

Università degli Studi di Napoli  
“Federico II”

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA AVANZATA  
XVIII CICLO

*ANALISI FUNZIONALE IN MAMMIFERI ED IN *Caenorhabditis elegans* DELL'ENZIMA  
[*N*-TRIMETIL-LISINA IDROSSILASI, UNA PROTEINA IMPLICATA NELLA  
BIOSINTESI DELLA CARNITINA.*

Coordinatore  
Prof.essa Silvana Filosa

Tutore  
Prof.essa Ermelinda Limatola

Candidato  
Dott.essa Monfregola Jlenia

Co-Tutore  
Dott.essa MatildeValeria Ursini

# The Power of Carnitine:

by Robert Crayhon, M.S. & Julie Kreloff, R.D.

What if there were one nutrient which could help you lose weight, increase energy, lower cholesterol, and promote heart health? Carnitine does all that and more. Carnitine offers all these benefits by promoting fat burning. Carnitine is the only nutrient that can transport fat to the part of the cell that burns it off: the mitochondria. If you can't get fat into the mitochondria, you can't burn it. So without carnitine, no fat burning can occur.



## **INTRODUZIONE**

## 1) La carnitina

### 1.1) Biochimica della carnitina

#### Il trasporto degli acidi grassi

La carnitina è la molecola deputata al trasporto degli acidi grassi a catena lunga dal citoplasma cellulare alla matrice mitocondriale. Questo trasporto è essenziale per il metabolismo energetico della cellula in quanto è nella matrice mitocondriale che gli acidi grassi vengono  $\beta$ -ossidati.

Gli acidi grassi costituiscono una delle principali fonti di energia per gli organi periferici di un organismo. Queste molecole, per essere utilizzate dalla cellula devono passare dal citoplasma all'interno del mitocondrio, organello in cui avviene la loro ossidazione. Tuttavia esse non possono transitare passivamente attraverso le due membrane mitocondriali, ma devono subire una reazione ATP-dipendente che porta alla formazione di un legame tioestere tra il gruppo carbossilico dell'acido grasso ed il gruppo tiolico del CoA, formando così acil-CoA. Questo processo di "attivazione" è catalizzato da una famiglia di almeno tre Acil-CoA sintetasi dette *tiochinasi*, che differiscono per la specificità verso la lunghezza della catena. Questi enzimi, localizzati sulla membrana del reticolo endoplasmatico e sulla membrana mitocondriale esterna catalizzano tutti la reazione



L'acil-CoA ottenuto non può comunque attraversare la membrana mitocondriale interna. Il gruppo acilico deve essere infatti trasferito alla **carnitina**.

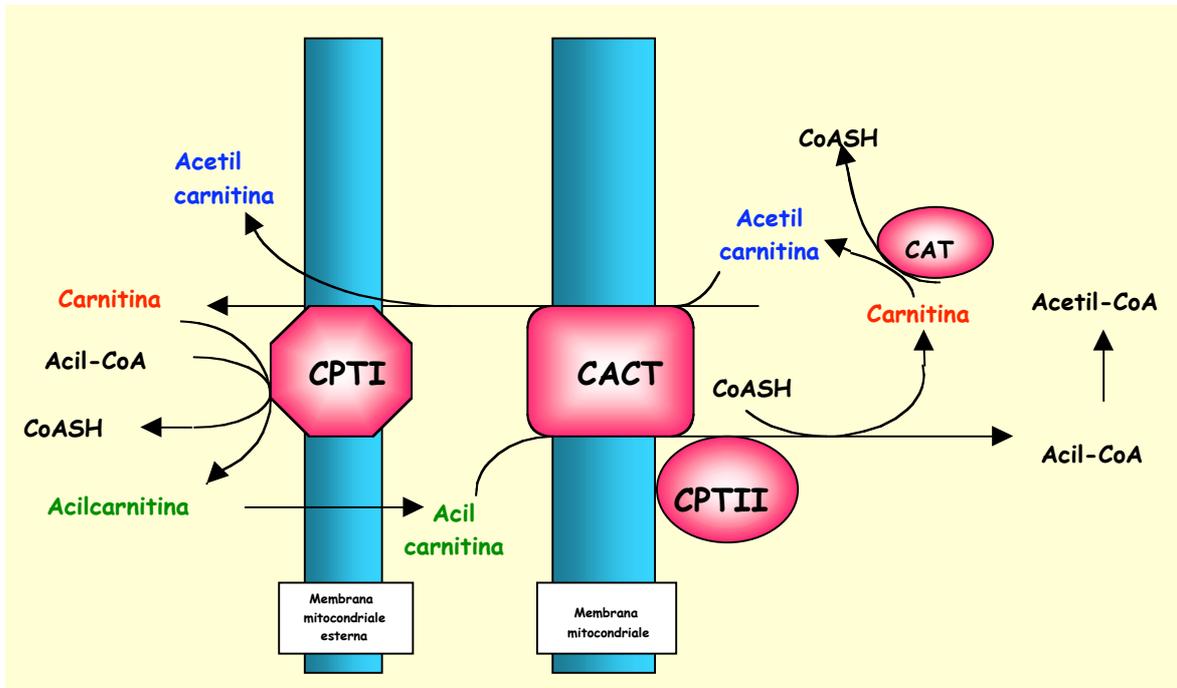
La trans-esterificazione della carnitina in acil-carnitina avviene ad opera dell'enzima *Carnitina-palmitoil transferasi I* (CPTI), localizzato sulla membrana mitocondriale esterna.

L'acil-carnitina esterificata può essere trasportata nel mitocondrio attraverso una specifica proteina trasportatrice: la *Carnitina-acetilcarnitina traslocasi* (CACT). Sulla membrana interna del mitocondrio è inoltre localizzato l'enzima *Carnitina-palmitoil transferasi II* (CPTII), che catalizza la reazione di transesterificazione degli acidi grassi con CoA mitocondriale, rilasciando carnitina libera.

A questo punto l'acil-CoA può andare incontro a successive reazioni enzimatiche che costituiscono il processo noto come  $\beta$ -ossidazione.

La carnitina intanto può:

- 1) essere trasportata di nuovo, tramite CACT, nel citoplasma, dove potrà essere riutilizzata;
- 2) subire una reazione di acetilazione catalizzata dalla *carnitina-acetil transferasi* (CAT) che utilizza come substrati carnitina libera e acetil-CoA derivante dalla  $\beta$ -ossidazione ed essere, in questo modo, trasportata nel citoplasma tramite CACT (**Figura 1**).



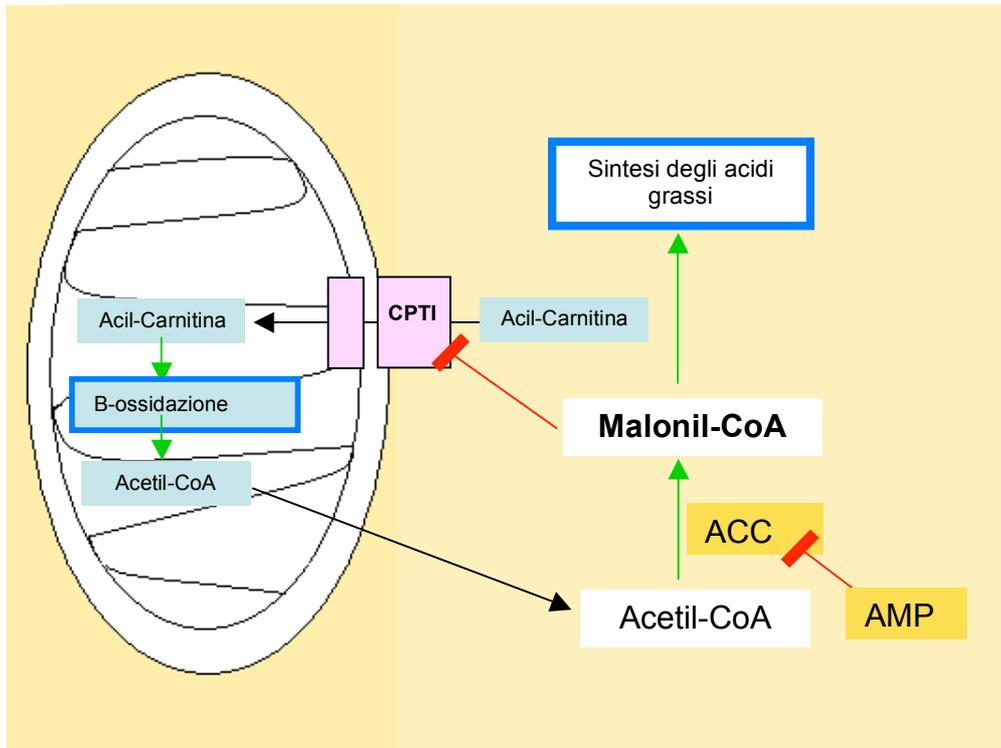
**Figura 1:** Funzione della carnitina nel trasporto degli acidi grassi attraverso le membrane mitocondriali.

Il trasporto degli acidi grassi mediato dalla carnitina è un processo finemente regolato e dipende dallo stato fisiologico in cui si trova l'organismo, infatti, a seconda della richiesta energetica della cellula, gli acidi grassi possono essere trasportati nei mitocondri per essere metabolizzati o essere immagazzinati nel citoplasma come trigliceridi. Questo processo è regolato principalmente dal malonil-CoA, un acido grasso che è generato dall'acetil-CoA carbossilasi (ACC)(Steiber A. et al, 2004).

Il malonil-CoA inibisce il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri inibendo la reazione catalizzata da CPT1( Mynatt et al. 1994).

A seconda quindi, dei diversi stati fisiologici in cui si trova l'organismo, quali possono essere digiuno, deficienza di insulina, ipo ed ipertiroidismo, variano le concentrazioni di malonil-CoA e di conseguenza l'attività di CPT1(Steiber A. et al, 2004). In condizioni di bisogno energetico viene attivata l' AMP chinasi (AMPK) che fosforila l'ACC, inattivandola, L'ACC fosforilata non è più in grado di sintetizzare il malonil-CoA (Zhiyuan Hu et al, 2005), che a

sua volta a basse concentrazioni non inibisce CPT1 spostando l'equilibrio verso l'ossidazione degli acidi grassi e non verso la loro sintesi.



**Figura 2:** Meccanismo di regolazione del trasporto dell'acil-carnitina mediato dal Malonil-CoA.

### Biosintesi della carnitina

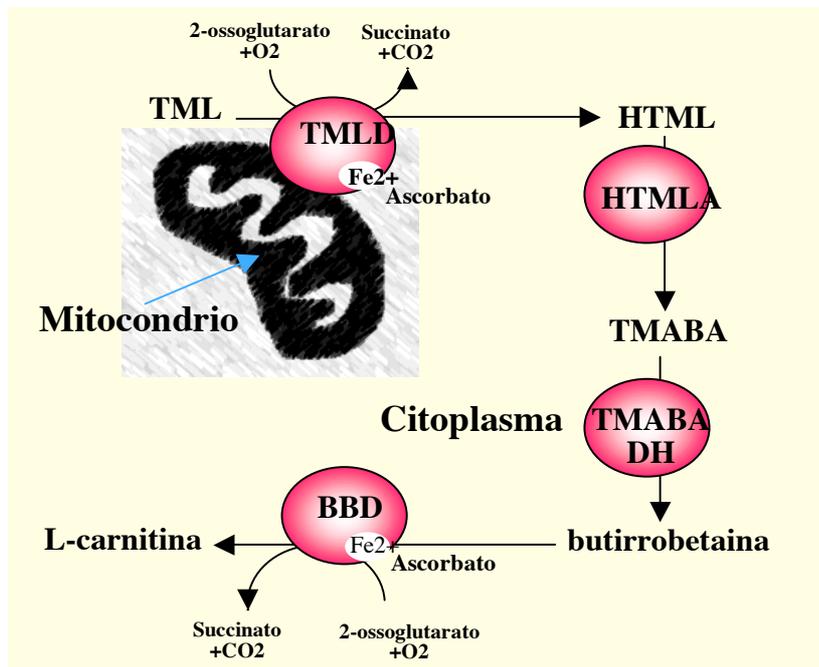
La principale fonte di carnitina per un organismo è la dieta, ma numerosi organismi sono anche in grado di sintetizzarla in maniera endogena.

In questi organismi la sintesi di carnitina avviene a partire dagli amminoacidi lisina e metionina; la lisina, infatti, provvede allo scheletro di carbonio di questa molecola, mentre il gruppo 4-N-metile è formato dalla metionina. In particolare, nei mammiferi le proteine contengono residui di N<sup>6</sup>-trimetil-lisina; l'N-metilazione di questi residui di lisina è un evento post-traduzionale che avviene a carico di proteine come la calmodulina, la miosina, l'actina, il citocromo c e gli istoni. Questa reazione è catalizzata da specifiche metiltransferasi che hanno, come substrato donatore di metili, l'S-adenosilmetionina. L'idrolisi lisosomale di queste proteine porta al rilascio di trimetil-lisina (TML) che è il primo metabolita implicato nella biosintesi della carnitina.

- La prima reazione della biosintesi è l'idrossilazione della TML in posizione tre, ed è catalizzata da un enzima mitocondriale la 3-trimetil-lisina diossigenasi (TMLD). Il prodotto di questa reazione è la 3-idrossitrimetil-lisina (HTML).

- La scissione aldolica della HTML, porta alla liberazione di 4-trimetilamminobutiraldeide (TMABA) e glicina, una reazione catalizzata dalla HTML aldolasi (HTMLA).
- La deidrogenazione del TMABA, catalizzata dalla TMABA deidrogenasi, ha come prodotto il 4-N-trimetilamminobutirrato (butirrobetaina).

L'ultima reazione è, ancora una volta, una reazione di idrossilazione catalizzata dalla - butirro-betaina diossigenasi (BBD), che trasforma la butirrobetaina in carnitina.



**Figura 3:** Via biosintetica della carnitina.

Tappa limitante della biosintesi di carnitina è quella catalizzata dal primo enzima della biosintesi, TMLD, è stato dimostrato infatti che un eccesso di trimetil-lisina, il substrato di questo enzima, porta ad un incremento di otto volte di biosintesi di carnitina (Rebouche et al.1989).

Poco, invece, si conosce sulla genetica degli enzimi implicati in questa via, sono stati infatti isolati solo i tre geni codificanti per l'ultimo, il terzo ed il primo enzima della biosintesi, mentre rimane ancora sconosciuto il gene che codifica per il secondo enzima di questa via biosintetica, inoltre non sono note malattie attribuibili a mutazioni in questi geni, ne sono stati effettuati studi con animali modello in cui questi enzimi sono difettivi.

Nell'uomo si conosce la distribuzione degli enzimi implicati nella biosintesi della carnitina. E' stato visto, infatti, che l'attività della TLMD è molto alta nel rene e presente nel fegato, cuore, muscolo e cervello. L'attività della HTMLA è stata riscontrata soprattutto nel fegato. Il tasso di ossidazione della TMBA è alto nel fegato, con una sostenuta attività anche nel rene, ed una bassa attività nel cervello, cuore e muscolo.

Questi risultati dimostrano che tutti i tessuti investigati hanno la capacità di trasformare la TML in butirrobetaina, ma solo il fegato, il rene ed il cervello sono capaci di convertire la butirrobetaina in carnitina; poiché però la carnitina deve essere presente in tutti quei tessuti nei quali la  $\beta$ -ossidazione è la maggiore fonte di energia esiste un meccanismo di trasporto della carnitina dal circolo sanguineo ai diversi organi.

### Trasporto della carnitina

Alcuni tessuti, quali: cuore, muscolo, rene e fegato sono altamente dipendenti dall'energia generata dalla  $\beta$ -ossidazione, è dunque necessario che a tali tessuti arrivi una sufficiente quantità di carnitina per il trasporto degli acidi grassi nel mitocondrio.

Poiché la concentrazione di carnitina nei tessuti è 20-50 volte più alta che nel plasma (Bremer et al.,1983), e nell'uomo solo il fegato, il rene ed il cervello possiedono l'intera gamma di enzimi per la sua sintesi, più tessuti dipendono dall'assorbimento della carnitina dal sangue, attraverso un trasporto attivo. La principale proteina deputata al trasporto di carnitina è OCTN2, codificata dal gene *SLC22A5*. OCTN2 fa parte della famiglia dei trasportatori cationici e nel caso del trasporto di carnitina utilizza un meccanismo di trasporto  $\text{Na}^+$  dipendente. Il gene *SLC22A5* è ampiamente espresso in tessuti umani tra cui: cuore, muscolo scheletrico, rene, intestino e placenta (Tamai et al., 2001).

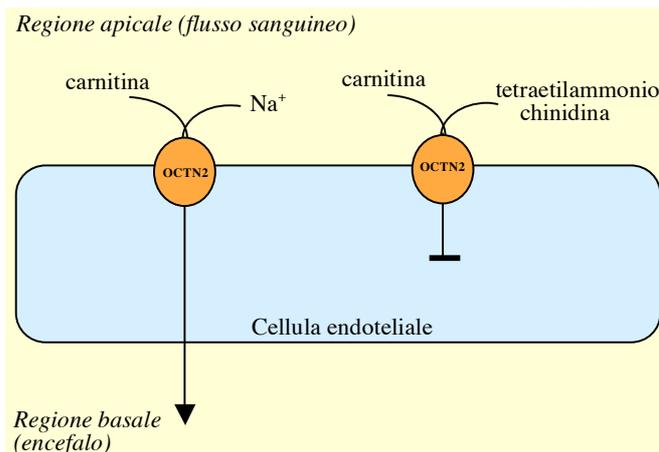
Recentemente sono stati identificati anche altri trasportatori che sembrano implicati nel trasporto della carnitina quali OCTN3, il cui gene è paralogo di *OCTN2* (Yabuuchi et al. 1999) ed  $\text{ATB}^{0,+}$  (Nakanischi et al. 2001). Sia  $\text{ATB}^{0,+}$  che OCTN3 presentano però una minore affinità per la carnitina in tessuti come il cervello e il fegato.

