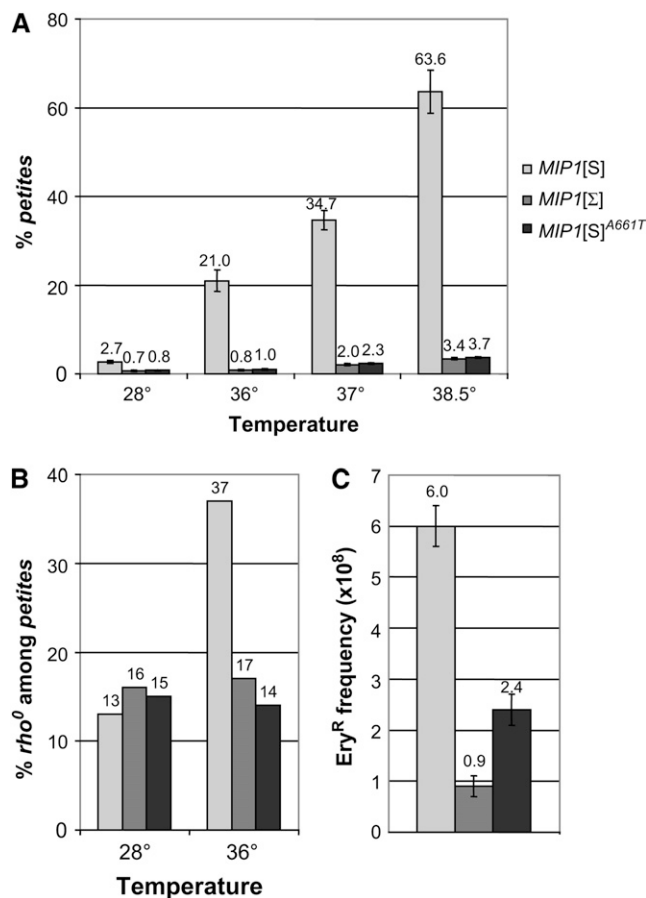


FIGURE 1.—Mitochondrial DNA mutation frequency with different *MIP1* alleles. DWM-5A- Δ mip1, an haploid W303 derivative (BARUFFINI *et al.* 2006), was transformed with different *MIP1* alleles. The *MIP1* alleles were inserted into the *Sad* and *SalI* sites of the centromeric pFL39 plasmid (BONNEAUD *et al.* 1991). The *MIP1*[S]^{A661T} allele was produced by site-directed mutagenesis using the PCR overlap extension technique (Ho *et al.* 1989). (A) *petite* mutant frequency. Cells were pregrown at 28° on solid SC medium (6.7 g/liter yeast nitrogen base supplemented with a mixture of amino acids) supplemented with 2% ethanol. After 60 hr, the strains were replica plated on SC medium supplemented with 2% glucose and grown at the specified temperature. After 24 hr, strains were replica plated again on this medium. After 24 hr, cells were plated for single colonies on SC medium supplemented with 2% ethanol and 0.3% glucose. *petite* frequency was defined as the percentage of colonies showing the *petite* phenotype after 5 days at 28°. For each strain, at least 4000 clones were analyzed. Values are means of three independent experiments. (B) Percentage of *rho*⁰ mutants. The *rho*⁰ clones containing mtDNA-deleted molecules and the *rho*⁰ clones devoid of mtDNA were distinguished as follows. At least 200 independent *petite* clones from each haploid *mip1* strain were crossed with *cox2*, *cox3*, and two *cob mit*[−] mutants of opposite mating type on YPA plates (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 40 mg/liter adenine) supplemented with 2% glucose, and after 2 days at 28° they were replica plated on YPA plates supplemented with 3% glycerol to identify *rho*⁺ diploids. In this work, a clone unable to complement any of the *mit*[−] mutants was arbitrarily defined as *rho*⁰. (C) Ery^R mutant frequency. Two independent series of 10 independent colonies grown on YPA plates supplemented with 3% glycerol were inoculated in 2.5 ml YPA medium. After 48 hr at 28°, 5–8 × 10⁷ cells were plated on YPAEG-ery medium (YPA supplemented with 3% ethanol, 3% glycerol, 3 g/liter erythromycin, and 25 mM potassium phosphate buffer at pH 6.5) and grown at 28° for 9 days. An aliquot of each culture was plated for single colonies on YPA plates supplemented with 3% glycerol to determine the exact number of *rho*⁺ cells present in the culture.

TABLE 1
SNPs and amino acid substitutions in *MIPI*[Σ] and *MIPI*[S] alleles

SNP ^a	Amino acid substitution ^b	SNP	Amino acid substitution	SNP	Amino acid substitution
<i>T23</i> → <i>C</i> ^c	<i>F8</i> → <i>S</i>	T1299 → C	Silent (P433)	<i>A1847</i> → <i>G</i>	<i>N616</i> → <i>S</i>
<i>G103</i> → <i>A</i>	<i>A35</i> → <i>T</i>	T1590 → C	Silent (S530)	<i>A1981</i> → <i>G</i>	<i>T661</i> → <i>A</i>
G219 → T	Silent (L73)	G1617 → A	Silent (R539)	C2166 → T	Silent (C722)
G627 → A	Silent (A209)	<i>T1519</i> → <i>C</i>	<i>M540</i> → <i>T</i>	<i>C2932</i> → <i>T</i>	<i>P978</i> → <i>S</i>
<i>G664</i> → <i>A</i>	<i>V222</i> → <i>I</i>	<i>A1521</i> → <i>C</i>	<i>N541</i> → <i>H</i>	<i>G2957</i> → <i>A</i>	<i>S986</i> → <i>N</i>
G792 → A	Silent (Q264)	T1671 → C	Silent (P557)	T3345 → C	Silent (I1115)
<i>A1069</i> → <i>G</i>	<i>K357</i> → <i>E</i>	C1680 → G	Silent (P560)	G3384 → A	Silent (E1128)
T1161 → A	Silent (L387)	T1692 → C	Silent (C564)	A3516 → G	Silent (P1172)
A1221 → G	Silent (Q407)	T1794 → G	Silent (G598)		

^a The first nucleotide refers to *MIPI*[Σ], the second to *MIPI*[S].

^b The first amino acid refers to Mip1[Σ], the second to Mip1[S].

^c Nonsynonymous SNPs and corresponding amino acid substitutions are in italics.

1981 of the *MIPI* gene is associated with a *Bsa*AI site while with guanine the *Bsa*AI site is lost. To distinguish these polymorphisms, a DNA fragment encompassing nucleotides 1046–2329 was amplified and digested by *Bsa*AI. The presence of adenine at position 1981 generates two DNA fragments of 937 and 347 bp, whereas guanine generates a single DNA fragment of 1284 bp (Figure 2A). In all strains, the *MIPI* gene possessed the *Bsa*AI site and thus Thr661.

On the other hand, the partial genome sequence of haploid segregants from 36 strains of different origins has recently been published (Saccharomyces Genome Resequencing Project at the Sanger Institute, <http://www.sanger.ac.uk/Teams/Team71/durbin/sgrp/index.shtml>). Most Western isolates have the *MIPI*[S]^{A661T} allele; the *MIPI* gene of Asian isolates is a complex mosaic of the *MIPI*[S]^{A661T} and *MIPI*[Σ] alleles, but none of the strains has the *MIPI*[Σ] allele, raising the question of the origin of this allele. However, all isolates have a threonine at position 661.

