



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA MOLECOLARE

Elaborato di Laurea

**CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI ETHE1, UNA
ZOLFO DISSIGENASI COINVOLTA
NELL'ENCEFALOPATIA ETILMALONICA**

Tutor: Prof. Rodolfo Costa
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Giorgia Leto

Anno Accademico: 2009/2010

ABSTRACT

ETHE1 è un gene nucleare che codifica per una proteina mitocondriale. La perdita di funzione di tale gene causa l'encefalopatia etilmalonica, una malattia autosomica recessiva infantile. Il trascritto ETHE1 viene tradotto in un precursore inattivo e processato ad una forma matura in seguito al taglio intramitocondriale del peptide leader. Per approfondire il quadro clinico e biochimico dovuto a mutazioni del gene ETHE1, sono stati generati topi knock-out $ETHE1^{-/-}$, nei quali è stata riscontrata una concentrazione di solfuro di idrogeno molto maggiore rispetto a quella dei topi wildtype. I risultati ottenuti dallo studio dei tessuti murini indicano che la EE è una malattia che determina l'accumulo di H_2S in alcuni tessuti, che vengono danneggiati. È stata rilevata una diminuzione dell'attività della zolfo diossigenasi nei topi $ETHE1^{-/-}$ e un aumento dell'attività nelle cellule HeLa in cui ETHE1 era sovraespressa. La proteina ETHE1 quindi codifica per una zolfo diossigenasi, la cui funzione è di detossificare le cellule da H_2S . La perdita di funzione di tale enzima porta all'accumulo di solfuro di idrogeno che determina la comparsa dei sintomi tipici della EE. L'identificazione della funzione di ETHE1 permette di ricercare strategie terapeutiche per migliorare le condizioni di vita dei pazienti e aumentarne la sopravvivenza.

STATO DELL'ARTE

ETHE1 è un gene nucleare il cui prodotto proteico è localizzato nei mitocondri. I mitocondri sono organelli che derivano da un'associazione endosimbiontica tra una cellula proto-eucariotica glicolitica e un batterio ossidativo (solforodobatterio).⁽¹⁾ Proprio per la natura endosimbiontica dei mitocondri, sono stabilite specifiche interazioni, ancora poco conosciute, tra il DNA nucleare e quello mitocondriale. I mitocondri sono la sede della respirazione cellulare, come evidenziato dalla figura sottostante.⁽¹⁾

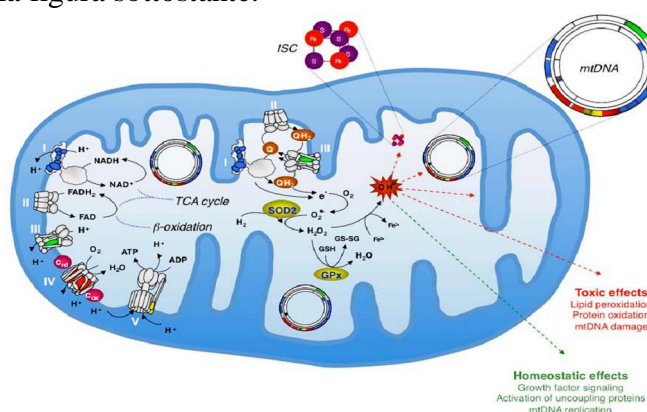


Fig. 1: da "Multisystem manifestations of mitochondrial disorders"; Di Donato (2009).

I cinque complessi enzimatici della catena respiratoria sono responsabili della fosforilazione ossidativa, meccanismo che genera la maggior parte dell'energia della cellula. La catena respiratoria è l'unica struttura nel mondo animale controllata da due genomi, nucleare e mitocondriale.⁽¹⁾ Una conseguenza di questo controllo genetico consiste nel fatto che le malattie mitocondriali sono associate

ad un'ereditarietà mendeliana, se sono causate da una mutazione in un gene nucleare, e ad un'ereditarietà materna, quindi extranucleare, se sono causate da una mutazione in un gene mitocondriale. Normalmente, il genotipo mitocondriale di ogni individuo è composto da un singolo tipo di mtDNA, una condizione detta di omoplasmia. Il DNA mitocondriale ha una tendenza intrinseca a mutare e questo può portare ad una condizione di eteroplasmia, nella quale i genomi wildtype e mutato coesistono all'interno della cellula. Alla divisione cellulare i mitocondri vengono stocasticamente distribuiti alle cellule figlie, quindi solo un numero ristretto di molecole di mtDNA sono trasferite casualmente in ogni oocita. Per questo motivo, a differenza delle mutazioni in geni nucleari, quelle in geni mitocondriali rivelano un'estrema variabilità di manifestazioni cliniche. Le correlazioni genotipo-fenotipo nelle mutazioni puntiformi perciò, non sono ben definite. La segregazione mitotica di una mutazione è un evento random, quindi gli effetti della mutazione sono non lineari. Solo un numero limitato di organi o tessuti esprimono la patologia. Le mutazioni in geni nucleari che codificano per proteine mitocondriali associate alla fosforilazione ossidativa causano soprattutto malattie neurodegenerative e le strutture più colpite sono quelle che richiedono un maggior apporto di energia, come il sistema nervoso centrale e periferico, il sistema uditivo e visivo, il cuore, i muscoli, il pancreas endocrino, il rene e il fegato. Centinaia di mutazioni nei geni nucleari, più di 200 mutazioni puntiformi e innumerevoli delezioni del mtDNA causano deficienza della fosforilazione ossidativa.⁽¹⁾ Mi occupo in particolare dello studio di ETHE1, gene nucleare che mappa nel locus 19q13.32, si estende per 20525 paia di basi e consta di 7 esoni. Il trascritto è di circa 1000 nucleotidi e codifica per una proteina mitocondriale espressa in modo ubiquitario. Mutazioni in ETHE1 causano l'encefalopatia etilmalonica (EE), una devastante malattia metabolica multisistemica infantile, autosomica recessiva, che colpisce il cervello, il tratto gastrointestinale e i vasi periferici, provocando encefalopatia, ritardo e regressione dello sviluppo neurologico, deterioramento del sistema nervoso, diarrea cronica, microangiopatia, petecchie e acrocianosi. Alterazioni biochimiche sono un'elevata escrezione di acido etilmalonico e acido metilsuccinico nell'urina, alte concentrazioni di acilcarnitine C4 e C5 nel sangue, acidosi lattica e un decremento dell'attività della citocromo c ossidasi (COX) nel muscolo scheletrico, sintomi che portano a morte generalmente nella prima decade di vita.⁽²⁾