Nella tabella seguente sono elencati i più noti trasportatori per la carnitina, i valori di  $K_m$  che indicano la diversa affinità per questa molecola e il loro profilo di espressione.

| Trasportatore      | $K_m$             | Profilo d'espressione  |
|--------------------|-------------------|--|
| OCTN2              | 412 $\mu\text{M}$ | Intestino, rene, fegato, testicolo, epididimo, cuore, muscolo scheletrico      |
| OCTN3              | 26 $\mu\text{M}$  | Intestino, muscolo scheletrico, placenta, rene, testicolo                      |
| $\text{ATB}^{0,+}$ | 83 $\mu\text{M}$  | Intestino, Polmone, ghiandole mammaria, ghiandola salivare, ippocampo, trachea |

Il meccanismo di trasporto della carnitina rimane tuttavia ancora da chiarire, molte sono le proteine identificate con un'affinità per questo metabolita, ma che sembrano essere in grado di legare anche altre sostanze, è il caso ad esempio di OCTN1, che solo recentemente è stato dimostrato legare con una bassa affinità la carnitina e con una elevata Km l'ergotioneina un antiossidante assorbito con la dieta (Grundemann D et al. 2005). Un altro trasportatore chiamato CT2 sembra invece avere una elevata affinità per la carnitina ma essere espresso solo nell'epitelio del'epididimo (Enomoto et al.2002).

Poiché la carnitina ed i suoi esteri sono, da anni utilizzati in trattamenti farmacologici di malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, molti studi sono stati effettuati allo scopo di chiarire il meccanismo di trasporto di questo metabolita nel cervello. L'accumulazione di qualsiasi sostanza nel cervello dipende dalla selettività della barriera ematoencefalica, selettività dovuta all'espressione di geni che codificano per trasportatori specifici. Esperimenti di RT-PCR hanno dimostrato che *OCTN2* è espresso in cellule endoteliali immortalizzate di cervello (Kido et al. 2001), inoltre il passaggio di carnitina attraverso le membrane apicali in queste cellule è inibita dall'assenza di ioni Na e dalla presenza di chinino e tetraetilammonio, noti inibitori di OCTN2. Esperimenti condotti in topi con mutazioni in omozigosi in *octn2* dimostrano che nei mutanti l'accumulo di carnitina cervello è molto minore rispetto ad i topi selvatici (Koizumi et al.,1988), è stato quindi ipotizzato un meccanismo di trasporto della carnitina attraverso le membrane apicali delle cellule endoteliali del cervello mediato da *OCTN2*.



**Figura 4:**meccanismo di trasporto della carnitina attraverso la barriera ematoencefalica

### 1.2) Carnitina e nutrizione.

La fonte principale di carnitina per un organismo è la dieta; nei mammiferi ad esempio il 75% della carnitina presente nel plasma deriva da quest'ultima. Gli alimenti con alto contenuto

proteico come carne e fegato di manzo sono quelli con il più alto contenuto di carnitina, mentre il latte di mucca e alcuni prodotti cerealicoli, come grano e riso, danno solo un discreto apporto di questo metabolita, in tabella 1 sono riportati i valori di carnitina contenuti dai vari alimenti.

| Food item  | Total carnitine/100 g food ( $\mu\text{mol}$ ) | Reference                                       |
|--|--|---|
| <i>Animal products:</i>                                  |  |   |
| Steak, prepared  | 525  | Rudman et al. (1977)                            |
| Beef (tenderloin, shoulder, rump), raw                   | 3691.4–4160.5                                  | Erfele et al. (1970)                            |
| Ground Beef, prepared                                    | 300  | Rudman et al. (1977)                            |
| Beef liver, raw  | 160.4  | Erfele et al. (1970)                            |
| Chicken, prepared  | 60   | Rudman et al. (1977)                            |
| Egg, chicken, prepared                                   | 5  | Rudman et al. (1977)                            |
| <i>Grain products (dry, unless otherwise specified):</i> |  |   |
| Cornflakes   | 59   | Rudman et al. (1977)                            |
| Grits  | 51   | Rudman et al. (1977)                            |
| Rice   | 44   | Rudman et al. (1977)                            |
| Bread  | 10.9   | Rudman et al. (1977)                            |
| Graham Crackers  | 5  | Rudman et al. (1977)                            |
| Oat seedling (80–90 hour)                                | 8.64   | Panter and Mudd (1969)                          |
| Wheat germ   | 7.41   | Panter and Mudd (1969)                          |
| Wheat seed   | 2.47   | Panter and Mudd (1969)                          |
| Oat seed   | 0.62   | Panter and Mudd (1969)                          |
| Barley seed  | 0  | Panter and Mudd (1969)                          |
| <i>Fruit:</i>  |  |   |
| Applesauce   | 19.5   | Rudman et al. (1977)                            |
| Pears  | 17   | Rudman et al. (1977)                            |
| Orange juice   | 11   | Rudman et al. (1977)                            |
| Peaches  | 10   | Rudman et al. (1977)                            |
| Apple juice  | 8  | Rudman et al. (1977)                            |
| Pineapple  | 6.5  | Rudman et al. (1977)                            |
| <i>Vegetables:</i>                                       |  |   |
| Tomatoes   | 18   | Rudman et al. (1977)                            |
| Cauliflower  | 8.64   | Panter and Mudd (1969)                          |
| Asparagus  | 8  | Rudman et al. (1977)                            |
| Peas   | 7.2  | Rudman et al. (1977)                            |
| Green beans  | 5  | Rudman et al. (1977)                            |
| Avocado  | 4.94   | Panter and Mudd (1969)                          |
| Spinach leaf, cabbage head leaf, carrot, potato          | 0  | Rudman et al. (1977) and Panter and Mudd (1969) |
| <i>Legumes:</i>  |  |   |
| Peanut seed (minus seed coat)                            | 0.62   | Panter and Mudd (1969)                          |
| <i>Dairy:</i>  |  |   |
| Milk, cow ( $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ )               | 16.4   | Rudman et al. (1977)                            |
| Milk, cow ( $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ )              | 259.8 <sup>a</sup>                             | Ferreira (2003)                                 |
| Milk, human  | 50.0 <sup>a</sup>                              | Ferreira (2003)                                 |

Un uomo onnivoro ingerisce circa 2-12  $\mu\text{mol}$  di carnitina: una quantità notevolmente maggiore rispetto a quella ottenuta con la biosintesi endogena che riesce a coprire solo il 25% del fabbisogno corporeo. La qualità della dieta influenza notevolmente il contenuto di carnitina nel corpo è stato, infatti, osservato che individui con un apporto basso di proteine di origine animale, come i vegetariani o popolazioni con una dieta a base essenzialmente di cereali, hanno una concentrazione di carnitina nel plasma più bassa rispetto a soggetti che

includono nella propria dieta proteine animali. La carnitina è riassorbita efficacemente dal rene e la secrezione urinaria è largamente dipendente dalla dieta. Il regime alimentare seguito influenza anche la biosintesi della molecola in quanto micronutrienti come vitamina C, ferro, piridossina e niacina sono necessari per il suo anabolismo. La concentrazione di carnitina nell'uomo è influenzata dall'età e dal sesso: durante il primo anno di vita aumenta (da 15 a 40  $\mu$ M) e rimane la stessa per entrambi i sessi fino alla pubertà. Durante l'adolescenza e fino all'età adulta la concentrazione della carnitina plasmatica subisce un incremento nei maschi e si stabilizza a livelli significativamente più alti che nelle femmine (50  $\mu$ M contro 40  $\mu$ M): questo suggerisce che gli ormoni sessuali hanno un ruolo nella regolazione della concentrazione della molecola.

### ***1.3) Carnitina elisir di lunga vita.***

Il ruolo svolto dalla carnitina quale trasportatore di acidi grassi attivati dal citoplasma alla matrice mitocondriale è quello più conosciuto e meglio caratterizzato. Questa molecola, però, è anche implicata in una serie di funzioni che ne fanno un buon candidato per terapie farmacologiche in diverse patologie umane.

Tra gli effetti pleiotropici attribuibili alla carnitina, quello forse di rilevanza maggiore è il suo effetto neuroprotettivo. È stato visto, infatti, che la carnitina circolante nell'organismo si trova prevalentemente nella sua forma libera e tende ad accumularsi nel cervello (Bresolin et al. 1982) (Shug et al. 1982) poiché è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (Mroczkowska et al. 1997). La somministrazione di carnitina o dei suoi derivati acilici a catena corta a pazienti con demenza senile o affetti di Alzheimer rallenta il deteriorarsi delle capacità cognitive (Bonavita et al. 1986) (Spagnoli et al. 1991).

Si ritiene che gli effetti benefici della terapia a base di carnitina siano dovuti al suo effetto stimolatorio sulla sintesi di acetilcolina (Dolezal et al. 1981) (Wawrzencyk et al. 1994) (Wawrzencyk et al. 2001), dovuto all'aumento del trasporto di gruppi acetilici dai mitocondri al citosol (Kaminska et al. 1993) (Kaminska et al. 1995).

Inoltre, si è osservato che la somministrazione di carnitina a cellule neurali ne influenza il differenziamento. In particolare, la carnitina promuove l'espressione ed il trasferimento alle membrane della proteina B-50 (chiamata anche GAP-43 o neuromodulina) (Mizgalska et al. 1998), nota per essere coinvolta nello sviluppo neuronale, nella neurogenesi, nella neuroplasticità e nella neurotrasmissione (Liu et al. 2005).

Recentemente è stato anche dimostrato che la carnitina è in grado di prevenire l'effetto neurotossico del glutammato (Liansola M. and Felipo V. 2002), oltre ad avere in generale un

effetto anti-apoptotico nelle cellule muscolari di topo (Vescovo et al.; 2002), nei cardiomiociti (Andrieu-Abadie N.; 1999) e nelle cellule di teratoma P19 (Pisano et al., 2003).

Inoltre, la carnitina riduce gli effetti negativi della doxorubicina e cisplatina, due chemioterapici ben descritti (Andrieu-Abadie, 1999; Pisano et al., 2003).

Infine dati recenti hanno mostrato un chiaro ruolo protettivo della carnitina contro l'effetto genotossico causato da radicali ossigenati in cellule di criceto (Santoro et al. 2005).

Recenti dati dimostrano anche che la carnitina è un antagonista dell'azione di due ormoni tiroidei quali T3 (tirodotironina) e T4 (tiroxina), la carnitina infatti sembra inibire la traslocazione nel nucleo di questi due ormoni impedendone l'azione, e quindi somministrata oralmente reverte i sintomi dell'ipertiroidismo (Benvenga S. et al, 2004).

Ad alte dosi la carnitina mima alcune delle attività biologiche dei glucocorticoidi, in particolare quelle implicate nell'immunomodulazione. La carnitina infatti riduce l'affinità dei glucocorticoidi al loro recettore, sopprime il TNF $\alpha$  e consente il rilascio di IL-12, quindi questa molecola, usata in dosi farmacologiche, può essere utilizzata in terapie simili a quelle in cui sono implicati i glucocorticoidi (Alesci et al., 2004).

#### ***1.4) Malattie genetiche e carnitina***

Sono note malattie imputabili a mutazioni che cadono nei geni che codificano per le proteine coinvolte nel trasporto della carnitina, la più nota è certamente la deficienza sistemica primaria di Carnitina (CDPS), una malattia autosomica recessiva che mappa sul braccio lungo del cromosoma 5 (Shoji et al. 1998). Il gene causativo di questa malattia è *OCTN2*, i sintomi clinici includono: cardiomiopatia, un progressivo indebolimento muscolare ed ipoglicemia. La maggior parte delle mutazioni trovate in *OCTN2* danno come risultato proteine tronche, che causano una diminuzione del trasporto di carnitina (Wang et al. 1999).

Diverse patologie sono invece legate a mutazioni dei geni che codificano per *CPTI* e *CPTII*.

I geni *CPT I-A* (espresso nel fegato), *CPT I-B* (espresso nel tessuto muscolare), *CPT I-C* (espresso nel cervello) e *CPT II* (ubiquitario) sono stati recentemente localizzati rispettivamente sui cromosomi 11q13.1-q13.5, 22q13.31-q13.32, 19q13.33 e 1p32.

In soggetti che presentano una mutazione a carico di *CPTIA*, il quadro clinico prevede epatomegalia con un aumento degli enzimi epatici e dell'ammoniaca nel fegato ed un aumento della creatin chinasi nel siero (Tein et al. 1989).

Non sono, invece, mai stati riportati casi di mutazioni a carico di *CPT I-B* e data l'importanza di questo enzima per la funzione cardiaca si ritiene che mutazioni in questo gene siano incompatibili con la vita.

Nei soggetti con mutazioni nel gene *CPT II* si manifesta soprattutto una sintomatologia muscolare che consiste in ricorrenti attacchi di mialgia, irrigidimento o debolezza muscolare (Hurvitz et al. 2000). I primi sintomi si manifestano tra i 6 e i 20 anni d'età, e si aggravano con l'esercizio fisico, digiuno e da un'abbondante assunzione di grassi.

La carnitina-acilcarnitina traslocasi (*CACT*) gioca un ruolo essenziale nel ciclo della carnitina. Il gene *CACT* si trova sul cromosoma 3p21.31. Gli aspetti clinici predominanti in pazienti affetti da mutazioni del gene *CACT* sono disfunzioni neurologiche, cardiomiopatie e danni ai muscoli scheletrici e al cuore, inoltre soggetti colpiti da queste mutazione presentano segni clinici fin dal periodo neonatale, in quanto gli acidi grassi rappresentano una fonte di energia molto importante per il neonato: questo purtroppo porta ad un progressivo e veloce deterioramento degli organi e ad un'alta mortalità (Rubio-Gozalbo et al. 2004).

Nonostante la carnitina sia una molecola studiata da ben 100 anni e sebbene negli ultimi tempi gli studi sulle sue applicazioni farmaceutiche siano notevolmente aumentati e nuove vie e meccanismi di regolazione legati al suo ruolo nel metabolismo degli acidi grassi siano stati recentemente identificati, poco o nulla si conosce sul ruolo fisiologico della sua via biosintetica e sugli enzimi in essa coinvolti.

## **2) Studio della carnitina in modelli animali**

Molte delle conoscenze che si hanno sulla funzione della carnitina e sul suo ruolo fisiologico derivano dallo studio di questa molecola in sistemi modelli.

Nel 1988 Koizumi et al. descrivevano topi con la *juvenile visceral steatosis (JVS)*, un fenotipo autosomico recessivo simile a quello della sistemica deficienza di carnitina, il cui gene causativo è l'ortologo murino di *OCTN2* (Tamai et al 1998). Questi topi si sono dimostrati essere un modello ideale per lo studio di come la deficienza di carnitina può modulare diversi pathways metabolici onde compensare la diminuzione del metabolismo degli acidi grassi a catena lunga. Topi knockout per *octn2* sviluppano infiltrazioni degli acidi grassi nel fegato, ipoglicemia e senza una cura terapeutica a base di carnitina, muoiono dopo 3-4 settimane dalla nascita a causa di una cardiomiopatia (Nezu J. et al., 1999). Topi eterozigoti per *octn2<sup>+/-</sup>* sembrano normali alla nascita ma con lo sviluppo mostrano una cardiomiopatia simile a quella degli omozigoti (Nikaido H. et al., 1995).

Nei topi con *JVS* si ha una alterazione della funzionalità di diversi enzimi, ad esempio tutti gli enzimi del ciclo dell'urea hanno un'attività inferiore rispetto a quella riscontrata nei topi wild type (Saheyki et al. 1997), inoltre è stata anche osservata una anormale espressione di molti geni coinvolti nel metabolismo cellulare, come quello della *GAPDH* che in questi topi è up-regolata (Tomomura M et al. 1992); infine nei topi con *JVS* la concentrazione di cortisolo nel plasma è più alta che nei controlli, indicando che il segnale di trasduzione dei glucocorticoidi è inibito (Tomomura M et al., 1992).

I topi sono stati utilizzati anche per lo studio delle patologie legate a deficienze del gene *CPT1*. Topi knockout per *cpt1* muoiono durante lo sviluppo embrionale, mentre nei topi eterozigoti è stata evidenziata una attività normale nelle femmine (+/-), ed una diminuzione dell'acilazione della carnitina nei maschi (+/-), questo risultato resta ancora da chiarire (Nyman et al., 2005).

Molti dei geni implicati nel trasporto della carnitina sono conservati nel corso dell'evoluzione, in particolare, questi geni sono stati identificati e studiati in animali modello come *Caenorhabditis elegans*. Nel 1995 Julie Ahringer identificava un mutante letale embrionale di *c.elegans* : *dif1*, nematodi mutati in questo gene mostravano una gastrulazione completa ed una divisione cellulare embrionale normale, ma un arresto dello sviluppo nel momento del differenziamento cellulare. Solo recentemente è stato dimostrato con esperimenti di complementazione in lievito che *dif1* non è altro che l'ortologo del gene che codifica per CACT, dimostrando che il trasporto di carnitina gioca un ruolo essenziale nello sviluppo embrionale (Oey et al, 2005).