In contrast, analysis of the *MIPI* gene of the diploid EM93 strain, which is the progenitor of S288c and derivative strains and has been estimated to share 88% of its genome with S288c (MORTIMER and JOHNSTON 1986), revealed that, in addition to the two DNA frag-

ments generated by the *Bsa*AI digest, an undigested fragment of 1284 bp was also present (Figure 2A), a sign of heterozygosity at the *Bsa*AI site. *MIPI* gene sequencing and tetrad analysis (data not shown) confirmed that both A and G were present at position 1981 (Figure 2B). Therefore, EM93 is heterozygous for the *MIPI* allele. These data led to the conclusion that the T661A substitution is unique and specific to EM93, the founder of several commonly used laboratory strains.

Concluding remarks: This work provides an explanation for the high frequency of mtDNA deletions and point mutations occurring in commonly used laboratory strains: a missense mutation in the mitochondrial DNA replicase brought about by EM93, the founder strain (MORTIMER and JOHNSTON 1986). The fact that S288c and its derivatives BY4741, BY4742, and BY4743, the strains used in the genome sequencing and large-scale functional analysis projects, contain the *MIPI*[S] allele should be taken into consideration in genomic studies focused on alterations of the mitochondrial metabolism. Moreover, the *MIPI*[S] allele has previously been used to establish the impact of human pathological *POLG* mutations on the stability of mtDNA (BARUFFINI *et al.* 2006; STUART *et al.* 2006). It must be stressed that

TABLE 2

petite accumulation in different laboratory strains

Strains	% <i>petites</i>		Amino acid at position 661
	28°	36°	
D273-10B/A1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	Threonine
FL100	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	Threonine
Σ1278b	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	Threonine
W303-1B	2.3 ± 0.2	15.1 ± 2.1	Alanine
BY4742	2.1 ± 0.2	11.3 ± 1.1	Alanine

Experimental conditions are as in Figure 1A.

TABLE 3

petite accumulation in strain D273-CD3-Δmip1 transformed with different *MIPI* alleles

D273-CD3-Δmip1	% <i>petites</i>	
	28°	36°
<i>MIPI</i> [S]	5.1 ± 0.4	22.6 ± 3.4
<i>MIPI</i> [S] ^{A661T}	2.2 ± 0.2	2.6 ± 0.3

D273-CD3-Δmip1 is a spontaneous *ura3* mutant of D273-10B/A1 in which the *MIPI* gene has been replaced by a *Kan^R* deletion cassette in the presence of the pFL38 (BONNEAUD *et al.* 1991) plasmid-borne *MIPI*[S] or *MIPI*[S]^{A661T} to keep mtDNA. Experimental conditions are as in Figure 1A.

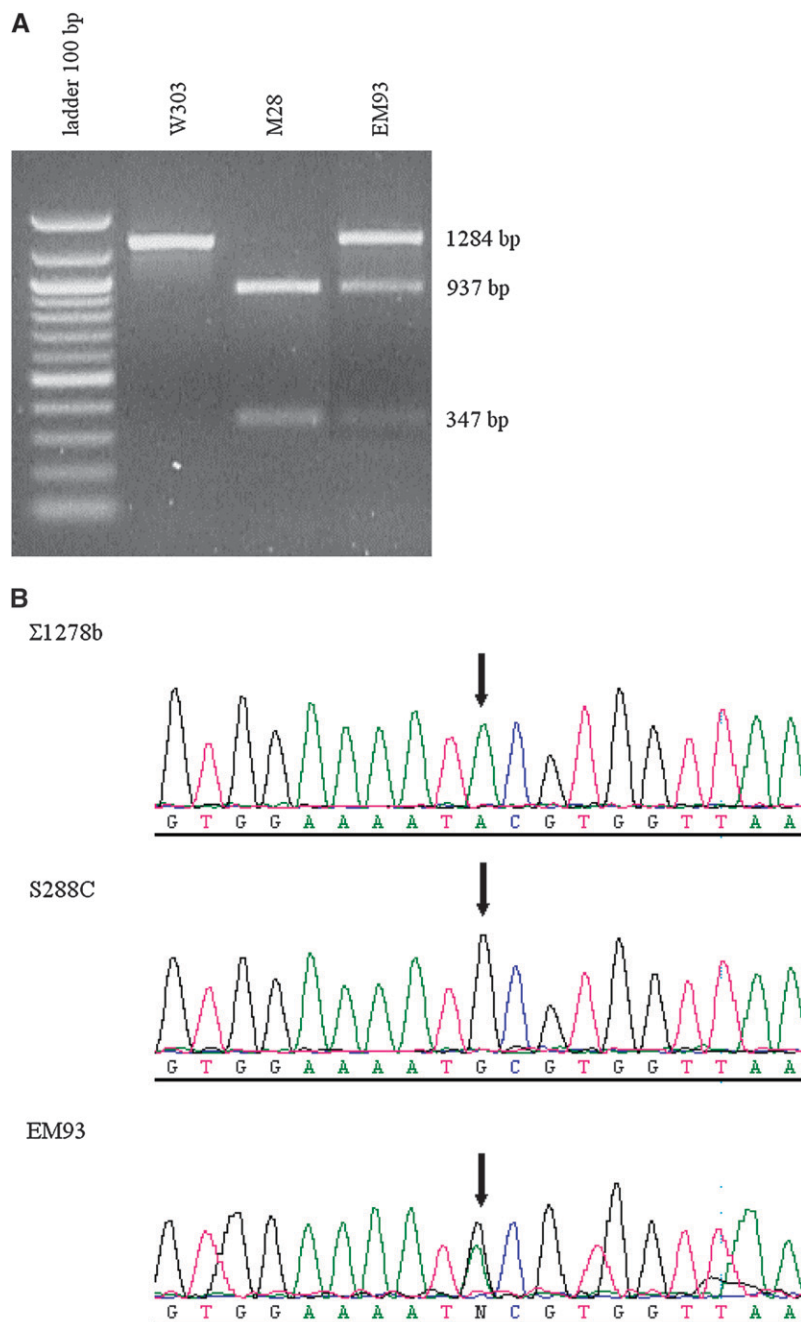


FIGURE 2.—Analysis of the polymorphism at position 1981 of the *MIP1* nucleotide sequence. (A) *Bsa*AI restriction analysis of the DNA fragment from nucleotides 1046 to 2329. All natural isolates analyzed produced the same pattern as the M28 strain, an isolate from grapes in a Tuscan vineyard (CAVALIERI *et al.* 2000). (B) DNA sequence of the segment encompassing position 1981.

even though this allele, which exacerbates certain defects, can be useful in detecting subtle effects of *mip1* mutations, it may also cause unreliable phenotypes.

We thank I. Ferrero (University of Parma) for stimulating discussion, D. Cavalieri, M. Polsinelli (University of Florence, Italy), and M. Budroni (University of Sassari, Italy) for providing natural wine strains, and G. Liti and E. J. Louis (University of Nottingham, UK) for useful information about the *S. cerevisiae* strains sequenced at the Sanger Institute. We thank Roberto Silva for his skillful technical assistance. This work was funded by the Belgian National Fund for Scientific Research (to F.F.), the Inter-university Attraction Programme, Belgian Science Policy (to F.F.), the Association Française contre les Myopathies (to F.F.), and the Fondazione Telethon-Italy no. GGP030039 and National Benefit Research Project 2006 2006069034_003 (to E.B. and T.L.).

LITERATURE CITED

- BARUFFINI, E., T. LODI, C. DALLABONA, A. PUGLISI, M. ZEVIANI *et al.*, 2006 Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans. *Hum. Mol. Genet.* **15**: 2846–2855.
- BONNEAUD, N., O. OZIER-KALOGEROPOULOS, G. Y. LI, M. LABOUESSE, L. MINVIELLE-SEBASTIA *et al.*, 1991 A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* **7**: 609–615.
- BRACHMANN, C. B., A. DAVIES, G. J. COST, E. CAPUTO, J. LI *et al.*, 1998 Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115–132.