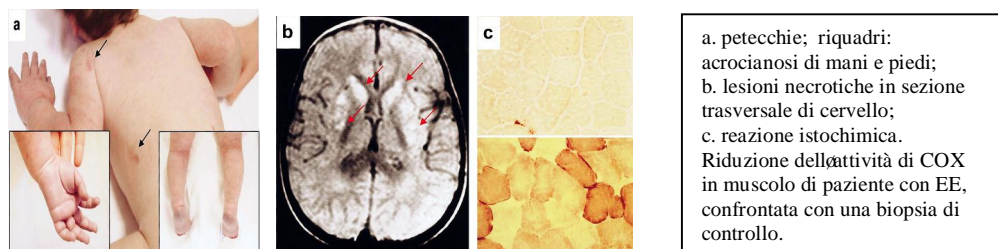


Fig. 2: modificato da "Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein"; Tiranti et al. (2004).

L'EE è stata originariamente riscontrata in famiglie italiane. La maggior parte dei pazienti con tale patologia sono di discendenza mediterranea o araba e appartengono a gruppi etnici caratterizzati da significativi livelli di consanguineità. Non più di 40 casi di EE sono stati descritti finora e ciò fa supporre che l'encefalopatia etilmalonica sia una malattia autosomica recessiva molto rara. Si pensa però che l'attuale incidenza della patologia sia stata significativamente sottostimata perché il fenotipo biochimico potrebbe essere erroneamente attribuito ad altre malattie metaboliche.⁽²⁾ Il gene *ETHE1* era precedentemente conosciuto come *HSCØ* (hepatoma subtracted clone one). Dato il suo ruolo nell'encefalopatia etilmalonica, il nome del gene è stato cambiato in *ETHE1*.⁽²⁾ Per identificare il gene responsabile della EE, è stato adottato un approccio genomico integrativo, per selezionare una lista di pochi geni candidati in base alla loro funzione, fra circa 130 sequenze geniche presenti nell'intervallo critico di circa 3 cM definito da analisi di linkage. Tenendo conto delle caratteristiche cliniche e biochimiche di EE, si è supposto che la proteina responsabile di tale malattia fosse coinvolta nel metabolismo mitocondriale. Sono stati quindi selezionati quei geni con funzione sconosciuta ma potenzialmente collegata ai mitocondri. Per ogni gene è stato definito il *neighborhood index*, un valore che viene attribuito ai geni che sono associati ai mitocondri, trovati in una serie di geni che condividono un profilo di espressione identico o molto simile a quello del gene di interesse. Sono stati evidenziati i geni con valori di *neighborhood index* più alti e tra questi, *ETHE1* è stato considerato il gene più attendibile.⁽²⁾ Analizzando gli aplotipi di famiglie consanguinee, non consanguinee e di individui singoli, è stata dimostrata la co-segregazione delle mutazioni in *ETHE1* con la malattia. Nei pazienti analizzati, sono state trovate 16 mutazioni che portano a perdita di funzione perché producono uno stop, un frameshift o uno splicing aberrante. In una famiglia l'intero gene era mancante e in 2 famiglie mancava l'esone 4 in entrambi gli alleli. Sono state rilevate anche 6 mutazioni missenso che determinano un cambiamento amminoacidico in regioni altamente conservate del gene.⁽²⁾ Studi preliminari suggerivano che la proteina *ETHE1* fosse diffusamente presente nel citoplasma di cellule in coltura e che venisse occasionalmente trovata nel nucleo, nel quale avrebbe agito come proteina shuttle per controllare il traffico nucleo-citoplasma del fattore di trascrizione NF- κ B. Era stato ipotizzato un ruolo della proteina nell'inibizione dell'apoptosi dipendente da p-53, data la sua capacità di interazione con NF- κ B.⁽²⁾ Ma studi di immunofluorescenza hanno dimostrato l'esclusiva localizzazione mitocondriale di *ETHE1* poiché sia nelle cellule COS-7 che esprimono transientemente *ETHE1*^{HA}, sia nelle cellule HeLa che la esprimono stabilmente, il pattern di immunofluorescenza specifico per la proteina *ETHE1*^{HA} è identico a quello ottenuto mediante l'uso di Mitotracker, una colorazione specifica per il mitocondrio.⁽²⁾