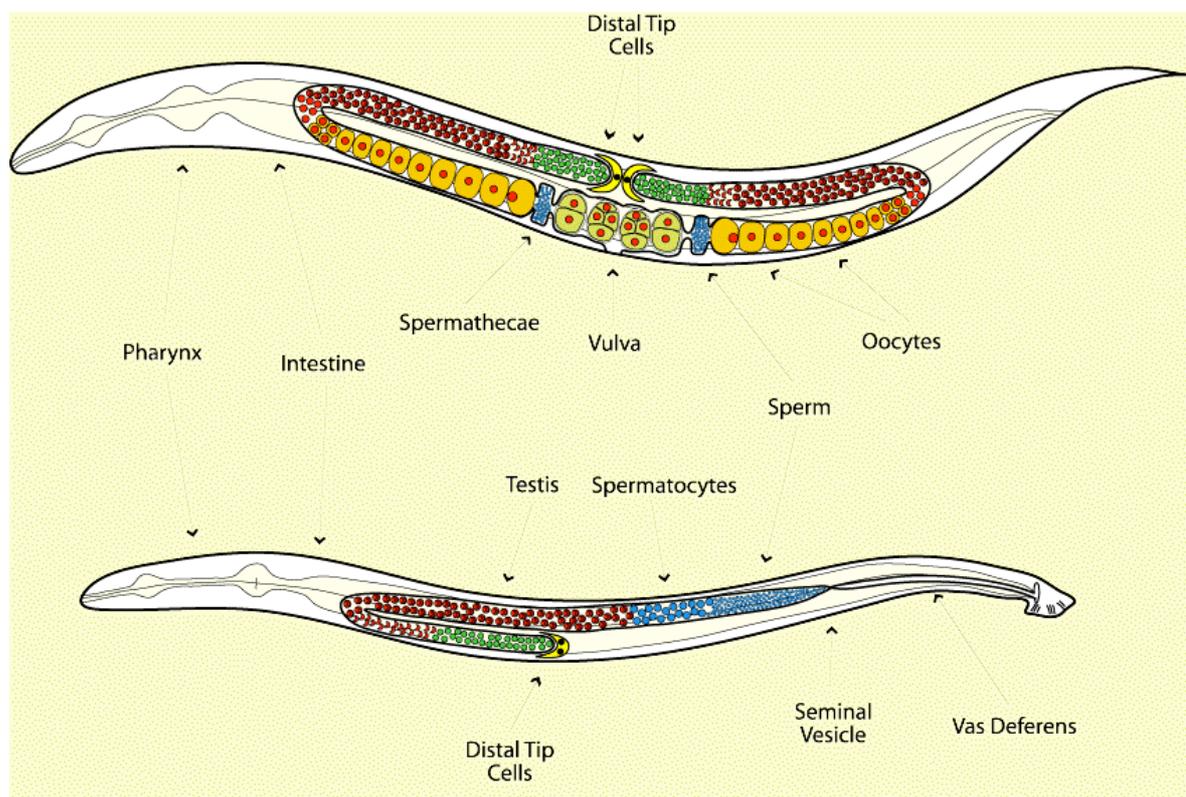
Nessun lavoro a tutt'oggi descrive invece animali mutanti nei geni implicati nella biosintesi di carnitina, nonostante questo processo sia altrettanto conservato nel corso dell'evoluzione.

Può la biosintesi di carnitina svolgere un ruolo durante lo sviluppo di un organismo? i geni in essa coinvolti possono essere regolati ed loro volta regolare i diversi meccanismi biochimici e fisiologici in cui la carnitina è coinvolta?

Nel tentativo di dare una risposta a queste domande il mio studio si è concentrato: 1) sulla caratterizzazione del primo enzima della biosintesi della carnitina TMLD, la cui reazione sembra essere la tappa limitante di questo processo; 2) sull'isolamento e sullo studio degli ortologi di questo enzima in organismi modello quali *Mus musculus* e *Caenorhabditis elegans*.

### 3) *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* è un piccolo nematode che vive negli strati superficiali del terreno. Esso si nutre principalmente di batteri e si riproduce con un ciclo vitale di circa 3 giorni in condizioni ottimali. *C.elegans* ha due sessi, l'ermafrodita e il maschio. Questi raggiungono la lunghezza rispettivamente di 1,2 e 1 mm, e differiscono in alcuni particolari dell'aspetto esterno, come mostrato in Fig. 7.



**Fig. 7:** Nelle foto e negli schemi sono mostrate le principali strutture anatomiche di *C. elegans*. Ermafrodita adulto (sopra) e maschio adulto (sotto). Vista laterale. L'ermafrodita adulto misura circa 1,2 mm di lunghezza.

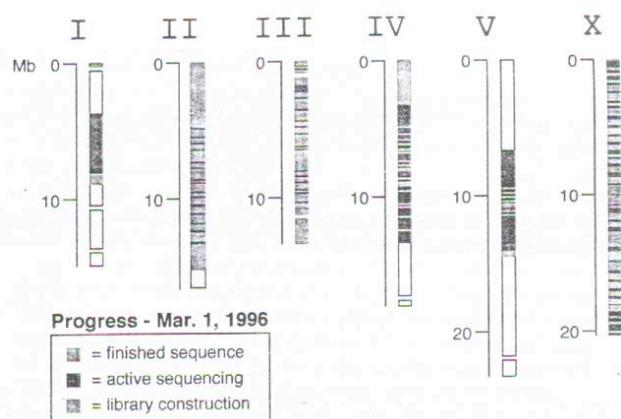
Gli ermafroditi producono sia oociti che spermatozoi, e possono riprodursi per auto fecondazione. I maschi, che nascono spontaneamente con bassa frequenza, possono fertilizzare gli ermafroditi; gli ermafroditi non possono fecondarsi l' un l' altro (Wood, 1983).

Basandosi sulla mappa fisica è stato possibile completare il sequenziamento del genoma ( $100 \times 10^6$  nt) che è organizzato in 6 cromosomi. I cromosomi sono olocentrici, ossia il cinetocoro è distribuito per tutta la lunghezza del cromosoma, piuttosto che essere localizzato in un punto. Il corredo aploide è formato da 5 autosomi (A) e da un cromosoma

sessuale (X), tutti approssimativamente delle stesse dimensioni. Il sesso è determinato dal rapporto X/A.

Gli ermafroditi sono diploidi per tutti i 6 cromosomi (XX), mentre i maschi sono diploidi per quanto riguarda gli autosomi, ma hanno un solo cromosoma X (X0). I maschi derivano da eventi di non disgiunzione del cromosoma X durante la meiosi, che accadono con una frequenza dello 0,7%. Circa 80% del genoma di *C. elegans* è costituito da sequenze uniche e il resto da DNA ripetuto, con un "range" di ripetitività più o meno continuo tra le 2 e le 1000 copie (Sulston e Brenner 1974). Le sequenze ripetute includono diverse famiglie di elementi trasponibili denominati elementi Tc (per trasposone *Caenorhabditis*). Si è visto che in alcuni ceppi, questi elementi possono trasporre anche nella linea germinale, causando mutazioni per inserzione nei geni. Il più studiato è il trasposone Tc1; esso è presente in circa 30 copie per genoma in alcuni ceppi, incluso Bristol N2 che è quello più comunemente usato in laboratorio (e che fa da riferimento).

Le conoscenze del genoma di *C. elegans* sono aumentate in maniera sostanziale negli ultimi 12 anni (Emmons et al., 1988); le dimensioni del genoma sono cambiate da una prima stima di  $80 \times 10^6$  nt a  $100 \times 10^6$  nt. Esso è all'incirca 20 volte le dimensioni del genoma di *E. coli*, e circa 1/30 del genoma umano. Studi sistematici e molecolari del genoma di *C. elegans*, hanno portato alla costruzione di una mappa fisica, cioè all'ordinamento di tratti di DNA provenienti da varie librerie, secondo la loro posizione sui cromosomi. Questa mappa è in molte regioni abbastanza strettamente correlata alla mappa genetica fornendo utili informazioni sulla posizione dei geni sui cromosomi. Il genoma mitocondriale (13,794 nt) è stato totalmente sequenziato (Okimoto et al. 1992). Il genoma nucleare composto approssimativamente da  $100 \times 10^6$  nt è organizzato in 6 cromosomi (Coulson et al. 1991) (Fig.7). è stato anch'esso recentemente sequenziato.



**Fig.7:** Organizzazione del genoma di *C.elegans* in 6 cromosomi.

*C. elegans* è dunque un piccolo verme del terreno ed è stato il primo animale cellulare di cui si sia conosciuto per intero il genoma. Si tratta di un verme trasparente, utilizzabile per esperimenti di genetica classica, la cui sequenza genomica completa consente sia l'identificazione di geni che il relativo clonaggio. E' un organismo di cui si ha una accurata conoscenza sia dell'anatomia che dello sviluppo, e nel quale si può utilizzare la potente e rapida tecnica dell'RNA interferenza, che consente di ottenere geni *Knock-out* non stabili. Tutto ciò fa di *C. elegans* un ottimo sistema modello per indagini di biologia molecolare.

La via biosintetica della carnitina è conservata in *C.elegans*, e questo mi ha portato a sceglierlo come sistema di studio per comprendere la funzione e regolazione degli enzimi implicati in questa via biosintetica.

#### **4) La regione Xq28**

***La regione distale della banda citogenetica q28 del cromosoma X e Patologie ad essa associate.***

Poiché *TMLD* nell'uomo è localizzato nella banda citogenetica q28 del cromosoma X, la sua caratterizzazione non può prescindere dalla conoscenza di alcune informazioni su questo cromosoma, ed in particolare su questa regione.

La regione citogenetica q28 del cromosoma X umano è di particolare interesse in Genetica Umana per l'elevato numero di loci malattia ad essa associati; al suo interno, infatti, sono stati individuati più di 50 geni malattia (Aradhya et al. 2002). Essa si estende dal gene *FMR2* (GeneID:2334) fino all'estremità telomerica del cromosoma X, andando a coprire un intervallo di circa 7,5 Mb.

La regione q28 si estende per circa 1,5 Mb e va dal gene *G6PD* (GeneID:2539) fino al marcatore telomerico TTAGGG della regione pseudoautosomale XqPar

I dati di sequenziamento hanno anche rivelato come tale regione sia ricca di sequenze ripetute, in particolare di elementi Alu. Essi costituiscono una fonte di microsatelliti (STRs, Short Tandem Repeats), particolarmente utili quali marcatori polimorfici del DNA nella definizione di intervalli di linkage genetico per patologie associate alla Xq28 (Russo et al. 2000; Villard et al. 2002).

Studi di genetica molecolare concordano nel ritenere che nel cromosoma X sia presente un elevato numero di geni e loci MRX (*Mental Retardation X-linked*), responsabili dello sviluppo delle facoltà intellettive (Gecz J. et al. 2000). In questi ultimi anni, grazie allo

sviluppo di nuove strategie di posizionamento e al sequenziamento del cromosoma X, sono stati identificati circa 80 loci associati a ritardo mentale non specifico; questi loci hanno una distribuzione peculiare, con picchi in corrispondenza delle regioni Xp22, Xp11.2, Xq24 e Xq28 (Toniolo D. 2000). Quest'ultima, in particolare, è una regione *hot-spot* di mutazioni in geni le cui alterazioni sono causative di varie forme di ritardo mentale. In essa, infatti, sono stati identificati molti geni correlati a gravi patologie, per molti dei quali si conoscono i difetti molecolari che portano alla loro comparsa. In realtà, in questa regione del cromosoma X mappano altre patologie genetiche di cui tuttora si ignora il difetto molecolare. Nel laboratorio in cui ho svolto il mio progetto di dottorato, è oggetto di studio il *locus* per una forma di ritardo mentale, *MRX72 (Mental Retardation X-linked)* (Russo et al. 2000). Questo *locus* è stato identificato in una famiglia con ritardo mentale priva di mutazioni nei geni *MRX FMR2*, *MECP2* e *GDII* già identificati, ed è, pertanto, di grande interesse perché essa costituisce un punto di partenza importante per la ricerca e l'identificazione di un nuovo gene localizzato nella Xq28 responsabile di deficit cognitivo.

L'intervallo di *linkage* identificato in *MRX72* si estende per circa 2Mb e comprende un numero elevato di geni, tra questi anche *TMLD*. La carnitina, come detto precedentemente sembra essere una molecola in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, di svolgere un ruolo neuroprotettivo, di promuovere l'espressione ed il trasferimento alle membrane della proteina B-50, nota per essere coinvolta nello sviluppo neuronale, nella neurogenesi, nella neuroplasticità e nella neurotrasmissione; la carnitina quindi sembra essere importante per il sistema nervoso, di conseguenza l'enzima che ne regola la sintesi potrebbe essere un buon candidato come gene causativo di *MRX72*; Basandomi, infatti, su queste informazioni mi è sembrato opportuno analizzare *TMLD* per questo ritardo mentale, come sarà descritto nei risultati.

## **5) Il meccanismo di traslocazione delle proteine dal citoplasma al mitocondrio**

Poiché *TMLD* è l'unico enzima che sembra avere una localizzazione mitocondriale rispetto agli altri quattro implicati nella biosintesi di carnitina, ho approfondito lo studio del processo che consente la traslocazione delle proteine dal citoplasma cellulare al mitocondrio.

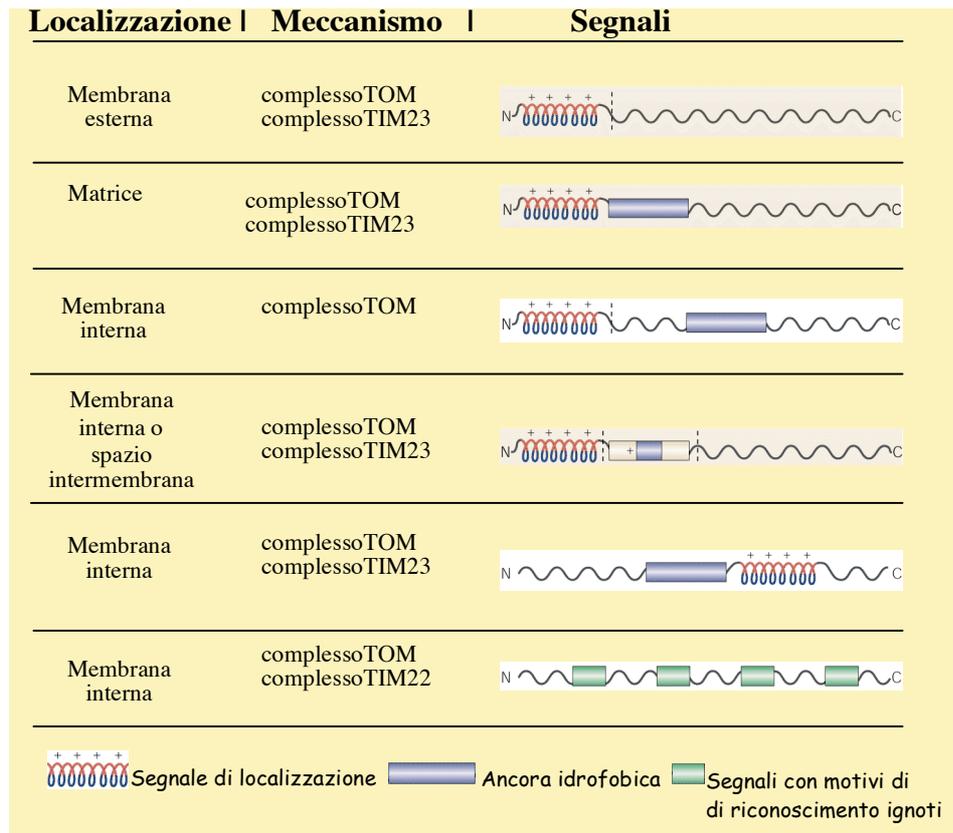
La maggior parte delle proteine mitocondriali sono codificate dal genoma nucleare e vengono sintetizzate nel citoplasma. Esse, finché si trovano nel citosol non assumono la loro struttura terziaria definitiva. Possiedono inizialmente una o più regioni della sequenza amminoacidica

che costituiscono i segnali di localizzazione mitocondriale. Le proteine sintetizzate nel citosol vengono chiamate “preproteine”, finchè non assumono la loro forma definitiva.

Il meccanismo attraverso il quale le proteine neosintetizzate vengono traslocate dal citosol al mitocondrio è molto articolato e si avvale di due tipi di complessi proteici, localizzati sulle membrane (Pfanner e Geissler, 2001), chiamati rispettivamente TOM (Traslocase of Outer Membrane) e TIM (Traslocase of Inner Membrane) (Figura 6). Il primo consente alle proteine di superare la membrana mitocondriale esterna, mentre il secondo ne consente il passaggio attraverso quella interna. Sia TOM che TIM possiedono recettori diversi a seconda del tipo di proteina che devono traslocare e a seconda della destinazione finale. TOM è costituito da 7 proteine diverse. Tra queste, TOM 20, TOM 22, TOM 70, sono recettori; TOM 40 è un canale di trasporto; e TOM 5, TOM 6, TOM 7, TOM 22 e TOM 40, costituiscono nell'insieme un subcomplesso chiamato GIP (General Import Pore).