- CAVALIERI, D., J. P. TOWNSEND and D. L. HARTL, 2000 Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12369–12374.
- CONTAMINE, V., and M. PICARD, 2000 Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 281–315.
- DUJON, B., 1981 Mitochondrial genetics and functions, pp. 505–635 in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- FOURY, F., 1989 Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **264**: 20552–20560.
- FOURY, F., and S. VANDERSTRAETEN, 1992 Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity. *EMBO J.* **11**: 2717–2726.
- GRENSON, M., M. MOUSSET, J. M. WIAME and J. BECHET, 1966 Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* **127**: 325–338.
- GU, Z., L. DAVID, D. PETROV, T. JONES, R. W. DAVIS *et al.*, 2005 Elevated evolutionary rates in the laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 1092–1097.
- HO, S. N., H. D. HUNT, R. M. HORTON, J. K. PULLEN and L. R. PEASE, 1989 Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51–59.
- HU, J. P., S. VANDERSTRAETEN and F. FOURY, 1995 Isolation and characterization of ten mutator alleles of the mitochondrial DNA polymerase-encoding *MIP1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **160**: 105–110.
- LACROUTE, F., 1968 Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **95**: 824–832.
- LEE, S. I., D. PE'ER, A. M. DUDLEY, G. M. CHURCH and D. KOLLER, 2006 Identifying regulatory mechanisms using individual variation reveals key role for chromatin modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 14062–14067.
- MARMIROLI, N., F. M. RESTIVO, C. DONNINI, L. BIANCHI and P. P. PUGLISI, 1980 Analysis of *rho* mutability in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Effects of *mmc* and *pet-ts* alleles. *Mol. Gen. Genet.* **177**: 581–588.
- MORTIMER, R. K., and J. R. JOHNSTON, 1986 Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35–43.
- SCHACHERER, J., D. M. RUDERFER, D. GRESHAM, K. DOLINSKI, D. BOTSTEIN *et al.*, 2007 Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains. *PLoS ONE* **3**: e322.
- SHERMAN, F., 1964 Mutants of yeast deficient in cytochrome c. *Genetics* **49**: 39–48.
- SLONIMSKI, P. P., and B. EPHRUSSI, 1949 Action de l'acriflavine sur les levures. V. Le système des cytochromes des mutants "petite colonie." *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **77**: 47–63.
- SLONIMSKI, P. P., and A. TZAGOLOFF, 1976 Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *Eur. J. Biochem.* **61**: 27–41.
- SOR, F., and H. FUKUHARA, 1984 Erythromycin and spiramycin resistance mutations of yeast mitochondria: nature of the *rib2* locus in the large ribosomal RNA gene. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8313–8318.
- STUART, G. R., J. H. SANTOS, M. K. STRAND, B. VAN HOUTEN and W. C. COPELAND, 2006 Mitochondrial and nuclear DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in DNA polymerase γ associated with progressive external ophthalmoplegia. *Hum. Mol. Genet.* **15**: 363–374.
- THOMAS, B. J., and R. ROTHSTEIN, 1989 Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619–630.
- VANDERSTRAETEN, S., S. VAN DEN BRULE, J. P. HU and F. FOURY, 1998 The role of 3'-5' exonucleolytic proofreading and mismatch repair in yeast mitochondrial DNA error avoidance. *J. Biol. Chem.* **273**: 23690–23697.

Communicating editor: A. NICOLAS

Allegato 4:

Baruffini E., Goffrini P., Donnini C. and Lodi T. (2006). Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Res.* **6**, 1235-1242.*

* Il lavoro oggetto di questa pubblicazione è stato condotto durante il I anno di dottorato in parallelo allo studio degli effetti di mutazioni in *MIP1*.

Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1

Enrico Baruffini, Paola Goffrini, Claudia Donnini & Tiziana Lodi

Dipartimento di Genetica Antropologia Evoluzione, University of Parma, Parma, Italy

Correspondence: Tiziana Lodi, Dipartimento di Genetica Antropologia Evoluzione, University of Parma, Parco Area delle Scienze 11/A, 43100 Parma, Italy. Tel.: +39 0521 905494; fax: +39 0521 905604; e-mail: gftiziana.lodi@unipr.it

Received 17 January 2006; revised 16 March 2006; accepted 30 March 2006
First published online 8 June 2006.

DOI:10.1111/j.1567-1364.2006.00107.x

Editor: Monique Bolotin-Fukuhara

Keywords

HGT1; galactose transport; hexose permease; *Kluyveromyces lactis*; yeast.

Abstract

In *Kluyveromyces lactis*, galactose transport has been thought to be mediated by the lactose permease encoded by *LAC12*. In fact, a *lac12* mutant unable to grow on lactose did not grow on galactose either and showed low and uninducible galactose uptake activity. The existence of other galactose transport systems, at low and at high affinity, had, however, been hypothesized on the basis of galactose uptake kinetics studies. Here we confirmed the existence of a second galactose transporter and we isolated its structural gene. It turned out to be *HGT1*, previously identified as encoding the high-affinity glucose carrier. Analysis of galactose transporter mutants, *hgt1* and *lac12*, and the double mutant *hgt1lac12*, suggested that Hgt1 was the high-affinity and Lac12 was the low-affinity galactose transporter. *HGT1* expression was strongly induced by galactose and insensitive to glucose repression. This could explain the rapid adaptation to galactose observed in *K. lactis* after a shift from glucose to galactose medium.

Introduction

The first and essential step in the utilization of sugars is their transport into cells, mediated by specific permeases belonging to the major facilitator superfamily (MFS) (TC2.1, according to the 'transporter classification system') (De Hertogh *et al.*, 2002). These proteins possess a common structure: a central hydrophobic core of 10–12 membrane-spanning domains flanked by hydrophilic domains. They catalyse the transport of sugars across the membrane by facilitated diffusion down a concentration gradient, or by coupling with proton symport or antiport operating against a concentration gradient (André, 1995).

Recently, the genome sequences of several ascomycetes were completed (Dujon *et al.*, 2004), allowing structural and phylogenetic comparison between sugar porter systems in closely related organisms. In the genomic sequences of *Kluyveromyces lactis*, about 20 ORFs show a similarity to the genes of known sugar permeases. Only six of them have been functionally characterized. Two encode glucose transporters: *RAG1*, which encodes a low-affinity glucose transporter (*RAG* means 'resistance to antimycin A on glucose') (Goffrini *et al.*, 1990; Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992), and *HGT1*, which encodes a high-affinity glucose transporter (Billard *et al.*, 1996). Some strains, such as JA6 and CBS6315, do not possess *RAG1* and *HGT1*: in their place, they have two genes, called

KHT1 and *KHT2*, arranged in tandem at the *RAG1* locus (Weirich *et al.*, 1997). *FRT1* encodes a specific fructose permease with a very high affinity for this sugar. It is a proton symport system (Diezemann & Boles, 2003).

In *K. lactis*, the transport of galactose has been thought to be mediated by the lactose permease encoded by *LAC12*. A *lac12* mutant, the 11D304 strain isolated by Riley *et al.* (1987), was unable to grow on lactose, and did not grow on galactose either (or grew very slowly). The mutant indeed showed a low and uninducible galactose uptake activity. The existence of other galactose transporters had, however, been hypothesized (Boze *et al.*, 1987; Riley *et al.*, 1987). In particular, an analysis of galactose uptake kinetics (Boze *et al.*, 1987) suggested that there are two different galactose transport systems: a low-affinity system, inhibited by lactose, and a high-affinity system, competitively inhibited by glucose. Recent results obtained in our laboratory confirmed the existence of a second galactose transporter: disruption of the *LAC12* gene in several laboratory strains, including CBS2359, did not lead to a galactose-negative phenotype, in contradiction to the original report on the *lac12* mutant 11D304. Recently, a hexose transporter gene, *KHT3*, was found whose overexpression improved the growth of a *lac12* mutant on galactose. However, the activity of this galactose transporter seems to be minor, and its physiological role remains to be established (Wiedemuth & Breunig, 2005).