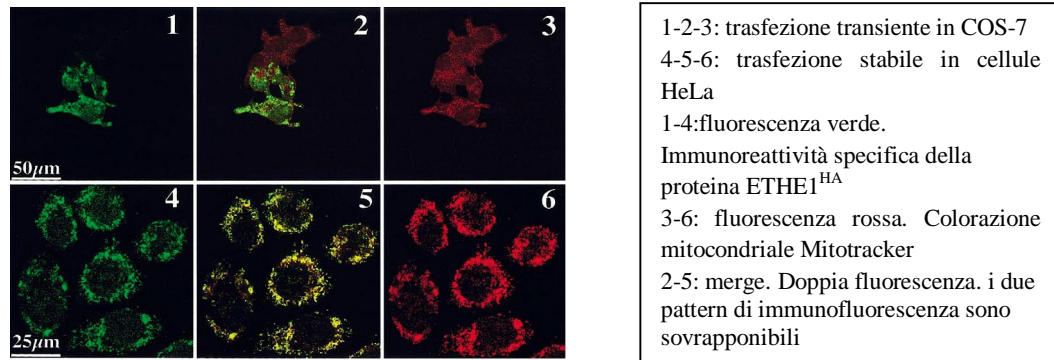


Fig. 3: da δ Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in Ethe1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein; Tiranti et al. (2004).

La struttura cristallina, la gel filtrazione quantitativa e le analisi Western Blot su 2D-BNE rivelano un'organizzazione dimerica della proteina. Il peso molecolare predetto di ETHE1 è 28 KDa. Su Western Blot, la banda corrispondente a ETHE1 è di circa 55 KDa. Se il campione viene precedentemente riscaldato, risulta una banda di 28 KDa. Il calore determina la rottura del complesso. Ciò significa che i legami tra le subunità sono non covalenti e la banda di 28 KDa corrisponde ad un monomero di ETHE1. La regione di interfaccia per la formazione dell'omodimero si localizza nella parte centrale della catena amminoacidica.⁽³⁾ La proteina ETHE1 è filogeneticamente conservata e condivide un'elevata omologia di sequenza e strutturale con Glyo-II.⁽²⁾ Le gliossilasi sono enzimi coinvolti nella detossificazione chimica perché convertono, in presenza di glutatione, delle α -chetoaldeidi tossiche nei corrispondenti idrossiacidi. Per testare se la proteina ETHE1 fosse una Glyo-II mitocondriale, è stata misurata l'attività specifica di Glyo-II in mitocondri isolati da cellule HeLa^{ETHE1}. Mentre ETHE1 è fortemente espressa nei mitocondri delle cellule HeLa^{ETHE1}, l'espressione di Glyo-II è molto bassa. L'attività di quest'ultimo enzima è maggiore nella frazione citosolica.⁽²⁾ La struttura cristallografica della proteina ETHE1 di *Arabidopsis thaliana* è stata risolta e ciò ha permesso di evidenziare il tipico folding della superfamiglia delle β -lattamasi e la presenza di un sito di legame per due ioni metallici, caratteristiche presenti anche in Glyo-II. La superfamiglia delle β -lattamasi contiene una sequenza consenso, HXHXD(X)H, che si pensava fosse il sito di legame per Zn(II).⁽²⁾ La similarità della proteina codificata da ETHE1 con Glyo-II, la conservazione della sequenza consenso della β -lattamasi e del sito di legame per il glutatione, così come le anomalie nelle vie metaboliche mitocondriali associate ad EE, suggerivano che la proteina ETHE1 fosse un enzima, probabilmente una tioesterasi, della superfamiglia delle β -lattamasi, coinvolta nel metabolismo di un substrato sconosciuto.⁽³⁾ In conclusione, benché l'encefalopatia etilmalonica fosse nota alla comunità scientifica fin dai primi anni Novanta, non era ancora chiaro quale fosse la causa di tale malattia. Il primo indizio chiave è stato trovato nel 2004, quando è stato individuato il gene alterato: ETHE1. Gli studi successivi furono pertanto mirati alla scoperta della funzione di ETHE1, rimasta sconosciuta

fino al 2009. Lo scopo di questo elaborato è analizzare le metodologie sperimentali che hanno permesso di approfondire lo studio di ETHE1 e che hanno portato alla scoperta della funzione di tale gene.