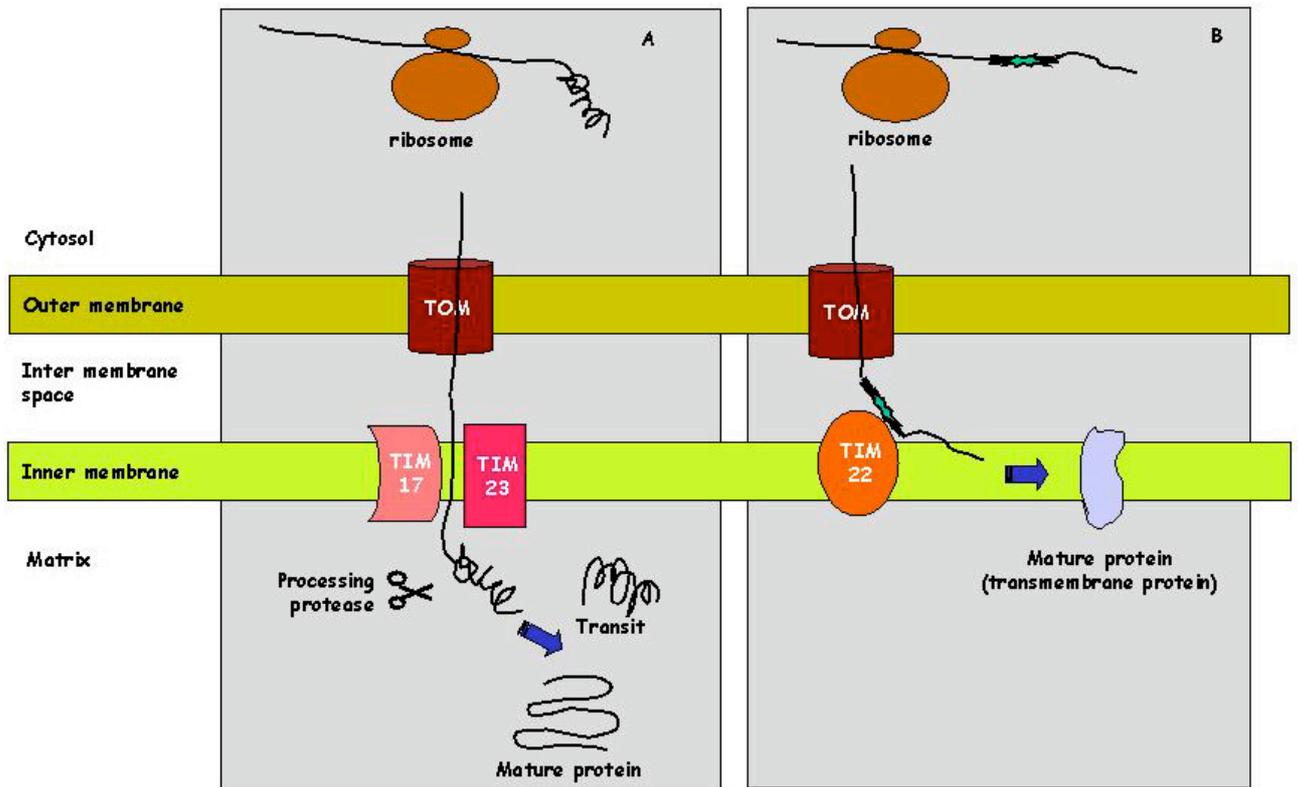
Come già detto, tutte le proteine mitocondriali sintetizzate nel citosol, possiedono inizialmente uno o più segnali di localizzazione mitocondriale. La posizione, il numero e le proprietà di carica di tali segnali sono alcuni degli elementi che determinano il compartimento mitocondriale di destinazione. Il segnale può essere situato all'estremità N-terminale (presequenza) o può essere interno; esso può essere unico o molteplice. Alcune proteine, destinate alla membrana interna presentano segnali interni multipli di cui non sono ancora state individuate caratteristiche univoche di sequenza e di struttura. Nei casi in cui il segnale è unico, esso è costituito da un'elica anfipatica con un lato idrofobico e l'altro ricco di cariche positive. Se il segnale è situato all'estremità N-terminale viene anche chiamato “presequenza segnale”. Immediatamente a valle della presequenza può trovarsi un sito di riconoscimento da parte di peptidasi specifiche, che tagliano il peptide segnale dalla proteina una volta che quest'ultima ha raggiunto il mitocondrio. Oltre all'elica anfipatica può essere presente un dominio idrofobico chiamato anche “ancora idrofobica”, che caratterizza le proteine destinate ad una delle due membrane. L'ancora si trova spesso a valle della presequenza e può presentare a sua volta un “sito di taglio”.

La presenza e la posizione dell'ancora e la presenza del secondo sito di taglio, sono altri elementi in grado di determinare il compartimento mitocondriale di destinazione.



**Figura 5:** Segnali di localizzazione mitocondriale.

Una proteina destinata alla matrice possiede solo la presequenza ed il relativo sito di taglio. Il lato idrofobico dell'elica formata dalla presequenza costituisce il segnale di riconoscimento per il recettore "TOM 20", il primo ad interagire con la proteina. Successivamente il lato carico dell'elica viene riconosciuto dal recettore "TOM 22". A questo punto la proteina può transitare attraverso il GIP (General Import Pore) e andare ad interagire con il complesso "TIM 23" di cui attiverà il canale subendo una sorta di effetto elettoretico dovuto all'azione del potenziale di membrana sulla sequenza segnale carica positivamente. Tuttavia il passaggio della proteina attraverso questo canale richiede una spesa di energia sottoforma di una molecola di ATP che viene utilizzata da "mtHsp70" e dai suoi cofattori proteici che costituiscono il vero motore molecolare del complesso TIM 23. La proteina giunta nella matrice mitocondriale viene riconosciuta da una peptidasi specifica che taglia la presequenza segnale. Se la proteina in questione presenta anche l'ancora idrofobica, subisce un destino diverso. Essa viene traslocata da TIM 23 nella membrana interna.



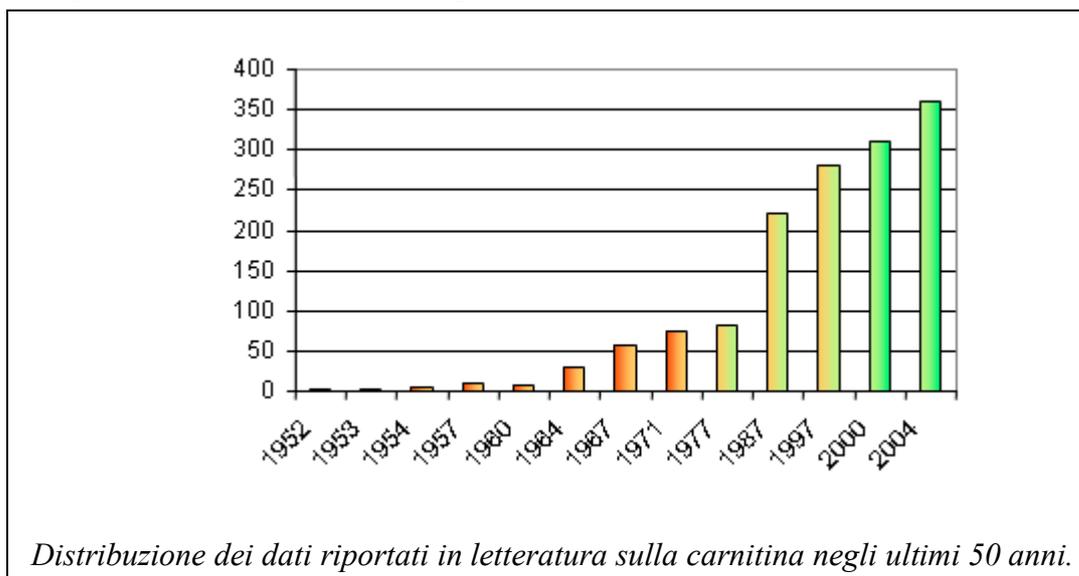
**Figura 6:** meccanismo di traslocazione delle proteina al mitocondrio mediato dai complessi TIM e TOM.

## SCOPO DEL LAVORO

La parola carnitina deriva dal latino *carnis* a sottolineare la fonte principale di questa molecola; essa fu isolata per la prima volta nel 1905(ref:), mentre la sua struttura chimica fu determinata ed approvata nel 1927; ma solo dopo 40 anni dalla sua scoperta, Fritz dimostrò che questa molecola era implicata nel metabolismo degli acidi grassi.

Negli ultimi vent'anni lo studio della carnitina si è molto intensificato e molti sono gli scienziati, che si sono interessati allo studio di questa molecola ed alle sue qualità pleiotropiche.

La carnitina è inoltre una molecola che viene commercializzata come integratore alimentare in soggetti sportivi, in caso di individui vegetariani, e pubblicizzata come molecola con effetti benefici in caso di malattie cardiovascolari, in caso di obesità e contro l'invecchiamento. Nel 2001 Robert Crayhon pubblicava un libro dal titolo : “ The carnitine miracle” a sottolineare tutti gli effetti benefici attribuiti a questa molecola.



Oggi si conosce il meccanismo biochimico, attraverso il quale la carnitina svolge la sua funzione di trasportatore degli acidi grassi dal citoplasma alla matrice mitocondriale, dove questi vengono beta ossidati; si conoscono la maggior parte dei geni, codificanti per le proteine coinvolte in questo processo di trasporto e sono note malattie genetiche dovute a difetti in questi geni. Esistono, inoltre animali modello in cui tutt'oggi si studiano i fenotipi dovuti a difetti in questo trasporto, tuttavia ancora molti dei meccanismi in cui la carnitina è coinvolta sono oscuri, così come rimangono non chiari i meccanismi di regolazione del suo metabolismo, il suo ruolo durante lo sviluppo e soprattutto, molte sono le controversie riguardo ad alcuni dei suoi effetti benefici.

Da tutto questo, il mio entusiasmo nell'occuparmi durante il mio progetto di dottorato di questa molecola ed in particolare di un dei capitoli più oscuri che la riguardano, ovvero il processo attraverso il quale la carnitina viene biosintetizzata.

Infatti, la fonte principale di carnitina in un organismo è la dieta, ed ogni organismo sembra essere dotato di un trasportatore citoplasmatico in grado di promuovere il processo di internalizzazione della carnitina dall'esterno della cellula al citoplasma; ma ogni organismo sembra essere anche dotato degli enzimi che sono in grado di sintetizzare questa molecola, quando allora la cellula sceglie di biosintetizzare carnitina anziché trasportarla? Quali sono i messaggi che dicono alla cellula di attivare questo processo di biosintesi?

Gli enzimi coinvolti nella biosintesi di carnitina sono conservati nel corso dell'evoluzione, ed è ovvio che la dieta di un organismo varia a seconda del posto che esso occupa nella scala evolutiva.

Il processo di biosintesi ha quindi, un ruolo diverso a seconda dell'organismo in cui lo si studia? I meccanismi che lo regolano, variano di organismo in organismo? ed inoltre, si può pensare che questo processo sia stato conservato nel corso dell'evoluzione, ma che le proteine ed i geni in esso coinvolti, abbiano assunto delle funzioni e dei meccanismi di regolazione sempre più complessi nel corso dell'evoluzione? Si può ipotizzare una acquisizione di funzione di queste proteine man mano che si passa in organismi sempre più complessi?

Allo scopo di rispondere ad alcune di queste domande e di contribuire alla chiarificazione di alcune dei meccanismi molecolari in cui la carnitina è coinvolta, mi sono occupata di caratterizzare sia a livello genetico che a livello biochimico, il primo enzima della biosintesi della carnitina la  $\alpha$ -Trimetil-Lisina Diossigenasi. Questo lavoro è stato da me condotto principalmente nello studio di questo enzima nell'uomo, per poi passare alla sua caratterizzazione nel topo ed in un sistema ancora più semplice quale il nematode *c. elegans*.

## **METODI**

## 1) RT-PCR e Northern blot

### Ibridazione del filtro contenente RNA di topo e di uomo

Per l'ibridazione con sonde specifiche per *TMLD* umana e di topo ho utilizzato il filtro MTN™ (*Multiple Tissue Northern Blot*) della Clontech contenente RNA di diversi tessuti umani e due filtri della stessa casa contenenti RNA di alcuni tessuti e di diversi stadi embrionali del topo.

### Marcatura per random priming

I frammenti di DNA utilizzati come sonde sono stati marcati con [<sup>32</sup>P]dCTP attraverso la tecnica del random priming utilizzando il Kit "Redi Prime™ II" Amersham.

### RT-PCR

Gli esperimenti di RT-PCR sono stati condotti su cDNA ottenuti da RNApoliA+ prodotti dai laboratori Clontech ed acquistabili commercialmente. Gli oligo utilizzati sono elencati nella tabella seguente.

|                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| mousetmldupper:   | TTGGTGGGAGGCTGGGTAGT  |
| mousetmldlower:   | TCGAAGCCAGACATAATCAAA |
| humanTMLDa/upper: | AGCACACCGGACTCTAAC    |
| humanTMLDa/lower: | GAAGGAGACTGACCAAATT   |
| humanTMLDb/upper: | CTACCCATGGAATAAAGAGC  |
| humanTMLDb/lower: | CGATAGTTTTTCCTGGAGGC  |
| humanTMLDex3upper | TGCTAATACCGTGATGCGCT  |
| humanTMLDex6lower | AATACCACATCCTCCCATAA  |

## 2) Analisi bioinformatica di TMLDa e TMLDb

### Programmi utilizzati per l'analisi

#### *Rasmol*

Rasmol è un programma concepito per la visualizzazione interattiva della struttura tridimensionale delle macromolecole organiche. Questa funzione viene esplicita in seguito alla lettura da parte del programma del file PDB della biomolecola di interesse

Nel file PDB sono contenute le informazioni relative alla struttura tridimensionale della molecola e le informazioni che consentono al programma di visualizzarla.

Il nome PDB deriva dal noto database “Protein Data Bank” che contiene tutte le informazioni conosciute relative a proteine di cui siano state effettuate analisi mediante cristallografia di diffrazione ai raggi X o mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare. In realtà un file PDB non è altro che un file di testo con una formattazione particolare, in cui sono contenute, con opportuna codifica, le coordinate atomiche ed i dati riguardanti la struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria della molecola, ottenuti mediante cristallografia o NMR.

### ***SMART***

(a Simple Modular Architecture Research Tool)

Questo programma in linea, consente l’identificazione e l’annotazione di domini geneticamente mobili e l’analisi della loro struttura. Sono individuabili più di 500 famiglie di domini di proteine di segnale, proteine extracellulari e proteine associate alla cromatina. Questi domini vengono annotati in maniera estensiva tenendo conto della distribuzione filogenetica, della classe funzionale, della struttura secondaria e dei residui amminoacidici funzionalmente importanti. Ogni dominio trovato in un database di proteine non ridondante, insieme con i suoi parametri di ricerca e le informazioni tassonomiche, viene conservato in un sistema di database relazionale. L’interfaccia utente di questo database consente ricerche per proteine contenenti specifiche combinazioni di domini in definite specie di organismi.

### ***EMBOSS pepinfo***

L’applicazione in linea pepinfo individua e mostra diverse utili metriche riguardanti la sequenza di una proteina. Può realizzare e mostrare i seguenti grafici:

Grafici di idrofobicità usando il metodo di Kyte e Doolittle, il metodo di Ohm (Sweet e Eisenberg) e il metodo dei parametri consenso (Eisenberg et al.)

Un istogramma della presenza di residui con le seguenti proprietà : minimo ingombro sterico, modesto ingombro sterico, alifaticità, aromaticità, apolarità, polarità, carica netta non nulla, carica netta positiva, carica netta negativa.

### ***PSORTII***

Le cellule eucariotiche presentano diversi organelli con funzioni specializzate e, pertanto, contenenti diverse proteine. Le proteine vengono trasportate nel compartimento appropriato in base alla presenza di specifiche sequenze amminoacidiche, chiamate "sorting sequences". I segnali di sorting sono di varia natura: possono essere specifiche sequenze di aminoacidi oppure sequenze con caratteristiche chimiche come forte carica positiva o negativa; PSort è un programma di ricerca che, data una sequenza amminoacidica, ne individua la

collocazione all'interno della cellula distinguendo tra proteine di membrana, nucleari o citoplasmatiche e mitocondriali.

### ***CLUSTAL W***

E' un programma di allineamento di sequenze basato sulla costruzione di una matrice di "distanze" fra le sequenze, in base al quale può essere costruito anche un albero filogenetico. Le due sequenze piu' simili vengono allineate e la sequenza piu' simile a queste (cioe' piu' vicina nell'albero filogenetico) viene allineata alla famiglia costituita dalle due precedenti e progressivamente tutte le sequenze vengono allienate alla famiglia delle n sequenze allineate in precedenza.

### ***MultAlin***

Lavora in modo simile a CLUSTAL W ma ad ogni nuovo allineamento le distanze vengono ricalcolate e pertanto l'intera procedura viene ripetuta fino a quando non ci sono piu' variazioni nell'allineamento.

### ***GOR IV***

E' un programma di predizione delle strutture secondarie di una proteina esso si basa sulla correlazione fra il residuo di cui si vuole predire la struttura secondaria e i residui entro una finestra di 16 residui attorno a questo. La predizione viene fatta considerando queste correlazioni.

### **Protein Data Bank**

E' una banca dati che contiene principalmente strutture di proteine, ma anche strutture di proteine ed acidi nucleici e di soli acidi nucleici. Alcune strutture non sono sperimentali, ma ottenute per modellistica.

### **Blast.**

Questo utile programma, presente in rete, consente il confronto di una data sequenza nucleotidica (BlastN) o aminoacidica (BlastP) con le sequenze note presenti in banca dati. Il programma, inoltre, permette di confrontare tra loro due sequenze siano esse nucleotidiche o aminoacidiche (*Blast 2 sequences*). È poi possibile scegliere se considerare o meno regioni di sequenza a bassa complessità disattivando o attivando l'opzione "filtro". In ogni caso il *software* fornisce, come risultato della ricerca, l'allineamento della sequenza data con altre contenenti motivi simili e calcola la percentuale d'identità per ogni allineamento

## **Acedb.**

Acedb è la banca dati completa di *Caenorhabditis elegans*, e la sua realizzazione è stata possibile grazie alla determinazione completa della sequenza di basi che costituiscono il DNA di questo piccolo nematode, tale lavoro è stato condotto dal Sanger Centre di Cambridge, in Inghilterra, e dal Genome Center di Washington, negli Stati Uniti. Grazie a questo enorme lavoro, oggi è possibile navigare all'interno di Acedb alla ricerca di tutte le possibile informazioni sul genoma di *C.elegans*.