In the present work, we searched for and isolated the second galactose permease of *K. lactis*. It turned out to be Hgt1p, previously identified as the high-affinity glucose carrier identified by Billard *et al.* (1996).

Materials and methods

Yeast strains, media and genetic procedures

The yeast strains are listed in Table 1. The YP medium contained 1% Bacto-yeast extract and 2% Bacto-peptone (Difco). The minimal medium (YNB) contained 7 g L⁻¹ Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco) supplemented with appropriate amino acids and bases for auxotrophy. Various carbon sources were added at the indicated concentrations. Galactose 0.2% was the condition at which the *hgt1* and *lac12* phenotype was scored better. Genetic procedures have been described previously (Wésolowski *et al.*, 1982).

DNA manipulation

Published procedures were used for transformation of *K. lactis* (Bianchi *et al.*, 1987) and *Escherichia coli* (Mandel & Higa, 1970), isolation and purification of plasmids from *E. coli*, and agarose gel electrophoresis (Sambrook & Russel, 2001). *Escherichia coli* strain JM83 (*araΔ(lac-proAB) rpsL* (= *strA*) ϕ 80 *lacZΔ M15*) was used for plasmid propagation. DNA sequencing was carried out using a Beckman CEQ2000 automatic sequencer. Sequence data analysis was performed with the BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) program.

Northern analysis

Total RNA was prepared by extraction with hot acidic phenol (Ausubel *et al.*, 1994). Northern analysis was carried out according to the protocol of Sherman *et al.* (1986). The *HGT1* probe was the 2.4-kb *EcoRI*–*HindIII* segment corresponding to the complete ORF. The amount of RNA loaded onto the gel was estimated by hybridization with a *K. lactis* actin probe (Deshler *et al.*, 1989). The probes were labelled

with [α -³²P]dCTP by the *rediprime* DNA-labelling system (Amersham).

Galactose uptake measurement

Uptake experiments were carried out using the method described by Bisson & Fraenkel (1983), with a few modifications. Cells grown in YP medium supplemented with 2% galactose plus 0.1% glucose were harvested at the early stationary phase of growth (OD_{600 nm} 1, about 0.45 mg dry cell mass mL⁻¹), washed twice with ice-cold 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5, and resuspended in the same buffer at OD_{600 nm} 90. A 30- μ L aliquot of cell suspension was used for each measurement. The uptake experiments were done at 30 °C. Uptake was initiated by addition of 30 μ L of a buffered (pH 6.5) aqueous solution of [1-¹⁴C]D-galactose at the indicated concentration. Aliquots of 13.5 μ L were taken at different time intervals as indicated, and uptake was stopped by dilution with 5 mL of ice-cold water. The reaction mixture was immediately filtered through a GF/C membrane (Whatman) and washed twice with 5 mL of ice-cold water. Radioactivity was measured in a Tricarb liquid scintillation counter (Packard). ¹⁴C-Labelled galactose was obtained from Amersham Pharmacia Biotech.

HGT1 gene disruption

The 2.4-kb *EcoRI*–*HindIII* fragment of *HGT1* was first cloned in the pUC19 vector. The 1.14-kb *KpnI*–*PstI* region was then deleted and replaced by the 1.2-kb *S. cerevisiae* *URA3* marker (a *BglII*–*BglII* fragment derived from the pFL38 vector, previously cloned at the *BamHI* site of the pUC19 vector). *URA3* complements the *uraA* mutation of *K. lactis*. The construction was linearized by *EcoRI* and *HindIII* and used to transform 2359/152F and 2359/152F Δ L12/5F strains. The latter was a *uraA* mutant isolated from 2359/152F Δ lac12 as a spontaneous clone resistant to 5-fluoroorotic acid (5FOA). Transformation was performed according to the protocol of Kooistra *et al.* (2004). Correct targeting of the *URA3* module into the *HGT1* locus was verified by PCR on whole yeast cells and by Southern analysis. In this way, we deleted 70% of the *HGT1* ORF.

Table 1. List of yeast strains

Strains	Genotype	Origin
11D304	<i>MATα his lac12</i>	Riley <i>et al.</i> (1987)
11D304/5F	<i>MATα his uraA lac12</i>	This study
PM6-7A/35	<i>MATα adeT-600 uraA1-1 hisA5-1</i>	H. Fukuhara, Institut Curie Orsay
PM6-7A/35 Δ L12	<i>MATα adeT-600 uraA1-1 hisA5-1 lac12:URA3</i>	This study
2359/152F	<i>MATα metA1-1 ura3-20</i>	Ferminan & Dominguez (1998)
2359/152F Δ lac12	<i>MATα metA1-1 ura3-20 lac12:URA3</i>	Lodi <i>et al.</i> (2005)
2359/152F Δ L12/5F	<i>MATα metA1-1 ura3-20 lac12:ura3</i>	This study
2359/152F Δ H1	<i>MATα metA1-1 ura3-20 hgt1:URA3</i>	This study
2359/152F Δ H1L12	<i>MATα metA1-1 ura3-20 lac12:ura3 hgt1:URA3</i>	This study

Results

Phenotype of *lac12* mutation in different genetic backgrounds

Disruption of *LAC12* in wild-type laboratory strains (PM6-7A/35 and 2359/152F) led to a lactose-negative phenotype, which was not accompanied by a galactose-negative phenotype. The mutants were grown on YNB medium supplemented with either lactose or galactose at different concentrations (0.2, 0.5 and 1.0%). Their phenotype is shown in Fig. 1a. The 2359/152F Δ *lac12* disruptant grew well on galactose, but the 11D304 *lac12* mutant did not. In accordance with this, the 2359/152F Δ *lac12* disruptant showed active galactose transport (Fig. 1b), whereas strain 11D304 barely incorporated [14 C]galactose.

In order to determine the genetic basis of the difference in phenotypes between the *lac12* mutants, we crossed 11D304 (*lac12*) and 2359/152F Δ *lac12*. The diploids showed a galactose-positive phenotype, and their ascospore progeny segregated 2+ : 2- on 0.2% galactose (22 tetrads analysed). A cross between 11D304 (*lac12*) and the wild-type 2359/152F led to an ascospore progeny that did not show a tetrad segregation of 2+ : 2- for the growth on galactose, suggesting that more than one gene was required for the efficient growth on galactose. In particular, we obtained two parental ditypes (in which two spores grew well on galactose and two spores did not), three nonparental ditypes (in which the four spores displayed an intermediate phenotype) and 11 tetratype asci. In this last case, tetrad spores were one positive, one negative and two intermediate for growth on