APPROCCIO SPERIMENTALE

Processamento mitocondriale: il cDNA full length di ETHE1 umano è stato retrotrascritto da un estratto di RNA totale dei fibroblasti umani di individui affetti da EE e da individui controllo ed è stato amplificato mediante PCR. È stato poi marcato sull'estremità 3' con la sequenza codificante un epitopo del virus dell'influenza, l'emoagglutinina, HA (ETHE1^{HA}). Il costrutto è stato inserito nel vettore plasmidico eucariotico di espressione pcDNA 3.1 mediante l'utilizzo di opportuni enzimi di restrizione. I plasmidi ricombinanti sono stati trasfettati mediante elettroporazione in cellule COS-7 per un'espressione transiente, e in cellule HeLa, per un'espressione stabile.⁽²⁾ Da queste cellule sono state isolate le proteine della matrice mitocondriale e sull'estratto proteico è stata effettuata l'elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS 12%. Per individuare quale delle bande elettroforetiche corrispondeva alla proteina ETHE1^{HA}, è stata effettuata l'analisi Western Blot, che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. È stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-HA, per far immunoprecipitare le proteine target ed è stato utilizzato il kit di chemiluminescenza ECL per evidenziarle.⁽²⁾

-purificazione proteina ETHE1 da cellule HeLa: per mappare precisamente il sito di taglio, ETHE1^{HA} è stata fatta esprimere stabilmente in cellule HeLa, dalle quali sono stati successivamente isolati i mitocondri. Il protocollo utilizzato è stato messo a punto in precedenza da Shuey et al.⁽⁴⁾ In particolare, la procedura di purificazione prevede che una coltura, generalmente di 3-15 litri, di cellule HeLa in sospensione in un mezzo di Eagle modificato con l'aggiunta di siero di vitello 5%, venga fatta crescere fino alla fase esponenziale. Dopo l'omogeneizzazione in un mezzo ipotonico, i mitocondri vengono isolati mediante centrifugazione differenziale. Una prima centrifugazione a 500 x g per 10 minuti determina la formazione di un pellet contenente la frazione nucleare. Sul supernatante si effettua una seconda centrifugazione a 10000 x g per 20 minuti, mediante la quale si ottiene un pellet contenente la frazione mitocondriale. Il pellet mitocondriale finale viene risospeso con il buffer A (Tris, che è il tampone di estrazione; MgCl₂; EDTA, che inibisce le metalloproteasi e rimuove ioni metallici che possono reagire con gruppi tiolici; ditiotreitolo (DTT), riducente; fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), inibitore di serin proteasi; glicerolo) e viene lisato immediatamente. In alternativa può essere congelato in azoto liquido, posto a -80°C ed utilizzato successivamente. La sospensione mitocondriale viene in seguito omogeneizzata 5 volte con un pestello motorizzato Teflon, vengono aggiunti il detergente Tween-20 e KCl, la miscela viene messa nel vortex e posta successivamente in ghiaccio per 5-10 minuti. L'omogeneizzazione viene ripetuta

10 volte, ottenendo infine il lisato mitocondriale. Questo viene utilizzato subito oppure congelato in azoto liquido e posto a -80°C . Il lisato mitocondriale viene centrifugato a 33 Krpm ($100.000 \times g$) per 15 minuti. Il supernatante viene dializzato per 2 ore contro un litro di buffer A, con l'aggiunta di Tween-20 e KCl, e viene posto su una colonna cromatografica⁽⁴⁾. ETHE1^{HA} viene purificata mediante cromatografia per affinità, tecnica basata sull'affinità di legame di una proteina e che è quindi in grado di raggiungere una purificazione completa in una o poche tappe. Una colonna viene riempita con la fase stazionaria, un materiale solido poroso HA-specifico, contenente quindi gruppi funzionali che legano reversibilmente HA. Attraverso questo materiale solido, viene fatta percolare una soluzione tampone, la fase mobile. La soluzione contenente le proteine è posta sulla sommità della colonna e lasciata poi percolare attraverso il materiale solido. La proteina ETHE1^{HA} si lega alla fase stazionaria nella colonna e la sua migrazione rallenta. Nel buffer di eluizione viene posta in seguito un'alta concentrazione di HA libero, in modo tale che la proteina ETHE1^{HA} venga eluita, cioè non interagisca più con i gruppi reattivi della colonna.⁽⁵⁾ Si ottiene quindi la proteina di interesse eluita nella soluzione tampone.

-identificazione dell'N-terminale di ETHE1: la proteina ricombinante purificata è stata poi posta in elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS 12% e le bande sono state evidenziate mediante il colorante EZ-blu. La posizione della proteina è stata confrontata con quella di proteine a massa molecolare nota ed è stata eluita la banda di circa 30 KDa mediante elettroeluizione, che consiste nell'applicare un campo elettrico perpendicolare a quello utilizzato per l'elettroforesi, in modo da far migrare la proteina fuori dal gel. ETHE1^{HA} di 30 KDa è stata digerita con la proteasi V8, che taglia a livello di residui di glutammato, e i frammenti ottenuti sono stati analizzati mediante spettrometria MALDI-TOF. Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è lo spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto. Vengono introdotti nello strumento pochi microgrammi dell'analita e in queste condizioni la maggior parte degli analiti è in fase gassosa. Sono adottate varie metodiche di ionizzazione, tra cui la tecnica MALDI, che consiste nell'assorbire il campione su una matrice che, una volta portata in soluzione, viene bombardata con un fascio laser. Grazie al fenomeno del desorbimento, il campione viene rilasciato in forma "clusterizzata", ovvero complessato con la matrice. La tecnica MALDI permette di ionizzare composti che in altre condizioni andrebbero facilmente distrutti. Dopo la ionizzazione, il flusso di ioni prodotto entra

nell'analizzatore, un dispositivo capace di separare gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). Molto spesso la tecnica MALDI viene abbinata a spettrometri dotati di analizzatore a tempo di volo (Time of flight, TOF). Nell'analizzatore TOF, gli ioni lasciati liberi di muoversi su una traiettoria rettilinea in assenza di altri campi elettrici o magnetici, si muovono con velocità diverse in funzione della loro massa. Il tempo di volo è il tempo impiegato da uno ione per percorrere l'intero spazio dell'analizzatore. Gli ioni che superano l'analizzatore producono una debole corrente elettrica che viene amplificata dai rivelatori. I segnali ottenuti vengono trasmessi ad un computer in grado di rappresentare l'abbondanza di ogni ione in funzione della sua massa, cioè lo spettro di massa finale. I dati ottenuti permettono la ricostruzione della sequenza peptidica mediante analisi in banca dati.