### **3) Clonaggio di TMLHa ed TMLHb nei vettori di espressione pGFP-N1 e pCDNA3.**

L'Open reading frame (ORF) di TMLDa e TMLDb sono state amplificate per PCR, e clonate nei vettori di espressione pCDNA3 e pGFP-N1 a valle del promotore CMV. Gli enzimi utilizzati sono in entrambi i clonaggi sono EcoRI e BamH1. Gli inserti sono stati amplificati per PCR con i seguenti oligo :

|                 |  |
|-----------------|--|
| vettore pGFP-N1 |  |
| Vtmld1upper     | <b>gccggaattcggatgtggtaccacagattgt</b>   |
| Vtmld2lower     | <b>gccgggatccgggattgtgtaaaacactccact</b> |
| Vtmld1lower     | <b>gccgggatccgggagcctgaagccccaagag</b>   |
| vettore pCDNA3  |  |
| V-TMLD1Bu:      | <b>tataggatccatgtggtaccacagattgtc</b>    |
| V-TMLD1El:      | <b>tatagaattcttaagcctgaagccccaaga</b>    |
| V-TMLD2El:      | <b>tatagaattctcagattgtgtaaaacactcca</b>  |

### **4)Colture cellulari**

In questo lavoro sono state utilizzate linee cellulari tumorali di rene di Cercopitecus Aethiops: le Cos-1. Le Cos-1 crescono in monostrato, adese alle piastre di coltura, in mezzo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con il 10% di FCS (Fetal Calf Serum, siero fetale bovino). Vengono mantenute in coltura alla temperatura di 37°C, al 5% di CO<sub>2</sub>.

### **5) Trasfezione transiente in cellule COS-1**

Le cellule vengono piastrate 24-48 ore prima della trasfezione in modo da ottenere una confluenza pari al 60-80%. In questo modo, al momento della trasfezione, le cellule sono ancora in attiva fase moltiplicative e pertanto più ricettive.

Il terreno di coltura è rimosso dalle piastre per aspirazione, successivamente viene aggiunto 1ml di terreno senza FCS per sincronizzare le cellule mediante affamamento. La mix DNA/FUGENE viene aggiunta delicatamente alle piastre.

Le cellule vengono incubate a 37°C per un massimo di 24 ore dopodiché il terreno senza siero viene sostituito con terreno con siero.

Dopo 48 ore totali di trasfezione le cellule vengono lavate con PBS 1x e raccolte.

### **6) Efficienza di trasfezione**

Una volta ottenuti, tutti i costrutti sono stati co-trasfettati insieme al plasmide pRL-CMV.

Il plasmide pRL-CMV contiene il cDNA che codifica per la luciferasi *Renilla* (*Rluc*) isolata dall'organismo marino *Renilla reniformis* ed il promotore CMV che promuove alti livelli di trascrizione di *Renilla*. La proteina *Renilla* luciferasi è un monomero di 36kDa che catalizza l'ossidazione della luciferina producendo luce.

Ho adoperato questo vettore come controllo dell'efficienza di trasfezione. In particolare quantità di volta in volta calcolate di plasmide ricombinante, sono state co-trasfettate con 20 ng del plasmide pRL-CMV.

Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e gli estratti proteici sono stati saggiati per l'attività *Renilla* aggiungendo LARII (Luciferase Assay Reagent II) mediante il luminometro.

### **7) Saggio di attività enzimatica di TMLD**

L'ammontare della Trimetil-lisina idrossilata prodotto enzimaticamente a partire dall'Trimetil-lisina è stato prodotto con HPLC tandem MS come descritto da Vaz et al.; 2002)

### **8) Localizzazione mitocondriale di proteine al microscopio confocale**

In ciascuno dei pozzetti di una piastra da 6 è stato collocato un vetrino coprioggetto che è stato successivamente ricoperto di gelatina allo 0.2%. Nei pozzetti così preparati sono stati posti 2 ml di coltura cellulare in terreno DMEM con le stesse caratteristiche di quello utilizzato per tutti gli altri esperimenti. Le cellule che erano del tipo Cos-1 sono state fatte crescere fino a raggiungere una confluenza del 60-80 %. Su di esse è poi stato eseguito un esperimento di trasfezione transiente con il metodo dei liposomi. Le cellule del pozzetto 1 sono state trasfettate con il costrutto per l'espressione di TMLD1-GFP, quelle nel pozzetto 2 con il vettore pEGFP-N1 senza inserto. Dopo 48 ore le cellule sono state lavate due volte con PBS 1X e sottoposte ai seguenti passaggi:

1. Fissaggio: Trattamento con paraformaldeide al 4% per 5 minuti a temperatura ambiente e lavaggio con PBS 1X.

2. Permeabilizzazione: Trattamento con una soluzione di Triton 0,5% in PBS 1X, per 30 minuti a temperatura ambiente e lavaggi con PBS 1X.

3. Bloccaggio Trattamento con “Blocking Buffer” costituito da una soluzione di BSA 3% in PBS 1X, per 30 minuti a temperatura ambiente e lavaggio con PBS 1X.

4. Trattamento con anticorpo primario

L’anticorpo primario utilizzato è una IgG di Topo diretta contro la proteina mitocondriale Hsp60 (Heat shock protein 60).

Ai campioni cellulari è stata aggiunto l’anticorpo diluito 1:500 in una soluzione Blocking Buffer contenente BSA 1%, sono quindi stati incubati per 12 ore a 4°C e sono stati poi nuovamente lavati con PBS.

5. Trattamento con anticorpo secondario

L’anticorpo secondario utilizzato è una IgG di Capra diretta contro IgG di Topo e coniugata con “Rosso Texas”. I campioni sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione contenente l’anticorpo diluito 1:500 in una soluzione Blocking Buffer contenente BSA 1% e lavati in PBS.

6. Montaggio dei vetrini I vetrini coprioggetto sono stati delicatamente prelevati e montati su vetrini portaoggetto.

7. Osservazione al microscopio confocale

I campioni sono stati osservati al microscopio confocale utilizzando per la rivelazione della proteina TMLD1-GFP, lunghezze d’onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 480 nm e di 545 nm. Quelle utilizzate per il “Rosso Texas” sono, rispettivamente: 546 nm e 590 nm.

## **9) Localizzazione submitocondriale di TMLD.**

Gli esperimenti di localizzazione submitocondriale di TMLD-1 sono stati effettuati su cellule COS-1 trasfettate con il costrutto TMLD-pCDNA3-myc, le metodologie utilizzate per la realizzazione del costrutto, sono identiche a quelle descritte in precedenza. Le cellule ottenute sono state poi trattate ed analizzate al microscopio elettronico. Tali esperimenti sono stati effettuati in collaborazione con il Professore Carlo Tacchetti dell’Università di Genova e la metodologia usata è descritta nel lavoro Orsini F. et al., 2004.

## **10) Amplificazione degli esoni contenenti l’ORF di *TMLDa* e *TMLDb* mediante la reazione di PCR.**

Tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) sono stati amplificati da DNA genomico del paziente e del controllo gli esoni contenenti l'ORF di *TMLDa* e *TMLDb*.

Per l'amplificazione sono state utilizzate le seguenti coppie di oligonucleotidi:

V-igb2up AGCCTCATAAAAGTTGTTGT  
V-igb2low TTTTGGATATATGTGCTGCC  
V-igb3up GTTTTCTGGATGCTGATTT  
V-igb3low TGAAAGGAACAAACCATT  
V-igb4up ACTGATTGCTAGGAAAAAGA  
V-igb4low GTGACCATACCTGTTACATT  
V-igb5up GTATTGGAAGGAGTTTTGAA  
V-igb5low TAAGAAACCACTCAAGACTATC  
V-igb6up CAAGTAGTTTCAGTAATCATTTT  
V-igb6low AGGGATTTTTGTTACATTAG  
V-igb7aup ATTGAACATAGGGGAAGCC  
V-igb7alow CCCGTTCTTCACTGCTTC  
V-igb8aup GTTCCTTTGGTCTGTCCTTC  
V-igb8alow CTGAAGGAGACTGACCAAAA  
V-igb7bup TCTGCTATCTATTTTACCTCCC  
V-igb7blow CTGAACCTTTGCTCTTGTAT  
V-igb8bup AAATAGGTGTGATAATGCTG  
V-igb8blow CGATAGTTTTTCTGGAGGCATT

## 11) Sequenziamento dei prodotti di PCR

I prodotti di PCR sono stati sottoposti a sequenziamento automatico diretto con il metodo di Sanger. Con questo metodo si sintetizza una copia del filamento da analizzare con una reazione di polimerizzazione che si arresta specificamente dopo ogni base. Quest'arresto specifico si ottiene aggiungendo ai componenti la miscela di reazione dei dideossinucleotidi trifosfati (ddNTP), analoghi sintetici dei normali deossinucleotidi trifosfati (dNTP). I ddNTP sono incorporati senza problemi nella catena nascente di DNA, ma ne impediscono l'allungamento ulteriore in quanto non possiedono il gruppo OH- in 3'. I dideossinucleotidi sono aggiunti in quantità limitate venendo, quindi, inseriti con una certa frequenza, ma non in tutte le posizioni.

Il sequenziamento degli inserti è stato eseguito mediante il “big dye terminator cycle sequencig kit”. Questo kit fornisce una pre-mix in cui sono miscelati i 4 dideossinucleotidi marcati con fluorescenza, i normali dNTPs, la Taq polimerasi, il tutto in 5X “Sequencing buffer”.

### **11) Ibridazione in situ**

Gli esperimenti di ibridazione in situ di *tmdl* sono stati condotti in collaborazione con il Dott. Ivan Conte dell’Università di Madrid e la metodologia utilizzata è descritta nel lavoro Conte I. et al.,2005. La sonda è stata ottenuta mediante un’amplificazione con RT-PCR, utilizzando oligonucleotidi specifici per la 3’ UTR del gene *tmdl* di topo. L’amplificato è stato poi clonato nel vettore TOPO-TA cloning utilizzando il protocollo del TOPO TA cloning Kit della Invitrogen. Gli oligo utilizzati sono di seguito elencati:

**V-tmldmouseU** tgaatactgctcgtctctcg

**V-tmldmouse1L** attagactactcagaagccc

### **12) induzione del ceppo di lievito *Pichia pastoris***

*Pichia pastoris* è un lievito metilotrofico capace di utilizzare il metanolo come unica fonte di carbonio; il primo passaggio del metabolismo del metanolo prevede l’ossidazione dell’alcol a formaldeide usando ossigeno molecolare grazie all’enzima alcol ossidasi. il gene *AOX 1* è quello maggiormente responsabile dell’ossidazione degli alcol nella cellula. L’espressione di questo gene è controllata a livello trascrizionale ed è indotta dal metanolo; se i lieviti crescono in un terreno contante glucosio, l’espressione del gene è repressa anche in presenza dell’induttore, ma se la crescita avviene in glicerolo e metanolo è possibile sintetizzare l’alcol ossidasi. Le caratteristiche di questo promotore regolato ne permettono l’inserzione in plasmidi utilizzati per l’espressione eterologa in lievito.

Il ceppo di *Pichia pastoris* utilizzato in questa procedura è GS115 caratterizzato dall’essere un mutante *aox 1* MUT<sup>+</sup> cioè usa il metanolo come unica fonte di carbonio.

La trasformazione del ceppo è stata ottenuta seguendo le procedure standard, si effettua una crescita overnight di una colonia singola, ed il giorno successivo si trasferisce 1ml di questa colonia in terreno YPDS fino ad una crescita di 1,3- 1,5 O.D., a questo punto si effettuano una serie di centrifugate a 1500g e diluizioni dei pellet ottenuti, con acqua fredda. Nell’ultimo passaggio si risospendono i lieviti in sorbitolo 1M e si effettua l’elettroporazione, utilizzando 5-10 microgrammi di DNA trasformante. I ceppi elettroporati vengono incubati per 2h a 30° e

quindi piastrati su piastre con concentrazione di zeocina pari a 100 g/mL per 3 giorni. Le colonie trasformate cresciute su queste verranno poi trasferite su altre piastre con concentrazione di zeocina 200 g/mL e 1000 g/mL per selezionare i cloni positivi ed ulteriormente incubate a 30°C per 3 giorni.

### **13) estrazione del DNA genomico da lievito.**

Una singola colonia viene inoculata in terreno YPD O.N. quindi l'inoculo viene centrifugato a 1500rpm per 5', ed il pellet viene lavato con il buffer TE8, a questo punto si risospende il pellet in Yeast Lysis Enzyme e si incuba a 37° per 30'. Una volta che i lieviti sono lisati si passa all'estrazione del DNA seguendo la procedura descritta nel manuale Easysselect *Pichia* expression Kit della Invitrogen.

## RISULTATI

## **Caratterizzazione del gene umano *TMLD***

### **1) Identificazione dello splicing alternativo del gene *TMLD***

Il laboratorio nel quale ho svolto il mio progetto di dottorato, si occupa da molti anni del sequenziamento e della caratterizzazione dei geni localizzati nella regione Xq28 del genoma umano. Nell'ambito di questo progetto mi sono occupata della caratterizzazione del gene *TMLD*, localizzato in quella regione ed ho identificato due forme alternative di *TMLD*, presenti nella banca dati NCBI (N° FLJ10727) e codificante per l'enzima *TMLD*.

L'intera sequenza del gene è contenuta nella banca dati UCSC (<http://genome.cribs.unipd.it/>), esso è suddiviso in otto esoni e mappa dal nucleotide 154283477 al nucleotide 154406301 in direzione centromerica. L'analisi effettuata utilizzando il programma in rete BLAST-EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mi ha consentito di trovare un nuovo messaggero (AA969024) corrispondente ad uno *splicing* alternativo in cui gli ultimi due esoni del gene da me chiamati 7b e 8b sono alternativi a 7a e 8a del messaggero principale (Figura 1A). Entrambi i messaggeri rispettivamente denominati *TMLDa* e *TMLDb*, contengono una *open reading frame* (ORF) che codifica per due proteine che condividono i primi 332 amminoacidi ma che differiscono al C-terminale. Il cDNA che codifica per la *TMLDa* contiene un modulo di lettura aperta di 1266 nucleotidi codificanti per una proteina di 422aa; il cDNA *TMLDb* contiene un modulo di lettura aperta di 1197 nucleotidi codificanti per una proteina di 399 amminoacidi. L'allineamento delle due sequenze proteiche è mostrato in figura 1B.

### **2) Profilo di espressione del gene *TMLD*.**

In un primo approccio ho analizzato il profilo d'espressione di *TMLD* in tessuti umani. Questo esperimento è stato condotto con due tecniche diverse ma complementari: Northern blot ed RT-PCR. Nel primo caso ho utilizzato una sonda comune ad entrambe le forme di *TMLD*, mentre nel caso dell'RT-PCR ho disegnato degli oligo specifici per *TMLDa* e *TMLDb*. I risultati sono mostrati in figura 2, dove si può osservare che il gene *TMLD* è espresso in maniera ubiquitaria, ed entrambe i trascritti alternativi sono espressi negli stessi tessuti.

Considerato il ruolo che la carnitina sembra svolgere nel sistema nervoso centrale ho voluto anche stabilire il profilo di espressione di *TMLDa* e *TMLDb* in diversi compartimenti del sistema nervoso, questo esperimento è stato condotto mediante RT-PCR ed il risultato è mostrato in figura 2. Come si può vedere entrambe le forme del gene sono espresse in tutti i compartimenti analizzati. Tutti gli esperimenti di RT-PCR sono stati condotti controllando i cDNA ottenuti, con oligo per la  $\beta$ -actina, che è ben nota avere una espressione ubiquitaria.

Da questi risultati si può concludere che, nonostante in letteratura sia riportato che solo il fegato, il rene ed il cervello possiedono il set completo di enzimi della biosintesi, tutti i tessuti esprimono il gene *TMLD* e quindi sono ipoteticamente in grado di produrre l'enzima TMLD e conseguentemente di convertire la TML in HTML.

### 3) Localizzazione mitocondriale di TMLD

#### *Analisi bioinformatica*

Risultati preliminari ottenuti mediante esperimenti di frazionamento cellulare, suggerivano che a differenza degli altri quattro enzimi della via biosintetica della cartina TMLD sembra avere una localizzazione mitocondriale. Quindi, per verificare questa ipotesi ho effettuato un'analisi informatica della sequenza proteica di TMLD onde identificate putativi segnali di localizzazione subcellulare.

Questa analisi è stata realizzata utilizzando programmi disponibili in rete quali: PSORT (<http://www.psort.org/>), MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) e PREDOTAR (<http://genoplante-info.infobiogen.fr/predotar/predotar.html>), in grado di prevedere la l'eventuale presenza di sequenze target all'N-terminale della proteina. Date le conoscenze che si hanno sul meccanismo di traslocazione delle proteine nel mitocondrio, e dei complessi segnali di riconoscimento che queste devono avere per essere riconosciute e poi smistate nei diversi sub-compartimenti di questo organello, ho effettuato un'analisi più approfondita della composizione amminoacidica di TMLD per avere informazioni sulla sua struttura secondaria, a tale scopo mi sono servita di altri due programmi quali PEPINFO (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/pepinfo>) e GORIV ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)). Risultato di quest'analisi incrociata è stato che TMLD possiede un segnale di localizzazione mitocondriale nei primi 40 aa. In dettaglio, i primi 10 amminoacidi formano un'alfa elica con carica positiva, seguita dalla sequenza SRLQD identificata come un segnale di taglio proteolitico, mentre dall'amminoacido 16 all'amminoacido 40 è presente una successione di amminoacidi idrofobici (Figura 3A). Da questa predizione è possibile dedurre che TMLD non solo sembra essere una proteina che viene trasportata nel mitocondrio, ma possiede anche tutti i requisiti per essere una proteina localizzata sulla membrana interna di questo organello (figura 5, pag.19). Poichè le due isoforme TMLDa e TMLDb hanno la stessa sequenza amminoacidica all' N-terminale, entrambe sembrano essere proteine mitocondriali (figura 1B).