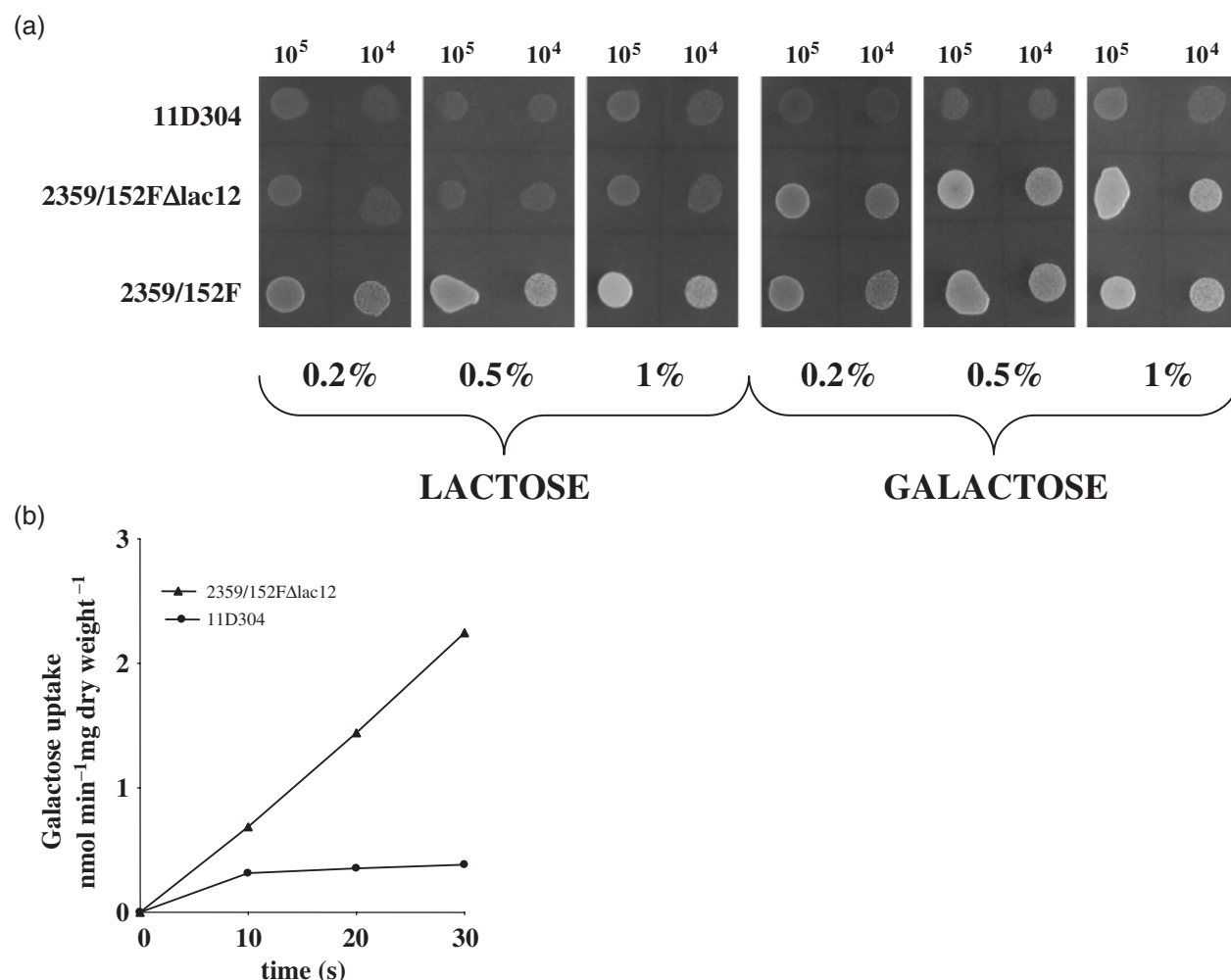


Fig. 1. Phenotype of *lac12* mutants. (a) Growth tests. The *lac12* mutants 11D304 (*lac12*) and 2359/152F Δ *lac12*, as well as the wild type 2359/152F, were spotted onto YNB agar plates supplemented with indicated carbon sources and incubated for 3 days at 30 °C. The number of plated cells is indicated at the top. (b) Galactose uptake in strains 11D304 (*lac12*) and 2359 Δ *lac12*. Cells were grown in YP medium supplemented with 2% galactose plus 0.1% glucose. Uptake of radiolabelled galactose was determined at a concentration of 5 mM. The values are means of three independent experiments. In no case was the variation higher than 15% of the mean.

galactose (data not shown). Therefore, it was concluded that the original *lac12* mutant 11D304 (Riley *et al.*, 1987), contained a second mutation, unlinked to *lac12*, responsible for the galactose-negative phenotype.

This interpretation was also supported by isolation of spontaneous galactose-positive revertants from 11D304. We plated 10^7 , 10^8 and 10^9 cells of 11D304 on 0.2% galactose YNB medium. After incubation for 72 h, we found seven galactose-positive colonies: two of them also grew on lactose, indicating that they were probably *LAC12* revertants; five clones were unable to grow on lactose, suggesting that they were reversions of the putative galactose-negative mutation of 11D304. A possible interpretation of the results is that in *K. lactis*, *LAC12* encodes the lactose/galactose permease, but an additional permease transports galactose. This permease is present in strains PM6-7A/35 and 2359/152F, but not in strain 11D304, due to a second mutation unnoticed in the pioneer work of Riley *et al.* (1987). The supposed galactose transporter is distinct from the recently

identified Kht3p (Wiedemuth & Breunig, 2005). This was shown by the following experiment. The original 11D304 *lac12* mutant was converted to *ura3* (11D304/5F, a 5FOA-resistant clone), and transformed with the *KHT3* gene carried by a centromeric *URA3* vector. None of the Ura-positive transformants recovered a galactose-positive phenotype. Moreover, disruption of *KHT3* in strain 2359/152F Δ *lac12* did not affect its growth on galactose (data not shown). Therefore *KHT3* does not encode the putative galactose permease inactive in the 11D304 strain.

Isolation of the galactose permease gene

Kluyveromyces lactis assimilates galactose following a metabolic scheme similar to that of *Saccharomyces cerevisiae*. We may expect *K. lactis* to possess an orthologue of the galactose permease gene *GAL2* of *S. cerevisiae* (Tschopp *et al.*, 1986). Indeed, *GAL2*, in single copy, could restore the galactose-positive phenotype in strain 11D304/5F (Fig. 2a). The