-knock-out genico: sono stati creati topi knock-out costitutivi per ETHE1, in cui l'espressione di questo gene è stata soppressa. Sono stati amplificati mediante PCR 3 frammenti di DNA provenienti da cellule staminali embrionali (cellule ES) di topo AB1: è stato amplificato un frammento di 4,9 kilobasi, che corrisponde al braccio lungo del costrutto, un secondo frammento di 607 kilobasi che comprende l'esone 4 e un terzo frammento di 1,7 kilobasi che corrisponde al braccio corto del costrutto. I frammenti sono stati inseriti in questa successione nel vettore Blue-Script per ottenere un inserto corrispondente al gene ETHE1 murino. Oltre a questi tre frammenti, il vettore contiene anche 2 sequenze LoxP, di 34 bp, specifiche per la ricombinasi Cre, che fiancheggiano l'esone 4, e il gene per la resistenza alla neomicina (neo).

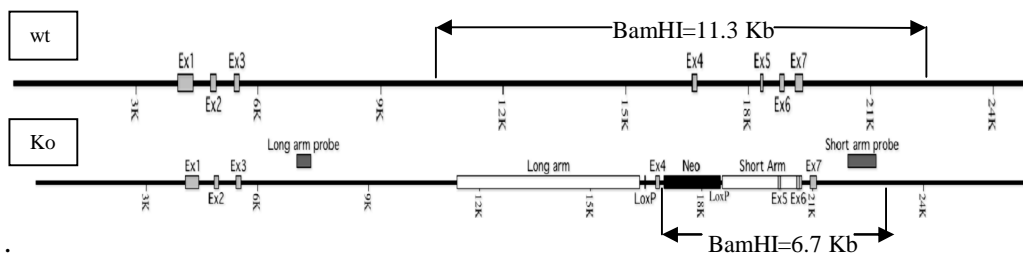


Fig. 4: modificato da Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy; Tiranti et al. Supplementary, Fig. 4 Online (2009).

La ricombinazione omologa in eucarioti superiori è un evento raro e per aumentare la probabilità che avvenga, occorre progettare il vettore di trasfezione in modo che il marcatore neo sia fiancheggiato da sequenze, omologhe al gene target, di considerevole lunghezza. Si utilizza il sistema Cre-LoxP per eliminare solo una regione del gene ETHE1. Non è infatti possibile distruggere un intero gene negli eucarioti superiori e si deve quindi agire facendo una delezione delle zone critiche.

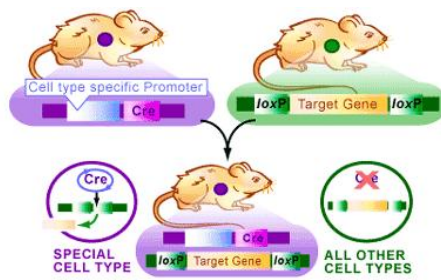


Fig. 5: da <http://www.scq.ubc.ca/>.

Il vettore linearizzato è stato elettroporato in cellule ES di topo AB1 e sono stati selezionati 200 cloni resistenti alla neomicina. L'elettroporazione consiste in una repentina scarica elettrica operata in un piccolo contenitore che contiene le cellule ES in una sospensione liquida. La scarica determina l'apertura della membrana plasmatica in numerosi punti, permettendo alle molecole di DNA di penetrare nella cellula. Si utilizza il marker di selezione *neo^r* per selezionare solo le cellule in cui la trasfezione è stata correttamente portata a termine. Se la ricombinazione è avvenuta in modo corretto, il gene *neo^r* viene inserito in posizione molto ravvicinata a quello da inattivare o addirittura al suo interno. I vettori però riescono ad entrare nella cellula e sostituirsi in modo corretto molto raramente. Aggiungendo l'antibiotico in coltura, sopravviveranno solo le cellule in cui il vettore con il gene di interesse si è inserito stabilmente nel genoma. I cloni resistenti alla neomicina quindi hanno integrato il costrutto plasmidico per ricombinazione tra i bracci del costrutto e le sequenze genomiche corrispondenti di *ETHE1*. Se i cloni selezionati vengono sottoposti a Southern Blot, vengono digeriti con *Bam*HI e ibridizzati con una sonda complementare ad una regione genomica adiacente al braccio corto, *Bam*HI taglia un frammento di 11.3 Kb se l'allele è wt, un frammento di 6.7 Kb se l'allele è ko.