### ***Esperimenti di co-localizzazione di TMLD e HSP70.***

Allo scopo di confermare i risultati derivati dall'analisi informatica condotta sulla sequenza amminoacidica di TMLD, ho clonato l'ORF di *TMLDa* e *TMLDb* nel vettore pGFP-N1, che è un vettore di espressione per cellule eucariotiche in cui la proteina inserita viene tradotta in fusione con il marcatore fluorescente GFP. Per stabilire se il segnale di localizzazione fosse necessario e sufficiente alla traslocazione di TMLD nel mitocondrio, ho costruito tre diversi tipi di mutanti di TMLD: nei primi due ho effettuato delle delezioni progressive dei primi 40 amminoacidi, nel terzo ho clonato il solo segnale di localizzazione mitocondriale a monte della GFP. I costrutti chimerici ottenuti sono descritti in figura 3B: p1TbGFP e p2TaGFP contengono l'intera ORF di TMLDb e TMLDa rispettivamente; i costrutti p3TbGFP e p4TaGFP mancano dei primi 10 amminoacidi, quindi mancano dell'alfa elica e del sito di taglio; i costrutti p5TbGFP e p6TaGFP mancano dei primi 40 amminoacidi; nei costrutti p7MTS1GFP e p8MTS2GFP invece, i primi 53 ed i primi 10 amminoacidi sono stati fusi alla GFP, rispettivamente.

Ho effettuato degli esperimenti di trasfezione transiente in cellule COS-1 con tutti i costrutti elencati. Le proteine TMLD sono state rivelate grazie alla fusione con il marcatore fluorescente verde GFP e, come controllo della localizzazione mitocondriale ho utilizzato anticorpi anti-HSP60, una proteina a nota localizzazione mitocondriale, colorata in rosso. I risultati di questi esperimenti di co-localizzazione sono mostrati in figura 4. Il segnale verde ottenuto in figura 4A corrisponde alle cellule trasfettate con TMLDa-GFP e TMLDb-GFP e, come si può osservare il segnale verde combacia perfettamente con il segnale rosso, corrispondente a HSP60. Nelle cellule esperimenti i costrutti in cui il putativo segnale mitocondriale di TMLD è stato deletato (figura 4 B e C), il segnale della GFP è diffuso nel citoplasma e non combacia con quello ottenuto con HSP60, a dimostrazione del fatto che sia TMLDa-GFP che TMLD-GFP non sono più in grado di essere traslocate nel mitocondrio in assenza dei primi 10 e 53 amminoacidi. Nell'ultimo pannello della figura 5D sono mostrati i risultati ottenuti introducendo nelle cellule i costrutti in cui a monte della GFP è fuso il segnale di localizzazione mitocondriale (p7MTS1GFP,p8MTS2GFP). Come si può osservare il segnale verde è di nuovo perfettamente sovrapponibile a quello ottenuto con HSP60, a dimostrazione del fatto che sono sufficienti i primi 15 amminoacidi della sequenza target di TMLD perchè la GFP diventi mitocondriale. In conclusione TMLDa e TMLDb sono due proteine mitocondriali, il cui segnale minimo di localizzazione nel mitocondrio è contenuto nei primi 15 amminoacidi.

Per stabilire se il segnale completo consenta a TMLD non solo di essere traslocata nel mitocondrio ma di essere smistata sulla membrana interna di questo organello, sono stati necessari esperimenti di localizzazione al microscopio elettronico.

Tali esperimenti sono stati condotti in collaborazione con il dott. Carlo Tacchetti dell'università di Genova, ed in questo caso ho utilizzato un costrutto in cui TMLDa fosse in fusione con il myc-tag. Il risultato di questo esperimento è mostrato in figura 5. Da questa analisi TMLD sembra effettivamente localizzata sulla membrana interna del mitocondrio, tuttavia il numero esiguo di spot ottenuti, sebbene ben evidenti necessita di a conferma.

#### **4) TMLDa e TMLDb**

##### ***Analisi bioinformatica***

Come già detto in precedenza TMLDa e TMLDb sono identiche per i primi 332 amminoacidi ma differiscono nell'estremità C-terminale. Allo scopo di individuare domini funzionali conservati e non nelle due proteine, ho effettuato un'analisi bioinformatica della sequenza primaria utilizzando il programma disponibile in rete "SMART", che è in grado di trovare, sulla base della sequenza amminoacidica di una proteina, eventuali domini noti.

Da questa analisi è risultato che TMLDa presenta all'estremità carbossi-terminale un dominio responsabile dell'interazione con  $Fe^{2+}$  ed 2-ossoglutarato, due co-fattori essenziali della reazione enzimatica catalizzata da quest'enzima. Questo dominio caratterizza le proteine appartenenti alla "superfamiglia" delle "CAS-like", che comprende esclusivamente ossidoriduttasi  $Fe^{2+}$  e 2-Ossoglutarato dipendenti. Il nome "CAS-like" deriva da un enzima batterico noto come CAS ("Clavaminic Acid Synthase") ovvero "Clavaminato sintetasi".

Inoltre TMLDb, differendo drasticamente da TMLDa negli ultimi 67 aa, non è dotata di una parte di tale dominio proteico. A questo punto, grazie alle indicazioni fornitemi dal programma "SMART", ho trovato nella "Protein Data Bank" (PDB) la struttura tridimensionale, determinata mediante cristallografia per diffrazione a raggi X, della "Clavaminato sintetasi" di *Streptomyces clavuligerus*, in complesso con un atomo di Ferro e con una molecola di 2-Ossoglutarato, e questo mi ha consentito di individuare la posizione e le caratteristiche di tutti i residui amminoacidici di questa proteina che interagiscono con il 2-ossoglutarato e con il Fe, come mostrato in tabella1.

| <b>aa di CAS</b> | <b>Interazione</b>   |
|------------------|----------------------|
| V 123            | Idrofobica           |
| L 141            | Idrofobica           |
| H 144            | Ponte H              |
| L 159            | Idrofobica           |
| T 172            | Ponte H + Idrofobica |
| H 279            | Ponte H + Idrofobica |
| R 281            | Ponte H + Idrofobica |
| R 293            | Ponte H              |
| L 295            | Idrofobica           |
| R 297            | Ponte H              |
|                  |                      |

**Tabella 1:** Residui amminoacidici che nella proteina CAS interagiscono con il Fe ed il 2-ossoglutarato

Grazie all'utilizzo del programma "Rasmol" ed alle informazioni presenti in PDB ho potuto evidenziare la posizione dell'atomo di Ferro e della molecola di 2-ossoglutarato e questo mi ha consentito di individuare i residui amminoacidici che interagiscono direttamente con i due cofattori; si tratta dell' H144, E146 e H279 che legano l'atomo di Ferro che a sua volta lega uno degli atomi di Ossigeno del Carbonio 1 del 2-ossoglutarato. L' allineamento tra la sequenza amminoacidica del dominio della CAS e quella di TMLDa, mi ha consentito di determinare gli amminoacidi leganti il Fe e quelli che interagiscono con il 2-ossoglutarato che sono conservati in TMLDa come riportato in tabella 2.

| <b>aa di CAS</b> | <b>aa di TMLD</b> |
|------------------|-------------------|
| H 144            | H 242             |
| E 146            | D 244             |
| H 279            | H 389             |

**Tabella 2:** Residui amminoacidici coinvolti nel legame con il ferro e il 2-ossoglutarato conservati in TMLDa

In particolare, i residui che legano il Fe, risiedono, nella proteina CAS, in due zone ad alta identità di sequenza con TMLDa: H144 e E146 si trovano in una regione di 9 aa (dal residuo 141 al residuo 149 nella CAS) con un identità di sequenza, tra le due proteine, del 44,4 %. Il residuo H279 si trova in una regione di 23 aa (dal residuo 262 al residuo 284 nella CAS) con una identità di sequenza del 48,8 %, l'allineamento tra le due proteine è mostrato in figura 6.

In figura 7 è invece mostrata l'immagine raffigurante la struttura tridimensionale della catena peptidica di queste due regioni così come è stata determinata per la proteina CAS. Nell'immagine sono messi in risalto i tre aa leganti il Fe, l'atomo di Fe stesso ed il 2-ossoglutarato.

Sulla base dell'omologia di sequenza ho quindi ipotizzato che in TMLDa i residui amminoacidici leganti il Fe siano H242, D244 e H389, e che di conseguenza questi residui possano essere essenziali per l'attività enzimatica di TMLDa.

Va sottolineato che l'isoforma TMLDb conserva l' H242 ed il D244 ma non possiede la seconda delle due regioni conservate, quella cioè, che in TMLDa contiene l'istidina 389 (come si vede in figura 1b). Questo potrebbe essere indicativo del fatto che TMLDb non abbia attività idrossilasica.

### ***Saggio di attività enzimatica***

Per determinare se effettivamente TMLDb fosse attiva pur mancando dell'H389, ho preparato dei costrutti in cui l'ORF di TMLDa e TMLDb è contenuta nel vettore di espressione pcDNA3. Quindi, ho effettuato esperimenti di trasfezione transiente dei due costrutti in cellule COS-1. Gli estratti cellulari sono stati analizzati tramite HPLC tandem MS in collaborazione con il dottor Vaz dell'università di Amsterdam allo scopo di misurare la produzione di trimetil-lisina idrossilata. I risultati del saggio sono mostrati in figura 7A, dove si può vedere che TMLDa mostra un'attività del 100%, invece per TMLDb non è misurabile nessuna attività. Onde confutare l'ipotesi che l'assenza di attività fosse dovuta all'assenza della proteina, ho eseguito degli esperimenti di Western Blot utilizzando anticorpi policlonali anti TMLD (figura 8B). Il risultato di questo esperimento mostra chiaramente la presenza di TMLDb negli estratti delle cellule transfettate confermando che l'assenza di attività di TMLDb non è dovuta ad assenza della proteina ma piuttosto al fatto che TMLDb manca della regione al C-terminale necessaria per l'attività enzimatica. Per dimostrare che è proprio l'H389 ad essere essenziale per l'attività idrossilasica di TMLD, ho effettuato un esperimento di mutagenesi sito diretta in cui l'H389 di TMLDa è stata mutata in una lisina, il costrutto TMLDa H389L è stato quindi transfettato e saggiato, ed anche in questo caso non ho ottenuto nessuna attività enzimatica pur riscontrando per western la presenza della proteina (figura 8A).

Rimaneva comunque da capire quale potesse essere la funzione di questa isoforma alternativa TMLDb, che pur essendo priva di attività è espressa allo stesso modo della forma attiva TMLDa. Per verificare se la presenza di TMLDb potesse avere un'influenza sull'attività di

TMLHa , ho effettuato degli esperimenti di cotrasfezione in cui il vettore pcDNA3 contenente l'ORF di TMLDa e quello contenente l'ORF di TMLDb sono stati trasfettati in un rapporto di 1:1, lo stesso è stato fatto con i vettori pcDNA3 TMLDa wilde type ed il vettore pcDNA3 TMLDH389L, gli estratti cellulari sono poi stati saggiati per l'attività idrossilasica e per saggi di attività luciferasica. Risultato di questo esperimento è riportato in figura 10, mostra chiaramente che l'attività di TMLDa si riduce del 66% quando è espressa nella cellula contemporaneamente a TMLDb, e del 35% quando è con TMLDH389L (figura 8C). Tali differenze non sono imputabili ad una diversa efficienza di trasfezione delle cellule neli diverse sperimenti, in quanto l'attività luciferasica diretta da un plasmide di controllo introdotto contemporaneamente ai costrutti da saggiare, è stata utilizzata per misurare l'efficienza di trasfezione ed è paragonabile in tutti gli esperimenti effettuati.

## 5) Analisi di mutazione del gene *TMLD*

*MRX72* è un locus per una forma di ritardo mentale che si estende per circa 2 Mb nella Xq28 e comprende vari geni, possibili candidati causativi di questa patologia, tra i quali *TMLD*. Come detto in precedenza, la carnitina è una molecola i cui effetti pleiotropici benefici si riscontrano soprattutto nel cervello; sono molti, infatti, i dati di letteratura che attribuiscono alla carnitina un ruolo neuroprotettivo, come riscontrabile dal rallentamento, dopo somministrazione di carnitina, del deteriorarsi delle capacità cognitive in pazienti affetti da patologie neurodegenerative come l'Alzheimer. Inoltre sono riscontrabili patologie del SNC dovute a difetti nel sistema di trasporto della carnitina. Tuttavia finora nessuna patologia è stata identificata imputabile a difetti genetici degli enzimi della via biosintetica di questa molecola.

Sulla base di questi dati, avendo a disposizione campioni di DNA ed RNA di un paziente affetto da ritardo mentale *MRX72*, ho eseguito un'analisi mutazionale di *TMLD*, allo scopo di identificare eventuali alterazioni causative della patologia in questione.

Avendo a disposizione la sequenza genomica completa di *TMLD* ed avendo informazioni sulla sua struttura esoni-introni, ho disegnato coppie di oligo senso e antisenso nella porzione intronica rispettivamente al 5' e al 3' di ogni esone contenente l'ORF del gene *TMLDa*, nonché degli esoni 7b e 8b, relativi allo *splicing* alternativo che porta alla seconda isoforma del gene (*TMLDb*) (**Figura 9A**).

Ho potuto così effettuare reazioni di PCR utilizzando come stampo il DNA del paziente *MRX72*. E' stato utilizzato anche un DNA di controllo sul quale sono state messe a punto le

condizioni di PCR che poi ho utilizzato per amplificare anche gli esoni dal DNA del probando.

I prodotti di tali reazioni, che corrispondevano tutti alla lunghezza attesa, sono stati poi sequenziati e si è giunti ai seguenti risultati: tutti gli esoni di *TMLD* nel paziente *MRX72* sono perfettamente identici alla sequenza di controllo e alla sequenza del gene presente in banca dati, fatta eccezione per l'esone 7 dell'isoforma *TMLDb* in cui risultava esserci una mutazione puntiforme ed in particolare una sostituzione di una guanina con una timidina in terza base; tale mutazione porta al cambiamento della tripletta ATG in ATT, con la conseguente sostituzione dell'amminoacido Metionina con una Isoleucina (**Figura 9B**).

Allo scopo di verificare se tale sostituzione fosse associata alla patologia in studio, sono state eseguite PCR di controllo, usando gli oligonucleotidi che amplificano l'esone 7 dell'isoforma *b* di *TMLD*, su DNA di 50 femmine controllo (per un totale di 100 cromosomi X). Dopo sequenziamento dei prodotti di PCR, ho potuto dimostrare che la variazione della tripletta ATG in ATT è presente anche in individui controllo, dimostrando, quindi, che si tratta di un polimorfismo del DNA.

Avendo escluso la presenza di mutazioni nel DNA del paziente *MRX72*, ho voluto quindi accertarmi che il gene fosse espresso. A tale proposito ho preparato il cDNA da mRNA di linfociti del probando ed ho effettuato reazioni di RT-PCR. L'amplificazione di questi frammenti mi ha permesso di stabilire che entrambi i trascritti presi in considerazione sono espressi (**Figura 9C**).

Da questa prima analisi effettuata, quindi, il gene *TMLD* sembra non essere implicato nel Ritardo Mentale *MRX72*

## **6) Studio degli ortologi del gene *TMLD***

### **Biosintesi della carnitina ed evoluzione**

La biosintesi della carnitina è un processo molto antico, infatti la presenza di alcuni degli enzimi implicati in questa via è riscontrabile già nei procarioti (Rebouche et al.;1998).

La carnitina svolge in questi microrganismi ruoli diversi a secondo delle diverse specie e delle condizioni di ossigenazione o di crescita anaerobica in cui quest'ultimi vivono (Rebouche et al.;1998); in alcuni batteri come *Peudomonas auriginosa*, la carnitina è l'unica fonte di scheletri di carbonio, in altre specie come *Serratia marcescens*, la carnitina è utilizzata per la produzione di trimetilammine, nel batterio *Eschierichia coli* invece si verifica il processo di degradazione della carnitina a  $\beta$ -butirrobetaina; quest'ultimo processo non è presente nei

mammiferi in quanto in questi organismi non esistono enzimi del catabolismo della carnitina. La presenza degli intermedi della degradazione di questa molecola nelle urine dell'uomo viene spiegata dalla presenza nell'intestino umano del batterio *E. coli* (Rebouche et al;1984). Dati informatici sembrano dimostrare che gli enzimi della biosintesi sono presenti solo in quei batteri in cui la carnitina svolge il ruolo di donatore di scheletri di carbonio, in quanto in questi batteri sembra non essere presente un meccanismo di trasporto di questa molecola all'interno della cellula procariotica.

Tramite la consultazione della banca dati NCBI e l'utilizzo del programma BLAST $protein$ , sono riuscita ad isolare le putative sequenze degli ortologi di TMLD ed utilizzando i programmi Multalin e ClustalW, sono riuscita ad ottenere un allineamento delle sequenze proteiche ed un albero filogenetico (figura 10). Dall'allineamento, mostrato in figura 10 si può mettere in evidenza che il motivo HxDnH necessario per il legame al ferro è conservato in tutte le proteine analizzate, confermando l'importanza che esso riveste per la corretta attività enzimatica. Dall'albero filogenetico si vede come l'enzima TMLD sia conservato nel corso dell'evoluzione, ma quale sia il suo ruolo fisiologico e quello della stessa via biosintetica della carnitina nei vari organismi, resta ancora da chiarire. Infatti come già detto, la dieta è la principale fonte di carnitina, ma è ovvio che diversi organismi hanno una dieta diversa e che quindi il trasporto di carnitina e la sua biosintesi hanno un equilibrio ed un peso diverso a secondo del posto che l'organismo occupa nella scala evolutiva..