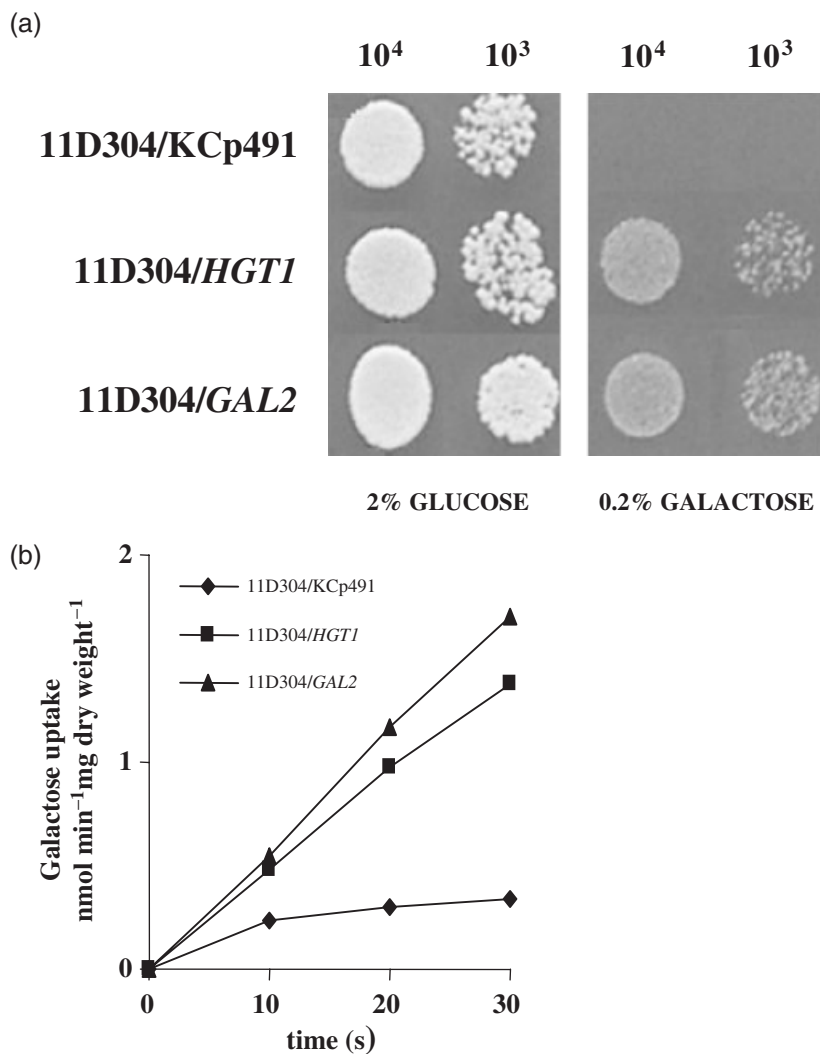


Fig. 2. Phenotype of strain 11D304 (*lac12*) transformed with *GAL2* or *HGT1*. The transforming genes were carried by the centromeric vector KCp491. The control was the vector without insert. (a) Growth test. Conditions were similar to those in Fig. 1a. (b) Galactose uptake. Conditions were similar to those in Fig. 1b.

supposed new galactose permease of *K. lactis* might be a *GAL2* equivalent. To identify such a gene, we tried to complement the galactose-negative phenotype of the *lac12* mutant (11D304/5F) with a genomic library constructed on the centromeric vector KCp491, carrying a *URA3* marker (Betina *et al.*, 2001). The DNA source of this library was the CBS2359 strain, which should contain the gene responsible for the galactose-positive phenotype of strain 2359/152F Δ lac12.

Among 400 000 *URA3* transformants, we found approximately 300 clones growing on 0.2% galactose YNB medium. To exclude transformants that received a *LAC12* gene, we replica-plated all galactose-positive clones on lactose. The majority were able to grow on this substrate, but 13 clones grew only on galactose. In eight of them the Ura-positive phenotype cosegregated with the galactose-positive phenotype. Seven of the eight clones contained identical inserts and one contained a rearranged version of the same insert. Terminus sequencing of the inserts revealed a sequence that is present upstream of the *HGT1* gene in the genome. *HGT1* encodes the high-affinity glucose transporter (Billard *et al.*, 1996). The insert, 8 kb long, also contained another ORF downstream of *HGT1*. This ORF was removed by subcloning *HGT1* as a 7.1-kb *Bgl*II–*Bgl*III fragment into the KCp491 centromeric vector. This monocopy plasmid (pEB34) was able to fully restore the growth on galactose of the 11D304/5F strain, as efficiently as *GAL2*, as shown in Fig. 2a. Moreover, the *HGT1* gene restored the galactose uptake activity in the 11D304/5F strain (Fig. 2b).

It has been found that some *K. lactis* strains do not possess *HGT1*. To find whether *HGT1* is nonfunctional or absent in the 11D304 strain, we PCR-amplified *HGT1* (a DNA region including the ORF and flanking regions) using 11D304 genomic DNA as template. We obtained an amplification band whose size and restriction pattern were identical to those of the published one, demonstrating that *HGT1* is present in the genome of the 11D304 strain (data not shown).

Phenotypic analysis of galactose transporter mutants

A null *hgt1* mutant and a double Δ *hgt1* Δ *lac12* mutant were constructed in the 2359/152F genetic background (see Materials and methods). The wild-type strain 2359/152F and the strain 2359/152F Δ lac12 were transformed by the linearized plasmid carrying the *HGT1* deletion cassette. Transformant colonies were screened for growth on 0.2% galactose. The growth of the single mutants Δ *hgt1* and Δ *lac12* and of the double mutant Δ *hgt1* Δ *lac12* was analysed on galactose over a concentration range of 0.05–2.0%. As shown in Fig. 3a, the double mutant grew poorly at all concentrations tested. The Δ *hgt1* mutant displayed reduced growth at low galactose concentration, and the Δ *lac12* mutant at high galactose concentration. In the Δ *hgt1*

mutant, the galactose uptake was severely affected, as in the double Δ *hgt1* Δ *lac12* mutant, suggesting a major role of Hgt1 permease in galactose transport in the experimental conditions tested (5 mM galactose) (Fig. 3b). Interestingly, the Δ *lac12* mutant had a much higher galactose uptake activity than the wild-type strain. This suggested that a loss of *LAC12* may induce *HGT1* expression at transcriptional or post-transductional level. We therefore examined *HGT1* transcription in a Δ *lac12* background. We observed increased intensity of the Northern signals for *HGT1* transcription (Fig. 3c). This explains, at least in part, the observed increase in galactose uptake of the Δ *lac12* mutant. The logic and the molecular basis of this regulation remain to be clarified.

Induction of *HGT1* expression by galactose

In the upstream region of *HGT1*, there are three sequence motifs that are similar to UAS_{GAL}, the putative binding sites of the Lac9p transcriptional factor (Godecke *et al.*, 1991) (Fig. 4a). The presence of these sequences and the *HGT1*-dependent galactose transport activity prompted us to analyse *HGT1* expression in galactose. The expression of *HGT1* has previously been studied in glucose and glycerol by Billard *et al.* (1996). These authors found that on these carbon sources, *HGT1* was constitutively expressed.

Hybridization of total RNA with an *HGT1* probe revealed two mRNA species, as previously shown by Billard *et al.* (1996). In the wild-type strain, both mRNA species were expressed on glucose and their level strongly increased on galactose (Fig. 4b). Addition of glucose did not affect the galactose induction.

Discussion

In this article, we demonstrated a new function of the glucose transporter gene *HGT1*: the function of a galactose transporter. Hgt1 is known to be a high-affinity glucose transporter, as shown by Billard *et al.* (1996). The sequence-deduced structure of the *HGT1* product was typical of a hydrophobic transmembrane protein, sharing approximately 25–30% identity with *S. cerevisiae* glucose permeases of the Hxt family, which includes the galactose carrier Gal2p, and with the low-affinity glucose carrier Rag1p of *K. lactis*. In the present work, we showed that Hgt1 permease plays a major role in galactose transport. This deduction was based on the following observations: (1) in the null *hgt1* mutant, the galactose uptake was strongly reduced; (2) the null *hgt1* mutant displayed reduced growth on galactose; (3) *HGT1* expression was highly induced by galactose.