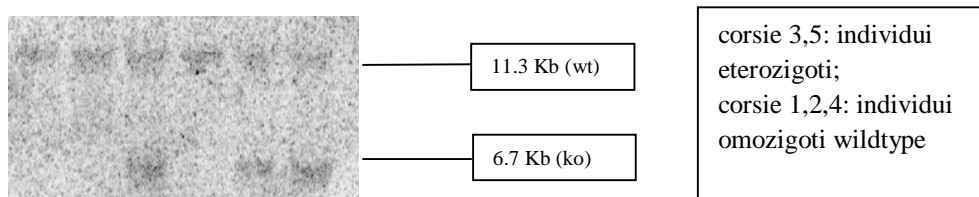


Fig. 6: modificato da "Loss of *ETHE1*, a mitochondrial dioxxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy"; Tiranti et al. *ó* Supplementary, Fig. 4 Online (2009).

Mediante l'uso di una sonda complementare ad una regione genomica adiacente al braccio lungo e una sonda complementare ad una porzione del gene *neo^r* sono stati trovati due cloni in cui era avvenuta ricombinazione omologa. Uno dei due cloni è stato iniettato in una blastocisti C57BL/6J. La blastocisti è stata impiantata in una madre pseudo-gravida e da questa sono stati ottenuti due maschi chimerici, i quali sono stati accoppiati con altrettante femmine wildtype C57BL/6J, e la progenie della generazione F1 è stata genotipizzata mediante Southern Blot. I topi F1 che contengono il costrutto, sono stati accoppiati con topi transgenici

contenenti il gene codificante per Cre. Da questo incrocio sono stati ottenuti topi contenenti entrambi i costrutti. Viene quindi prodotta la proteina Cre che taglia a livello delle sequenze LoxP. In questo modo vengono rimossi sia la cassetta neo^r sia l'esone 4 di ETHE1, generando così topi eterozigoti ETHE1^{+/-}, che sono stati poi incrociati tra loro per ottenere topi omozigoti ETHE1^{-/-}.

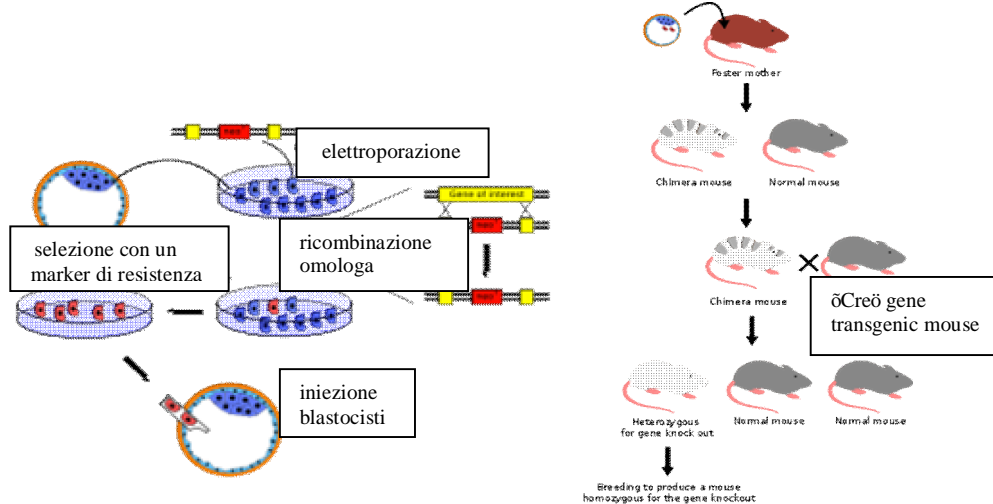


Fig. 7: modificato da www.wikipedia.org.

Analisi rodanese: sono state fatte esprimere in cellule HeLa la proteina ETHE1^{HA} e la rodanese marcata con His₆ (Rhoda^{His}). Per ottenere la proteina ricombinante Rhoda^{His}, è stato amplificato mediante PCR il DNA complementare alla rodanese umana. Il primer R è stato modificato in modo tale da codificare per una sequenza di 6 istidine. Sono stati fatti 30 cicli di PCR, dopodiché il cDNA della rodanese^{His} è stato inserito in vettori di espressione eucariotici pcDNA 3.1 i quali sono stati elettroporati in cellule HeLa. In lisati di cellule HeLa cotrasfettate con entrambi i costrutti ricombinanti, è stata effettuata un'immunoprecipitazione e il materiale immunoprecipitato è stato rivelato mediante Immunoblot in cui sono stati utilizzati l'anticorpo specifico per His₆ e l'anticorpo specifico per HA. Le proteine target sono state evidenziate mediante il kit di chemiluminescenza ECL.

Legame metallico: per stabilire quale metallo fosse associato alla proteina, ETHE1 marcata con His₆ è stata purificata per affinità ed è stata sottoposta alla spettrometria di massa. È stata utilizzata la tecnica ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry), una tipologia di spettrometria altamente sensibile, in grado di determinare diverse sostanze inorganiche metalliche e non metalliche presenti in concentrazioni inferiori ad una parte per bilione (10¹²). Sfrutta l'utilizzo di una torcia al plasma ICP per produrre la ionizzazione e di uno spettrometro di massa ad emissione ottica (OES) per la separazione e rivelazione degli ioni prodotti. La tecnica dell'emissione ottica consiste nell'eccitare il campione da analizzare con una scarica ad alta energia, la quale dà luogo ad un'emissione di radiazione dalla superficie del campione eccitato. Lo spettro della radiazione viene separato in righe distinte e la misura della lunghezza d'onda e dell'intensità delle radiazioni emesse consente di effettuare un'analisi qualitativa, individuando

gli atomi che hanno generato tali radiazioni, e un'analisi quantitativa, individuando la loro concentrazione nel campione.