Degli enzimi della biosintesi della carnitina si conosce veramente poco, sia a livello molecolare che a livello fisiologico, inoltre l'assenza di patologie legate a difetti di questo processo rende ancora più interessante lo studio della via stessa. In base a tutte queste considerazioni ho voluto affrontare lo studio e la caratterizzazione di TMLD non solo nell'uomo come già descritto ma anche in due classici organismi da laboratorio quali il topo ed il nematode *C. elegans*.

### ***Profilo di espressione di tmlD in m. musculus.***

Il gene *tmlD* murino è anch'esso localizzato sul cromosoma X, il suo messaggero è lungo 2224 nucleotidi e contiene una open reading frame (ORF) di 1260 nucleotidi; la proteina codificata da questo gene ha un'identità dell'88% rispetto a quella umana, ed anche questa contiene il motivo HxDnH.

In questo organismo non sembrano essere presenti trascritti alternativi.

In primo luogo ho voluto stabilire il profilo di espressione di questo gene ed ho utilizzato a tale scopo la due tecniche Northern blot e RT-PCR, il risultato dell'esperimento è mostrato in figura 11A. Come si vede il gene è ubiquitario ed è espresso già nelle prime fasi dello sviluppo.

Per vedere se questa espressione precoce fosse localizzata in particolari organi durante lo sviluppo ho, in collaborazione con il Dott. Ivan Conte dell'università di Madrid, effettuato degli esperimenti di ibridazione in situ. La sonda utilizzata è stata da me preparata e disegnata al 3' del gene. il risultato è mostrato in figura 11B, e come si vede anche dalle prime fasi dello sviluppo il gene è espresso in maniera ubiquitaria, anche se in maniera più abbondante in alcuni organi quali cervello, fegato e polmone, in particolare dopo 7 giorni dalla nascita, *tmdl* è espressa nelle cellule piramidali dell'Ippocampo (figura 12). Questo risultato potrebbe essere spiegato assumendo che in generale nelle prime fasi dello sviluppo la biosintesi di carnitina è attiva e che in particolari organi essa è la fonte principale di carnitina.

***C.elegans come animale modello per studiare la funzione della via biosintetica della carnitina.***

L'organismo *C. elegans* rappresenta un ottimo modello sperimentale in quanto: la sua intera sequenza genomica è stata completata; si conosce in maniera accurata sia l'anatomia che lo sviluppo e si può utilizzare la potente e rapida tecnica dell'RNA interferenza, che consente di spegnere i geni transientemente.

Tramite la consultazione della banca dati *wormbase* e del BLAST di NCBI ho ottenuto una tabella dei geni implicati nel metabolismo della carnitina conservati in *C.elegans*.

| ortologi in <i>c.elegans</i>                       | geni del metabolismo della carnitina umani                 |
|--|--|
| <u>Y46G5A.17</u>                                   | <i>cpt-1</i> - ( <i>Carnitine Palmitoyl Transferase</i> )  |
| <u>R07H5.2</u>                                     | <i>cpt-2</i> - ( <i>Carnitine Palmitoyl Transferase</i> )  |
| <u>dif-1</u> - ( <i>DIF</i> ferentiation abnormal) | <i>CACT</i> -( <i>carnitine/acylcarnitine traslocase</i> ) |
| <u>F52F12.1a</u>                                   | <i>OCTN2</i> ( <i>Organic Cation Transporter</i> )         |
| <u>M05D6.7</u>                                     | <i>epsilonTMLH</i>   |
| <u>D2089.5</u>                                     | <i>gammaBBH</i>  |

Tutti i geni coinvolti nel trasporto della carnitina sembrano essere conservati nel nematode, invece per gli enzimi della biosintesi sono presenti informazioni riguardanti esclusivamente TMLD e BBD, rispettivamente il primo e l'ultimo enzima.

Il gene *bbd* è localizzato sul cromosoma 2 ed è suddiviso in 7 esoni, mentre *tmdl* è altresì localizzato sul cromosoma due ma suddiviso in 6 esoni (figura 13). La proteina ceBBD (GBH-1) è lunga 421amminoacidi, mentre ceTMLD (TLH-1) è di 409 amminoacidi. Da un'analisi informatica della sequenza primaria delle due proteine ho osservato che anche in questo caso il motivo HxDnH è conservato. Inoltre anche all'N-terminale di ceTMLD è presente un putativo segnale di localizzazione mitocondriale.

Per poter confermare che effettivamente GBH-1 e TLH-1 siano gli ortologi delle due proteine umane è necessario effettuare un saggio di attività enzimatica. A tale scopo è stato necessario ottenere ceppi di lievito trasformati con l'ORF di *cebbd* e *cetmld*, in grado di esprimere, se indotti, ciascuna di queste proteine. Ho scelto per questi esperimenti il ceppo di lievito *Pichia pastoris* che è un lievito metilotrofico capace di utilizzare il metanolo come unica fonte di carbonio.

Nel lievito è presente il gene *AOX1* responsabile dell'ossidazione degli alcoli; l'espressione di questo gene è controllata a livello trascrizionale ed è indotta dal metanolo; se i lieviti crescono in un terreno contenente glucosio, l'espressione del gene è repressa anche in presenza dell'induttore, ma se la crescita avviene in glicerolo e metanolo la trascrizione di *AOX1* è indotta. Le caratteristiche del promotore *AOX1*, fanno di esso un versatile sistema di espressione utile per indurre l'espressione di proteine eterologhe in lievito.

Ho quindi utilizzato il vettore pPICZ che contiene il promotore di *AOX1* ed ho fuso a valle di esso le due ORF di *gbh-1* e *tlh-1*; ho quindi utilizzato questi vettori per trasformare il lievito. I ceppi trasformati sono stati selezionati per la resistenza alla zeocina, ne ho quindi estratto il DNA genomico e testato la presenza dei geni ricombinanti mediante la tecnica della PCR, con oligonucleotidi specifici per i due geni (figura 13). I cloni positivi a questo screening sono stati indotti con il metanolo e la produzione delle proteine è stata determinata con anticorpi policlonali anti-myc. Scelti i cloni positivi, questi sono stati inviati al Dott Vaz dell'Università di Amsterdam che effettuerà il saggio di attività. I cDNA di *tlh-1* e *gbh-1* sono stati anche clonati in un vettore d'espressione per indurre le proteine in *E. coli*, il vettore utilizzato è pPAD che consente di clonare le ORF dei geni desiderati in fusione con una coda di istidine che sono necessarie per la successiva purificazione con colonnine di Nichel. Il risultato dell'induzione e purificazione è mostrato in figura 14, come si può osservare l'induzione ha funzionato solo per GBH-1 e non per TLH-1 per il quale sarà necessario trovare un altro sistema di espressione. La proteina purificata sarà utilizzata per produrre anticorpi anti-GBH-1 che mi permetteranno di stabilire il profilo di espressione e di condurre esperimenti di RNAi in *C.elegans*.

## **DISCUSSIONE**

La carnitina è la molecola deputata al trasporto degli acidi grassi a catena lunga dal citoplasma cellulare alla matrice mitocondriale. Questo trasporto è essenziale per il metabolismo energetico della cellula in quanto è nella matrice mitocondriale che gli acidi grassi vengono  $\beta$ -ossidati; il ruolo della carnitina di trasportatore, è quello più conosciuto e meglio caratterizzato; questa molecola, però, è anche implicata in una serie di altre funzioni all'interno della cellula, e numerosi sono gli effetti pleiotropici ad essa attribuibili; questa molecola infatti, è implicata nell'immagazzinamento di energia come acilcarnitina (Carter et al., 1995), nella modulazione degli effetti tossici dei gruppi acilici scarsamente metabolizzati (Duran et al., 1990) e nel controllo e nella modulazione del rapporto tra le concentrazioni rispettivamente di acil-CoA e di CoA nei vari compartimenti cellulari (Ramsay, 2000). La principale fonte di carnitina per un organismo è la dieta, ma molti organismi sono anche in grado di attuare il processo di biosintesi della carnitina, a partire da un derivato trimetilato dell'amminoacido lisina.

La carnitina per il suo ruolo svolto nella cellula e per le sue qualità benefiche è oggetto di studio da molti anni di diversi scienziati, e molte sono le conoscenze che oggi si hanno sul suo meccanismo di trasporto dall'esterno della cellula al citoplasma, e dal citoplasma alla matrice mitocondriale. Sono anche note malattie imputabili a difetti genetici che provocano un cattivo funzionamento di entrambi questi meccanismi di trasporto, e sono descritti animali modello nei quali questo trasporto è difettivo. Tuttavia, nonostante l'impiego di questa molecola in campo farmacologico, molti dei meccanismi in cui essa è implicata e la loro regolazione rimangono da chiarire, ed in particolare ancora nulla o poco, si conosce sui geni e sulle proteine implicate nel processo di biosintesi della carnitina, e su ipotetiche malattie attribuibili a difetti in questa via.

Per questo motivo durante il mio progetto di dottorato mi sono occupata della caratterizzazione genomica e funzionale del gene che codifica per la e-Trimetil-Lisina Diossigenasi, il primo enzima della via biosintetica della carnitina. In un primo approccio mi sono dedicata allo studio di questo gene e della corrispondente proteina nell'uomo, mentre in un secondo momento mi sono dedicata alla ricerca ed allo studio dei suoi ortologhi negli organismi *Mus musculus* e *C. elegans*.

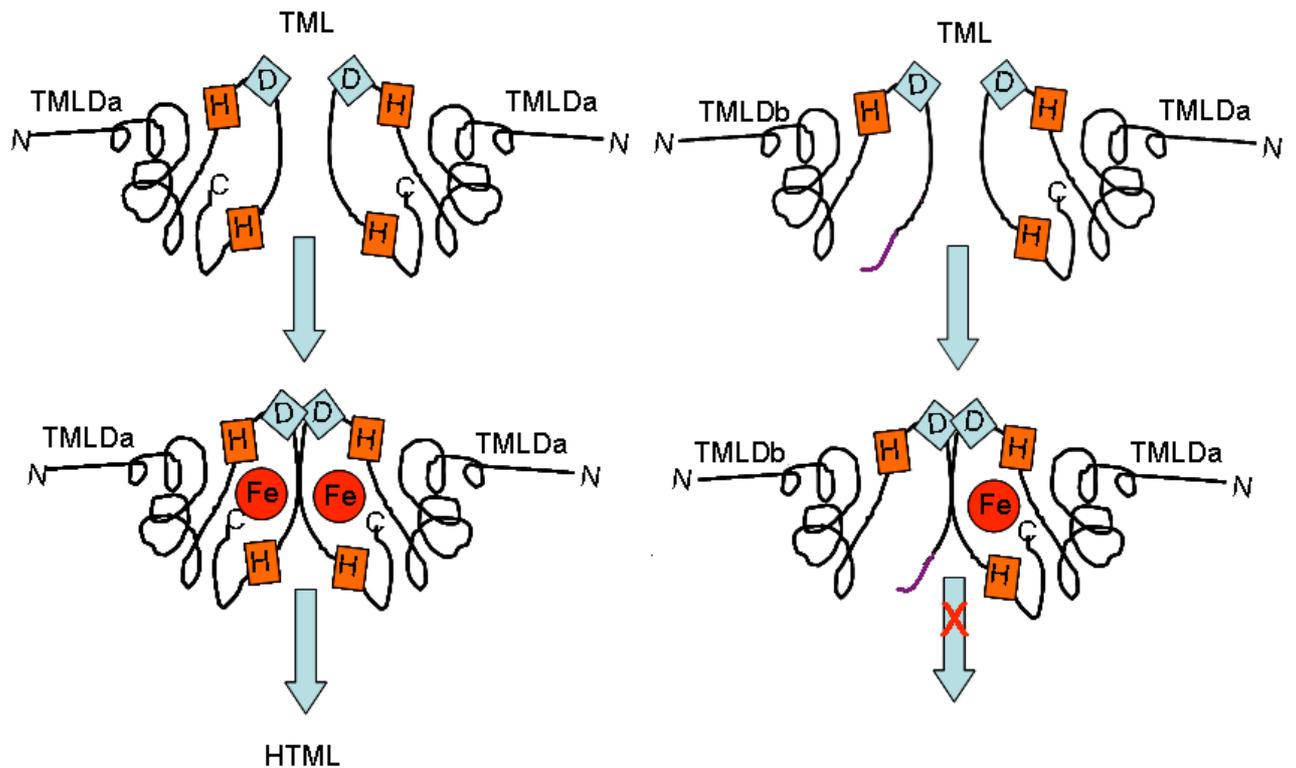
Primo risultato della caratterizzazione del gene umano *TMLD*, è stato l'isolamento di una forma alternativa di questo gene che ho chiamato *TMLDb*.

Nei geni implicati nel metabolismo della carnitina, la presenza di più messaggeri che codificano per la stessa proteina, non è una novità, sono infatti state trovate due forme del gene *OCTN2* (Brooks H et al., 2001) entrambe espresse in maniera ubiquitaria, mentre nel

caso del gene *CPTI*, sono noti tre distinti geni (*CPTIa*, *CPTIb* e *CPTIc*), con un profilo di espressione tessuto specifico, ma la caratteristica generale di queste forme alternative è che sono tutte conservate nel topo. Questo non sembra essere il caso di *TMLDb*, che è presente solo nell'uomo. Questo fenomeno forse potrebbe essere spiegato dal fatto che il gene *TMLD* è localizzato sul braccio corto del cromosoma X, in una regione abbastanza giovane evolutivamente e molto ricca di ripetute, in particolare da una approfondita analisi genomica ho trovato che gli esoni 7b ed 8b di *TMLDb* sono situati al centro di due ripetute, questo potrebbe farmi supporre che in realtà l'evento di inserzione di questa regione sia abbastanza recente nel corso dell'evoluzione, da questo la spiegazione della presenza di *TMLDb* solo nell'uomo.

La presenza di questo *splicing* alternativo del gene e della proteina da esso codificata mi sono stati molto utili anche nella caratterizzazione funzionale dell'attività diossigenasica dell'enzima. L'analisi della sequenza primaria della proteina *TMLDa*, mi ha permesso di scoprire che questa proteina fa parte della famiglia delle CAS-Like *proteins*, e come tale conserva un motivo amminoacidico caratteristico della famiglia, il motivo HxDnH. Da una comparazione tra *TMLDa* e *TMLDb* è risultato subito evidente che quest'ultima differendo al c-terminale da *TMLDa*, non conservava l'intero motivo, ma mancava della seconda istidina. Poiché i saggi di attività condotti su queste due proteine dimostravano che *TMLDb* è inattiva, ho ritenuto che l'istidina mancante, fosse necessaria per la reazione enzimatica catalizzata da *TMLD*, cosa che esperimenti di mutagenesi di questa istidina in *TMLDa*, mi hanno confermato. Poiché i messaggeri *TMLDa* e *TMLDb* sembrano essere sempre espressi negli stessi tessuti, mi sono domandata se la presenza di una forma inattiva dell'enzima, non facesse parte di meccanismo regolativo che la cellula usa allo scopo controllare l'attività di *TMLDa*. In effetti esperimenti di cotrasfezione delle due proteine hanno dimostrato che la presenza di *TMLDb* è in grado di inibire del 66% l'attività di *TMLDa*.

*TMLD* è descritta in letteratura come un dimerico (Vaz et al., 2001), questo mi potrebbe fare ipotizzare che quando nella cellula c'è necessità di trasformare la TML in HTML, si forma il dimerico *TMLDa-TMLDa* che è in grado di legare due molecole di ferro ed 2 di 2-ossoglutarato e quindi catalizzare questa reazione con il massimo dell'efficienza, in caso contrario, se nella cellula non c'è necessità di idrossilare la TML, allora si forma un dimerico *TMLDb-TMLDa*, che è in grado di legare una sola molecola di ferro e quindi idrossilare la TML con una minore efficienza. Questo meccanismo, che è schematizzato in figuraUU, rimane ancora oggi un'ipotesi in quanto a suo supporto sono necessari degli esperimenti che dimostrino che c'è un'interazione fisica tra le due proteine.



**Figura UU:** Ipotetico meccanismo di regolazione dell'attività di TMLDa, mediato da TMLDb.

La carnitina per svolgere il suo ruolo di trasportatore degli acidi grassi deve essere presente nel citoplasma, perché è qui che subisce la sua acilazione ad opera di CPTI. In effetti tutti gli enzimi della biosintesi della carnitina, come ci si aspetterebbe, sono citoplasmatici, tutti tranne uno: TMLD.

In effetti tramite l'analisi informatica della sequenza all'N-terminale di TMLD e con esperimenti di colocalizzazione cellulare, ho dimostrato che questa proteina viene traslocata nel mitocondrio.