Riley *et al.* (1987) have previously reported that, in *K. lactis*, galactose transport is mediated by the lactose permease encoded by *LAC12*, because *lac12* mutants (11D304 strain) displayed a reduced growth rate on galactose and reduced galactose uptake activity. We found that in other

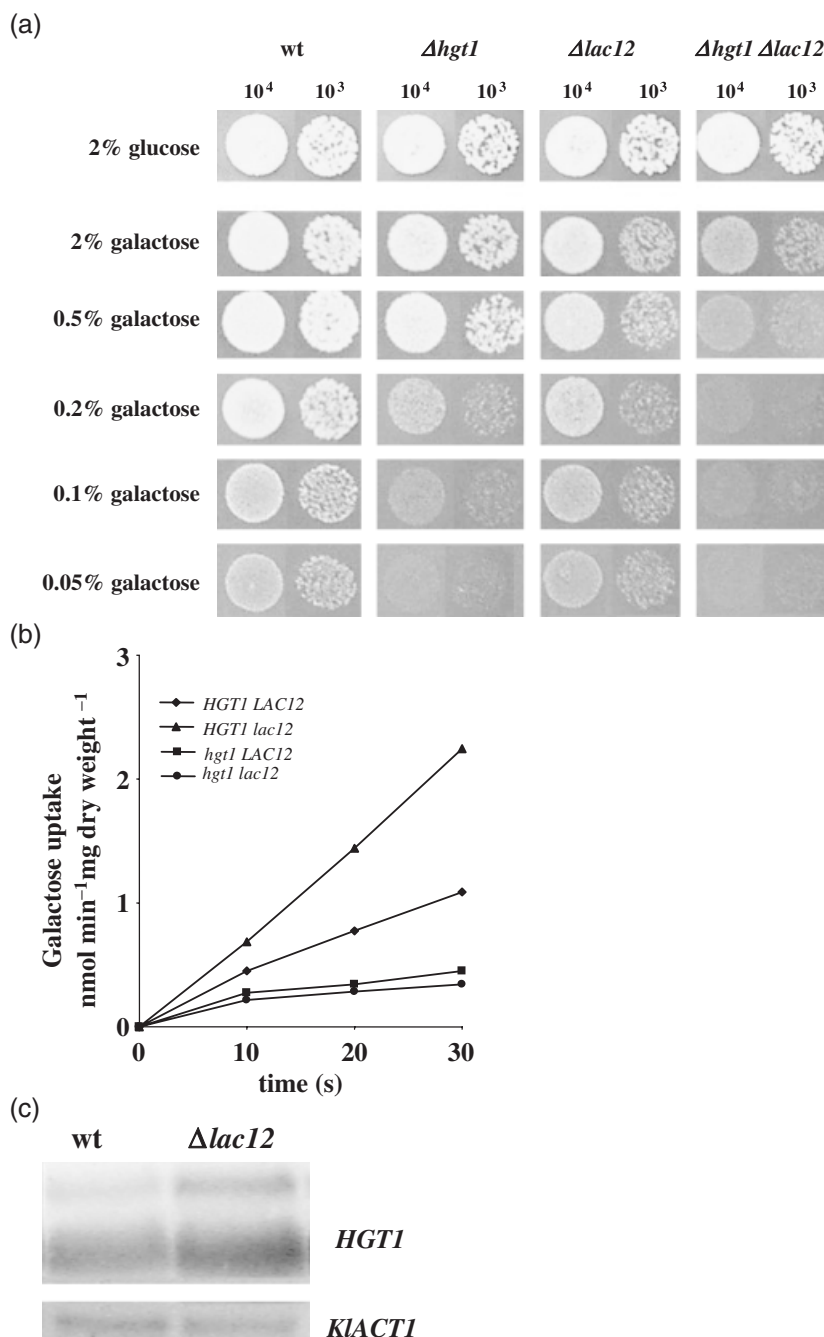


Fig. 3. Phenotype of $\Delta lac12$ and $\Delta hgt1$ mutants. We compared strains 2359/152F (wild type), 2359/152F $\Delta H1$ ($\Delta hgt1$) and 2359/152F $\Delta lac12$, and double mutant 2359/152F $\Delta H1 \Delta lac12$ ($\Delta hgt1$). (a) Growth test. Conditions were similar to those in Fig. 1a. (b) Galactose uptake. Conditions were similar to those in Fig. 1b. (c) Transcription of *HGT1* in 2359/152F (wild type) and 2359/152F $\Delta lac12$. Total RNA was prepared from cells grown on 2% galactose plus 0.1% glucose. Northern blot hybridization was carried out using probes of labelled *HGT1* and *KIACT1*. *KIACT1* was included as a reference because of its relatively constant level of transcription. Each lane contained 20 μ g of total RNA.

genetic backgrounds, the deletion of *LAC12* did not affect growth on galactose. However, our results do not exclude a role of Lac12p in galactose transport. In fact, among galactose-positive revertants that we isolated from the 11D304 strain, some displayed a lactose-positive phenotype, indicating that they were *LAC12* revertants. Also, in the transformation of the 11D304 strain by a *K. lactis* genomic library, the majority of galactose-positive transformants obtained were lactose-positive, suggesting that they contained *LAC12*. These results, together with the growth

phenotypes of the single and double deletion mutants in the two permeases, support the hypothesis that, in *K. lactis*, galactose uptake is mediated by two different permeases, and that in the 11D304 strain the two mutations in *lac12* and *hgt1* are responsible for the galactose-negative phenotype. The presence of two galactose permeases was originally hypothesized by Boze *et al.* (1987). On the basis of galactose uptake kinetics, they suggested that two galactose transport systems exist in the *K. lactis* strain CBS2359: a low-affinity system, inhibited by lactose, and a high-affinity

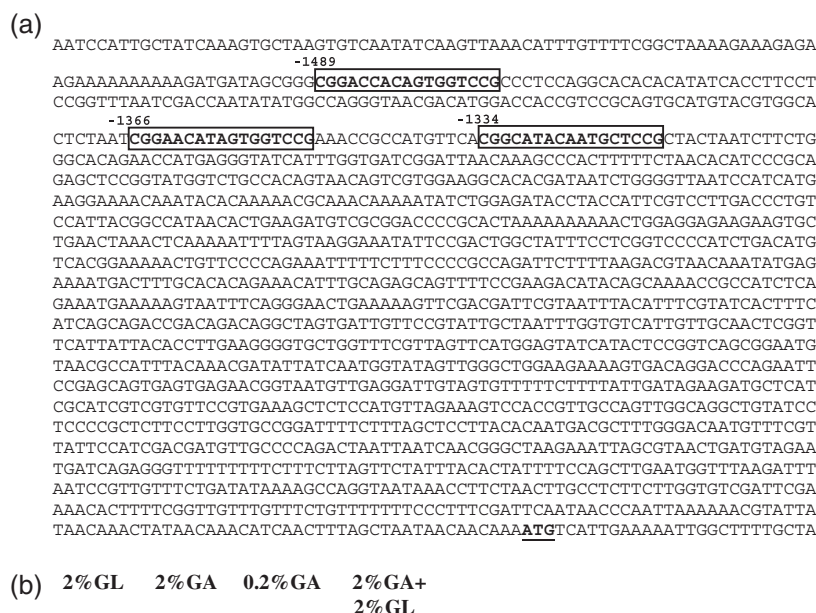


Fig. 4. (a) Nucleotide sequence of the upstream region of *HGT1*. Sequences that match with UAS_{GAL} are boxed. (b) Transcription of *HGT1*. Total RNA was prepared from strain 2359/152F, grown on 2% glucose, 2% galactose, 0.2% galactose, or 2% galactose plus 2% glucose. Northern blot hybridization was carried out as in Fig. 3c, using probes of labelled *HGT1* and *KIAC1*. Each lane contained 20 µg of total RNA. GL, glucose; GA, galactose.

system, competitively inhibited by glucose. Our results favour the hypothesis that Hgt1p mediates the high-affinity galactose transport and Lac12p the low-affinity transport. In fact, at low galactose concentration (the condition that we used in our galactose uptake experiments), the *hgt1LAC12* mutant displayed strongly reduced uptake, barely higher than that of the double mutant *hgt1lac12*. This suggests that Lac12p plays a minor role at this galactose concentration. Moreover, the growth test of single and double mutants showed that at high galactose concentration the *hgt1LAC12* mutant can grow better than the *HGT1lac12* mutant. At low galactose concentration, the presence of *HGT1* was crucial for efficient growth. However, it cannot be excluded that the growth pattern shown by the mutants could be ascribed to the specific induction of *LAC12* at high galactose concentration, irrespective of the affinity of the two permeases.