-determinazione colorimetrica del ferro: è stato effettuato un saggio chimico basato sull'utilizzo della batofenantrolina disulfonata, un agente chelante cromogenico che, in ambiente tamponato a pH 4, lega il Fe^{2+} portato in soluzione, formando il complesso ottaedrico Fe^{2+} -batofenantrolina disulfonata (BPS) di colore rosso-arancione, il quale ha uno specifico picco di assorbanza a 535 nm. Il complesso è molto stabile, il colore non varia apprezzabilmente per lungo tempo e la legge di Lambert-Beer viene rispettata. L'eventuale Fe^{3+} viene ridotto a Fe^{2+} da un agente riducente, il cloruro di idrossilammonio. La chelazione rende quindi possibile un'analisi quantitativa. La soluzione contenente la proteina ETHE1^{His} ricombinante, è stata incubata con Tris-HCl a pH 8.0 per 30 minuti a 22°C, mentre la soluzione contenente ETHE1 denaturata è stata incubata con SDS 2%, BPS e ditionite a 50°C. Il protocollo utilizzato è stato messo a punto in precedenza da Toral et al. (1999)⁽⁶⁾. In particolare, il saggio colorimetrico prevede che le soluzioni contenenti ETHE1 nativa e denaturata vengano incubate e che, dopo l'incubazione, venga aggiunto cloruro di idrossilammonio ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$). Il campione viene lasciato a riposo per 5 minuti e successivamente viene aggiunta una soluzione tampone di acido acetico glaciale-acetato di ammonio, in modo da portare il pH a 4. Infatti a pH troppo acidi (<3) la batofenantrolina viene protonata ed, essendo carica positivamente, reagisce meno con gli ioni Fe^{2+} , mentre a pH troppo basici (>9) il Fe^{2+} precipita come idrossido. La soluzione così ottenuta viene mescolata, lasciata a riposo per 20 minuti, trasferita nelle cuvette e ne viene misurata l'assorbanza. È stato delineato un profilo di assorbimento a lunghezze d'onda dai 200 a 800 nm per determinare il picco di assorbanza, che è a 535 nm. Sono state preparate delle soluzioni standard, contenenti ferro a concentrazioni note, per la costruzione della retta di taratura. Sul grafico, in ascissa vengono riportate le concentrazioni di ferro e in ordinata i corrispondenti valori delle assorbanze. La concentrazione di ferro infatti, è proporzionale all'assorbanza del complesso ferro-batofenantrolina. Perciò dal valore di assorbanza ottenuto per i campioni contenenti la proteina ETHE1 nativa e denaturata, si può ricavare mediante la curva di taratura, la concentrazione incognita del ferro, tenendo conto della diluizione effettuata.⁽⁷⁾

RISULTATI E DISCUSSIONE

La purificazione della proteina ETHE1 è stata effettuata cambiando due diverse metodologie: una cromatografia e un'analisi elettroforetica seguita da Western Blot. Se la proteina di interesse è presente in piccole quantità, è possibile utilizzare la tecnologia del DNA ricombinante per creare cellule che producano grandi quantità della proteina desiderata. Tale tecnica permette di marcare con un tag le proteine per facilitarne la purificazione. Esistono varie tipologie di cromatografia, tra cui quella per affinità, che risulta la migliore, se si dispone della proteina di interesse marcata, perché permette di ottenere la proteina purificata