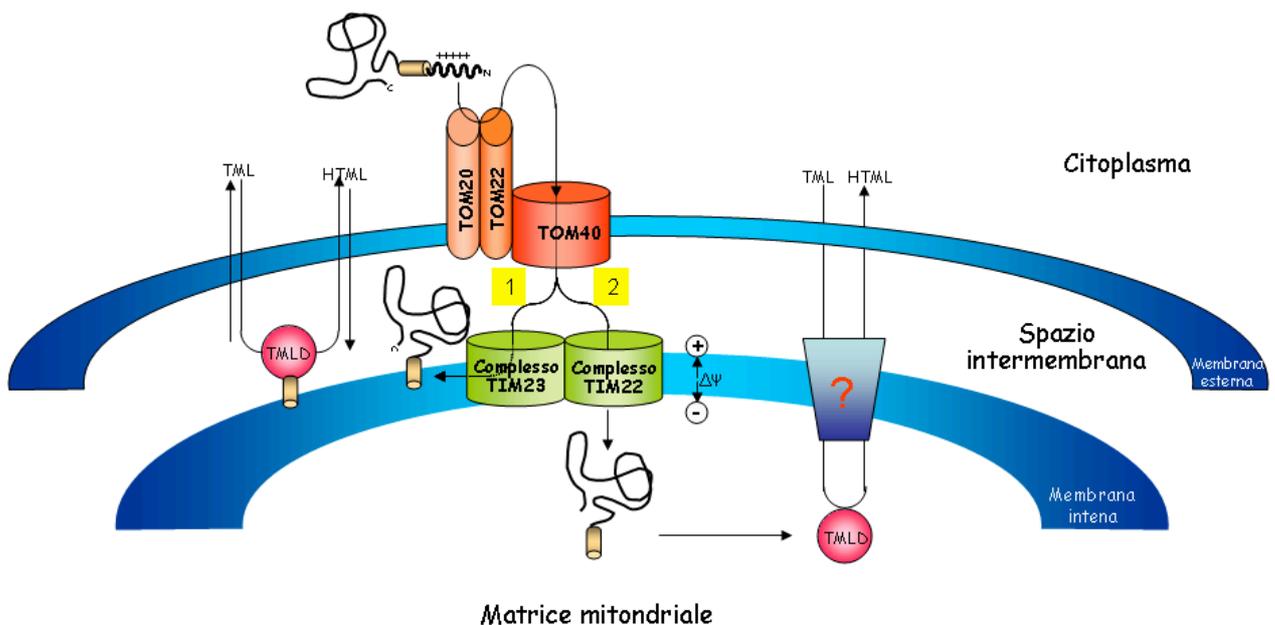
La Trimetil-Lisina è un prodotto della degradazione delle proteine, un processo che avviene nel citoplasma della cellula, questo significa che il substrato della reazione catalizzata da TMLD è localizzato principalmente nel citoplasma: se TMLD è una proteina che ritrova nella matrice mitocondriale, allora è necessario un meccanismo di trasporto della TML dal citoplasma alla matrice stessa, infatti, la membrana interna del mitocondrio è una membrana

selettiva, in quanto sede del potenziale d'azione, senza il quale il mitocondrio, non potrebbe svolgere il suo ruolo di centrale energetica della cellula.

In realtà, TMLD sembra avere un segnale che non solo le consente di essere riconosciuta dai complessi che dirigono le proteine nel mitocondrio, ma ha un segnale che è caratteristico di tutte quelle proteine che sono localizzate proprio sulla membrana interna di questo organello. Preliminari esperimenti di microscopia elettronica sembrano confermare questa ipotesi.

In questo caso, TMLD potrebbe sporgere la sua *faccia catalitica* verso lo spazio compreso tra la membrana interna e la membrana esterna, che è invece permeabile, in questo caso quindi non sarebbe necessario nessun meccanismo di trasporto della TML all'interno del mitocondrio. Le due ipotesi sono mostrate in figurazz.

Il motivo fisiologico per cui questo enzima è mitocondriale rimane ancora oscuro.



**Figurazz:** Ipotetici meccanismi di trasporto della TML nel mitocondrio

In conclusione, nell'uomo il gene *TMLD* è localizzato in una regione evolutivamente giovane del cromosoma X, e questo potrebbe essere il motivo per il quale esso ha una forma alternativa specie specifica, la cui proteina tradotta potrebbe funzionare come regolatore negativo dell'attività dell'enzima. Questo meccanismo di regolazione che sembra, a questo punto essere presente solo nell'uomo, potrebbe indicare che in organismo così evoluto è necessaria una fine regolazione del meccanismo di biosintesi della carnitina.

La localizzazione, invece di questo enzima nel mitocondrio è conservata nel corso dell'evoluzione, infatti, tutte le sequenze amminoacidiche di TMLD che sono riuscite a trovare in altri organismi, sottoposte ad una analisi informatica sembrano conservare un

segnale di localizzazione mitocondriale all'N terminale. ( è evidente quindi che per un motivo che ci sfugge TMLD per funzionare deve stare nel mitocondrio)

La dieta di un topo è indubbiamente meno complessa di quella di un essere umano, esso ha una dieta generalmente a base di prodotti granicoli, che pur contengono carnitina. Nel topo infatti, sono conservati tutti gli enzimi del trasporto della carnitina ed anche quelli della biosintesi, incluso TMLD.

Nel topo il gene *tmdl* è localizzato sul cromosoma X e la proteina da esso codificata contiene il motivo HxDnH, quindi fa parte della CAS-like *proteins*. Inoltre come appena detto essa contiene un putativo segnale di localizzazione mitocondriale. Esperimenti di ibridazione in situ hanno dimostrato che, in questo organismo, il gene *tmdl* è espresso molto precocemente durante lo sviluppo, ed in particolare allo stadio embrionale DD, esso è principalmente espresso nel polmone, nel fegato e nel cervello. Inoltre la sua espressione diventa sempre più localizzata, ed in una cavia esaminata sette giorni dopo il parto, esso è espresso nelle cellule piramidali dell'ippocampo. Questo potrebbe confortare l'ipotesi che la principale fonte di carnitina durante lo sviluppo è la biosintesi, e che quindi difetti nei geni di questa via potrebbero essere causativi di un cattivo sviluppo dell'organismo. L'embriogenesi è infatti un momento in cui c'è un grande dispendio di energia, e se l'unica o la principale fonte di carnitina è la biosintesi, un difetto in questo processo potrebbe portare ad un deficit energetico.

Anche in un organismo semplice come il nematode *C. elegans* tutti i geni del trasporto e della biosintesi di carnitina sembrano essere conservati, a dimostrazione ancora una volta dell'importanza di questa molecola. Questo nematode si nutre di batteri, che come abbiamo detto, sono in grado di produrre carnitina, o betaina un intermedio della biosintesi. Quindi in realtà possiamo dire che anche il nematode può prendere la carnitina dalla sua dieta, anche se in questo caso, data la vita che conduce l'organismo, la biosintesi potrebbe avere un ruolo predominante nella sua omeostasi energetica. Inoltre quando l'organismo è in condizione avverse di nutrimento e di disponibilità di cibo, esso è in grado di entrare in una fase di stasi che ne consente la sopravvivenza con il minimo indispensabile. Per questi motivi *C. elegans* è il candidato perfetto per studiare la fisiologia e l'importanza della biosintesi di carnitina.

## **BIBLIOGRAFIA**

Alesci S, De Martino MU, Kino T, Ilias I. **L-Carnitine is a modulator of the glucocorticoid receptor alpha.** Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun;1024:147-52. Review.

Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Hatem S, Laurent G, Levade T, Mercadier JJ. **L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation.** FASEB J. 1999 Sep;13(12):1501-10.

Ahringer J. **Embryonic tissue differentiation in *Caenorhabditis elegans* requires dif-1, a gene homologous to mitochondrial solute carriers.** EMBO J. 1995 May 15;14(10):2307-16.

Aradhya S, Woffendin H, Bonnen P, Heiss NS, Yamagata T, Esposito T, Bardaro T, Poustka A, D'Urso M, Kenwrick S, Nelson DL. **Physical and genetic characterization reveals a pseudogene, an evolutionary junction, and unstable loci in distal Xq28.** *Genomics*. 2002. 79:31-40.

Benvenga S, Amato A, Calvani M, Trimarchi F. **Effects of carnitine on thyroid hormone action.** Ann N Y Acad Sci. 2004 Nov;1033:158-67. Review.

Bonavita, E. **Study of the efficacy and tolerability of L-acetylcarnitine therapy in the senile brain.** Int J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. (1986) 24, 511-516

Bremer J. **Carnitine--metabolism and functions.** Physiol Rev. 1983 Oct;63(4):1420-80.

Bresolin N, Freddo L, Vergani L, Angelini C **Carnitine, carnitine acyltransferases, and rat brain function.** Exp Neurol. 1982 Nov;78(2):285-92.

Coulson A, Kozono Y, Lutterbach B, Shownkeen R, Sulston J, Waterston R. **YACs and the *C. elegans* genome.** Bioessays. 1991 Aug;13(8):413-7.

Dolezal V, Tucek S. **Utilization of citrate, acetylcarnitine, acetate, pyruvate and glucose for the synthesis of acetylcholine in rat brain slices.** J Neurochem. 1981 Apr;36(4):1323-30.

Emmons SW. **Mechanisms of *C. elegans* development.** Cell. 1987 Dec 24;51(6):881-3. Review

Enomoto A, Wempe MF, Tsuchida H, Shin HJ, Cha SH, Anzai N, Goto A, Sakamoto A, Niwa T, Kanai Y, Anders MW, Endou H. **Molecular identification of a novel carnitine transporter**

**specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition.** J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):36262-71.

Fritz IB, Hsu MP. **Studies on the control of fatty acid synthesis. I. Stimulation by (+)-palmitylcarnitine of fatty acid synthesis in liver preparations from fed and fasted rats.** J Biol Chem. 1967 Mar 10;242(5):865-72.

Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. **Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation.** *Nat Genet.* 1996.13:105-8.

Grundemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schomig E. **Discovery of the ergothioneine transporter.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 5;102(14):5256-61.

Hu Z, Dai Y, Prentki M, Chohnan S, Lane MD. **A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake.** J Biol Chem. 2005 Oct 11;

Hurvitz H, Klar A, Korn-Lubetzki I, Wanders RJ, Elpeleg ON. **Muscular carnitine palmitoyltransferase II deficiency in infancy.** *Pediatr Neurol.* 2000 Feb;22(2):148-50.

Kaminska J, Nalecz KA, Nalecz MJ. (1995) **Mechanism of carnitine transport catalyzed by carnitine carrier from rat brain mitochondria.** *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 55, 1-9.

Kaminska J, Nalecz KA, Azzi A, Nalecz MJ. (1993) **Purification of carnitine carrier from rat brain mitochondria.** *Biochem Mol Biol Int.* 29, 999-1007.

Kido Y, Tamai I, Ohnari A, Sai Y, Kagami T, Nezu J, Nikaido H, Hashimoto N, Asano M, Tsuji A. **Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood-brain barrier.** J Neurochem. 2001 Dec;79(5):959-69.

Koizumi T, Nikaido H, Hayakawa J, Nonomura A, Yoneda T. **Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2(0) strain of mouse with similarities to Reye's syndrome.** *Lab Anim.* 1988 Jan;22(1):83-7.

[Liu HX, Zhang JJ, Zheng P, Zhang Y.](#) **Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment.** *Brain Res Mol Brain Res.* 2005 Jun 15;

Llansola M, Felipo V. **Carnitine prevents NMDA receptor-mediated activation of MAP-kinase and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 in cerebellar neurons in culture.** *Brain Res.* 2002 Aug 23;947(1):50-6.

Mizgalska, J.A., Berent, U., Mac, M., Oestreicher, A.B., De Graan, P.N.E., Gispen, W.H., Nalecz, M.J. & Nalecz, K.A. (1998) **Accumulation of palmitoylcarnitine in neuroblastoma NB-2a cell affects the expression, phosphorylation and localization of B-50 protein.** *Neurosci. Res. Commun.* 22,73-81

Mroczkowska JE, Roux FS, Nalecz MJ, Nalecz KA. (2000) **Blood-brain barrier controls carnitine level in the brain: a study on a model system with RBE4 cells.***Biochem Biophys Res Commun.* 267, 433-7.

Mynatt RL, Greenhaw JJ, Cook GA. **Cholate extracts of mitochondrial outer membranes increase inhibition by malonyl-CoA of carnitine palmitoyltransferase-I by a mechanism involving phospholipids.** *Biochem J.* 1994 May 1;299 ( Pt 3):761-7.

Nakanishi T, Hatanaka T, Huang W, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy ME, Ganapathy V. **Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB(0,+)<sup>-</sup> from mouse colon expressed in HRPE cells and Xenopus oocytes.** *J Physiol.* 2001 Apr 15;532(Pt 2):297-304.

Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A. **Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter.** *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1):91-4.

- Nikaido H, Horiuchi M, Hashimoto N, Saheki T, Hayakawa J. **Mapping of jvs (juvenile visceral steatosis) gene, which causes systemic carnitine deficiency in mice, on chromosome 11.** Mamm Genome. 1995 May;6(5):369-70.
- Nyman LR, Cox KB, Hoppel CL, Kerner J, Barnoski BL, Hamm DA, Tian L, Schoeb TR, Wood PA. **Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse.** Mol Genet Metab. 2005 Sep-Oct;86(1-2):179-87.
- Oey NA, Ijlst L, van Roermund CW, Wijburg FA, Wanders RJ. **dif-1 and colt, both implicated in early embryonic development, encode carnitine acylcarnitine translocase.** Mol Genet Metab. 2005 Jun;85(2):121-4.
- Okimoto R, Macfarlane JL, Clary DO, Wolstenholme DR. **The mitochondrial genomes of two nematodes, Caenorhabditis elegans and Ascaris suum.** Genetics. 1992 Mar;130(3):471-98.
- Pfanner, N., Geissler, A., (1999) **Versatility of the mitochondrial protein import machinery.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2, 339-49
- Pisano C, Pratesi G, Laccabue D, Zunino F, Lo Giudice P, Bellucci A, Pacifici L, Camerini B, Vesci L, Castorina M, Cicuzza S, Tredici G, Marmiroli P, Nicolini G, Galbiati S, Calvani M, Carminati P, Cavaletti G. **Paclitaxel and Cisplatin-induced neurotoxicity: a protective role of acetyl-L-carnitine.** Clin Cancer Res. 2003 Nov 15;9(15):5756-67.
- Rapaport D. **Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins.** EMBO Rep. 2003 Oct;4(10):948-52.
- Rebouche CJ, Seim H. **Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals.** Annu Rev Nutr. 1998;18:39-61.
- Rebouche CJ, Bosch EP, Chenard CA, Schabold KJ, Nelson SE. **Utilization of dietary precursors for carnitine synthesis in human adults.** J Nutr. 1989 Dec;119(12):1907-13.

- Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Waterham HR, Wanders RJ. **Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects.** *Mol Aspects Med.* 2004 Oct-Dec;25(5-6):521-32.
- Russo S, Cogliati F, Cavalleri F, Cassitto MG, Giglioli R, Toniolo D, Casari G, Larizza L. **Mapping to distal Xq28 of nonspecific X-linked mental retardation MRX72: linkage analysis and clinical findings in a three-generation Sardinian family.** *Am J Med Genet.* 2000. 94:376-82.
- Santoro A, Lioi MB, Monfregola J, Salzano S, Barbieri R, Ursini MV. **L-Carnitine protects mammalian cells from chromosome aberrations but not from inhibition of cell proliferation induced by hydrogen peroxide.** *Mutat Res.* 2005 Sep 13;
- Saheki T, Tomomura M, Horiuchi M, Imamura Y, Tomomura A, Abdullah Abue Musa D, Kobayashi K. **Abnormal gene expression causing hyperammonemia in carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice.** *Adv Exp Med Biol.* 1997;420:159-72.
- Shoji Y, Koizumi A, Kayo T, Ohata T, Takahashi T, Harada K, Takada G **Evidence for linkage of human primary systemic carnitine deficiency with D5S436: a novel gene locus on chromosome 5q.** *Am J Hum Genet.* 1998 Jul;63(1):101-8.
- Shug AL, Schmidt MJ, Golden GT, Fariello RG. **The distribution and role of carnitine in the mammalian brain.** *Life Sci.* 1982 Dec 20;31(25):2869-74.
- Spagnoli A, Lucca U, Menasce G, Bandera L, Cizza G, Forloni G, Tettamanti M, Frattura L, Tiraboschi P, Comelli M, et al. **Long-term acetyl-L-carnitine treatment in Alzheimer's disease.** *Neurology.* 1991 Nov;41(11):1726-32.
- Steiber A, Kerner J, Hoppel CL. **Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective.** *Mol Aspects Med.* 2004 Oct-Dec;25(5-6):455-73.
- Sulston JE, Brenner S. **The DNA of *Caenorhabditis elegans*.** *Genetics.* 1974 May;77(1):95-104.

- Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. **Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.** *J Biol Chem.* 1998 Aug 7;273(32):20378-82.
- Tamai I, China K, Sai Y, Kobayashi D, Nezu J, Kawahara E, Tsuji A. **Na(+)-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney.** *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jun 6;1512(2):273-84.
- Tein I, Demaugre F, Bonnefont JP, Saudubray JM. **Normal muscle CPT1 and CPT2 activities in hepatic presentation patients with CPT1 deficiency in fibroblasts. Tissue specific isoforms of CPT1?** *J Neurol Sci.* 1989 Sep;92(2-3):229-45.
- Tomomura M, Imamura Y, Horiuchi M, Koizumi T, Nikaido H, Hayakawa J, Saheki T. **Abnormal expression of urea cycle enzyme genes in juvenile visceral steatosis (jvs) mice.** *Biochim Biophys Acta.* 1992 Feb 14;1138(2):167-71.
- Toniolo D. **In search of the MRX genes.** *Am J Med Genet.* 2000. 97:221-7.
- Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della Barbera M, Dona M, Peluso G, Calvani M, Mosconi L, Dalla Libera L. **L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep;283(3):C802-10.
- Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham JM Jr, Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB. **A locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq28.** *Am J Hum Genet.* 2002. 70:1003-8.
- Wang Y, Ye J, Ganapathy V, Longo N. **Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2356-60.
- Wawrzencyk A, Sacher A, Mac M, Nalecz MJ, Nalecz KA. (2001). **Transport of L-carnitine in isolated cerebral cortex neurons.** *Eur J Biochem.* 268,2091-8.

Wawrzencyk A, Nalecz KA, Nalecz MJ (1994). **Synergistic effect of choline and carnitine on acetylcholine synthesis in neuroblastoma NB-2a cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 202, 354-9.

Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A.(1999)  
**Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations.**  
*J Pharmacol Exp Ther.* May;289(2):768-73.