In the upstream region of *HGT1*, *c.* – 1400 with respect to the start codon, one finds three sequences that perfectly match the UAS_{GAL} present in several promoters of the lactose/galactose regulon. The UAS_{GAL} mediate binding of the transcriptional activator Lac9 in response to galactose (Godecke *et al.*, 1991). Consistent with the presence of these UAS_{GAL} , *HGT1* expression is strongly activated by galactose. Whether or not this induction actually involves Lac9p

binding is not known at this time. The galactose induction was not repressed by glucose, as is known for the other genes of the lactose/galactose regulon of *K. lactis* in the genetic background of the strains used here. *Kluyveromyces lactis* is generally less sensitive than *S. cerevisiae* to glucose repression. This is particularly so for the genes encoding respiratory enzymes, which are completely insensitive to glucose repression. Genes encoding the enzymes required for galactose catabolism are expressed at low levels on glucose, but reach high levels in the simultaneous presence of galactose and glucose, indicating that galactose induction is epistatic to glucose repression (Breunig, 1989; Goffrini *et al.*, 1995). Moreover, in contrast to *S. cerevisiae*, in which the induction of the *GAL1–GAL10* promoter takes many hours after a shift from a glucose to a galactose medium, the induction of the lactose/galactose regulon in *K. lactis* is rapid (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996). We propose that *HGT1* could be responsible for the rapid adaptation to galactose. In fact, in *S. cerevisiae* the galactose permease is completely absent when the organism is grown on glucose, and the galactose uptake is visible only after *GAL2* transcriptional activation. In contrast, *K. lactis* *HGT1* is expressed on glucose and the organism can efficiently take up galactose, even at low concentrations, because of the high affinity for galactose.

This adaptation mechanism might be related to the natural habitat of *K. lactis*. Many strains were originally isolated from milk-derived products, rich in galactose, due to hydrolysis of lactose by natural microbial communities, especially lactic acid bacteria.

Acknowledgements

We are grateful to Dr R. C. Dickson for providing the 11D304 strain. We thank Dr Hiroshi Fukuhara for stimulating discussion and critical reading of the manuscript. We thank Roberto Silva for skilful technical assistance.

References

- Altshul SE, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- André B (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 1575–1611.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.
- Betina S, Goffrini P, Ferrero I & Wésolowski-Louvel M (2001) *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **158**: 541–548.
- Bianchi MM, Falcone C, Chen XJ, Wésolowski-Louvel M, Frontali L & Fukuhara H (1987) Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6- μ m circular plasmid pKD1. *Curr Genet* **12**: 185–192.
- Billard P, Ménart S, Blaisonneau J, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H & Wésolowski-Louvel M (1996) Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J Bacteriol* **178**: 5860–5866.
- Bisson LF & Fraenkel DG (1983) Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 1730–1734.
- Boze H, Moulin G & Galzy P (1987) Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*: biochemical characteristics and attempted genetical analysis. *J Gen Microbiol* **133**: 15–23.
- Breunig KD (1989) Glucose repression of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator *LAC9*. *Mol Gen Genet* **216**: 422–427.
- De Hertogh B, Carvajal E, Talla E, Dujon B, Baret P & Goffeau A (2002) Phylogenetic classification of transporters and other membrane proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Funct Integr Genomics* **2**: 154–170.
- Deshler JO, Larson GP & Rossi JJ (1989) *Kluyveromyces lactis* maintains *Saccharomyces cerevisiae* intron-encoded splicing signals. *Mol Cell Biol* **9**: 2208–2213.
- Diezemann A. & Boles E. (2003) Functional characterization of the Frt1 sugar transporter and of fructose uptake in *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* **43**: 281–288.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrrens P, Casaregola S, et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35–44.
- Ferminan E & Dominguez A (1998) Heterologous protein secretion directed by a repressible acid phosphatase system of *Kluyveromyces lactis*: characterization of upstream region-activating sequences in the *KIPHO5* gene. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2403–2408.
- Gödecke A, Zachariae W, Arvanitidis A & Breunig KD (1991) Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucleic Acids Res* **19**: 5351–5358.
- Goffrini P, Ficarelli A & Ferrero I (1995) Hexokinase activity is affected in mutants of *Kluyveromyces lactis* resistant to glucose repression. *Microbiology* **141**: 441–447.
- Goffrini P, Wésolowski-Louvel M, Ferrero I & Fukuhara H (1990) *RAG1* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a sugar transporter. *Nucleic Acids Res* **18**: 5294.
- Kooistra R, Hooykaas PJJ & Steensma HY (2004) Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **21**: 781–792.
- Lodi T & Donnini C (2005) Lactose-induced cell death of β -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **5**: 727–734.
- Mandel JK & Higa S (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159–162.
- Riley MI, Sreekrishna K, Bhairi S & Dickson RC (1987) Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol Gen Genet* **208**: 145–151.
- Sambrook J & Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sherman F, Fink GR & Hicks JB (1986) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Tschopp JF, Emr SD, Field C & Schekman R (1986) *GAL2* codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **166**: 313–318.
- Weirich J, Goffrini P, Kuger P, Ferrero I & Breunig KD (1997) Influence of mutations in hexose-transporter genes on glucose repression in *Kluyveromyces lactis*. *Eur J Biochem* **249**: 248–257.
- Wésolowski M, Algeri AA, Goffrini P & Fukuhara H (1982) Killer DNA plasmids of the yeast *Kluyveromyces lactis* I. Mutations affecting the killer phenotype. *Curr Genet* **5**: 191–197.
- Wésolowski-Louvel M, Breunig KD & Fukuhara H (1996) *Kluyveromyces lactis*. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology* (Wolf K, ed), pp 139–201. Springer-Verlag, Berlin.
- Wésolowski-Louvel M, Goffrini P, Ferrero I & Fukuhara H (1992) Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis* I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. *Mol Gen Genet* **233**: 89–96.
- Wiedemuth C & Breunig KD (2005) Role of Snf1 in regulation of intracellular sorting of the lactose and galactose transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* **4**: 716–721.

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata da

- Fondazione Telethon, progetti GGP030039 e GGP07019
- Fondazione Pierfranco e Luisa Mariani
- Consorzio EUMITOCOMBAT, contratto LSHM-CT-2004-503116
- Fondo nazionale belga per la ricerca scientifica
- Politica scientifica belga
- Associazione francese contro le miopatie
- MIUR, progetto di ricerca nazionale (PRIN) 2006 2006069034_003

Un profondo ringraziamento va alle mie docenti guida, Prof.ssa Iliana Ferrero Fortunati e Prof.ssa Tiziana Lodi, per i suggerimenti e le proficue discussioni avute durante tutto il mio periodo di ricerca.

Ringrazio particolarmente la Prof.ssa Françoise Foury per avermi ospitato per un anno nel dipartimento FYSA dell'Università cattolica di Louvain, sede di Louvain-la-Neuve (Belgio).

Ringrazio il coordinatore del corso Prof. Nelson Marmioli.

Ringrazio Antonietta Cirasolo e Roberto Silva per il supporto tecnico, e tutto il personale, strutturato e non strutturato, del Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia ed Evoluzione. Un particolare ringraziamento alla Dott.ssa Cristina Dallabona per l'aiuto sperimentale.

Ringrazio infine:

- il Prof. Massimo Zeviani e il Dott. Pugliesi per le stimolanti discussioni
- il Prof. Rodney Rothstein per il ceppo YG855 e per il plasmide pWJ841
- il Prof. Duccio Cavalieri, il Prof. Mario Polsinelli e la Prof.ssa Marilena Budroni per i ceppi enologici.