in pochi passaggi. Dovrebbe essere necessario un solo step, vista la specificità della fase stazionaria per il tag della proteina di interesse. Se si rilevano contaminanti, si effettua un secondo step di purificazione mediante cromatografia ad esclusione molecolare o HPLC. Dalla cromatografia si ottiene la proteina ETHE1 in due forme, di 30 KDa e 28 KDa. Le due forme vengono distinte mediante analisi SDS-PAGE, che separa le due proteine proprio in base al loro peso molecolare. Un altro metodo per la purificazione proteica è l'analisi SDS-PAGE seguita da Western Blot. L'analisi SDS-PAGE effettuata sull'estratto proteico non è in grado di distinguere tra proteine con peso molecolare simile. Si ottiene uno smear di bande elettroforetiche. Per questo è necessario il Western Blot, che permette di individuare tra le bande quella di interesse, mediante l'uso di un anticorpo specifico. Risulta più vantaggioso effettuare la cromatografia piuttosto che l'analisi SDS-PAGE seguita dal Western Blot, perché con il primo metodo si ottiene in uno o pochi steps la proteina purificata, senza dover effettuare un'analisi aggiuntiva di Western Blot. Già in studi precedenti era stata ipotizzata la localizzazione mitocondriale di ETHE1 perché era stata scoperta la presenza di una sequenza N-terminale simile ai peptidi leader mitocondriali, mancante nel cDNA partial-length. Questa regione è ricca di residui apolari e basici.⁽²⁾ Gli studi sperimentali precedentemente descritti hanno portato alla conferma della presenza di una sequenza leader che ha quindi dimostrato l'effettiva localizzazione mitocondriale di ETHE1. Nell'analisi Western Blot è stato utilizzato un anticorpo anti-HA e da individui controllo sono state immunoprecipitate due specie di proteine di circa 30 KDa e 28 KDa. Il polipeptide di dimensione maggiore corrisponde alla proteina precursore di ETHE1^{HA}, quello di dimensione minore è la forma matura. Il trascritto ETHE1 infatti viene tradotto in un precursore inattivo di circa 30 KDa che viene importato, con un processo energia-dipendente, nella matrice mitocondriale dove viene processato ad una forma matura attiva di 28 KDa, in seguito al taglio del peptide leader all'N-terminale, presumibilmente mediante MPP, peptidasi di processamento mitocondriale. Il peptide viene tagliato all'estremità N-terminale, poiché la proteina matura contiene ancora l'epitopo HA, che è fuso con il C-terminale della proteina.⁽²⁾ La spettrometria MALDI-TOF ha dimostrato l'assenza nella proteina ETHE1^{HA} della sequenza che comprende i primi sette amminoacidi all'N-terminale predetti dall'open reading frame di ETHE1. Veniva infatti regolarmente rilevato un peptide che comprendeva i residui Val8-Glu30. Ciò indica che la proteina matura inizia da Val8 e che il precursore viene tagliato nei mitocondri a livello del legame peptidico Arg7-Val8. Con la digestione mediante tripsina si ottengono risultati simili. La spettrometria MALDI-TOF risulta vantaggiosa rispetto al Western Blot, perché mentre con il secondo metodo sono stati individuati due polipeptidi di diverso peso molecolare ma non il preciso sito di taglio ed è stato quindi possibile solo supporre la mancanza del peptide leader nel polipeptide maturo, con il primo metodo c'è stata invece la dimostrazione dell'assenza di tale peptide e l'individuazione del sito di taglio. La tecnica MALDI è più indicata rispetto agli

altri metodi di spettrometria per l'analisi di composti termolabili e ad alto peso molecolare, come le proteine, particolarmente fragili e soggette a distruzione con le altre tecniche di ionizzazione. La spettrometria MALDI-TOF permette la ionizzazione di analiti ad altissimo PM (>100.000 Da), sono necessari pochi frammenti peptidici, ha un'elevata sensibilità, dell'ordine delle picomoli o inferiore, acquisisce i dati velocemente ed è tollerante alla presenza di sali, buffers e altri additivi. Gli svantaggi sono che la risoluzione dell'analizzatore di massa TOF è limitata e che le analisi di composti con un peso molecolare inferiore a 600 Da risultano difficili.

La generazione di topi *ETHE1*^{-/-} ha permesso di analizzare le manifestazioni cliniche e biochimiche degli individui in cui la proteina *ETHE1* risulta alterata, e di confrontare queste caratteristiche con quelle degli individui EE, per verificare quindi che la perdita di funzione della proteina *ETHE1* è la causa dell'encefalopatia etilmalonica. I topi knock-out mostrano un arresto di crescita con diminuzione del peso corporeo dal quindicesimo giorno postnatale e un'attività motoria ridotta. Muoiono tra la quinta e la sesta settimana dopo la nascita. La perdita di funzione di *ETHE1* provoca un'alterazione dell'attività di COX, citocromo c ossidasi. La colorazione istochimica infatti, evidenzia un'attività di COX marcatamente minore nel muscolo, nel cervello e nei colonociti luminali, moderatamente diminuita nel digiuno, normale nel fegato e nei colonociti delle cripte. L'attività è minore quindi negli organi che richiedono un maggior apporto di energia. Queste osservazioni sono state confermate da saggi biochimici di COX in molti tessuti, in cui l'attività della citocromo c ossidasi risultava ridotta, mentre quelle di altri enzimi della catena respiratoria mitocondriale erano normali. Analisi dei fluidi corporei di topi *ETHE1*^{-/-} mediante gas cromatografia e spettroscopia, hanno dimostrato la presenza di alte concentrazioni di lattato e di acilcarnitine C4 e C5 nel sangue e di acido etilmalonico nell'urina, similmente agli individui con encefalopatia etilmalonica. Pertanto, mediante la generazione di topi knock-out è stato possibile associare la mutazione del gene *ETHE1* con l'encefalopatia etilmalonica perché le caratteristiche cliniche e biochimiche dovute alla mutazione e quelle dovute alla malattia corrispondono. Le sequenze dei geni *ETHE1*-like di molti eubatteri si trovano nello stesso operone in cui si trova il gene per la rodanese solfurtransferasi, un enzima dotato di azione disintossicante dall'acido cianidrico e dal solfito. La rodanese demolisce l'acido cianidrico (CN) per produrre il tiocianato (SCN), sostanza non tossica, e produce tiosolfato a partire da solfito. Per vedere se le due proteine sono strutturalmente associate, è stata svolta un'analisi di Immunoblot. Da cellule HeLa co-trasfettate con i costrutti *ETHE1*^{HA} e Rhoda^{His}, l'anticorpo specifico per His₆ fa immunoprecipitare la proteina ricombinante *ETHE1* mentre l'anticorpo specifico per HA fa immunoprecipitare la rodanese, suggerendo quindi che le due proteine potrebbero interagire fisicamente in vivo.

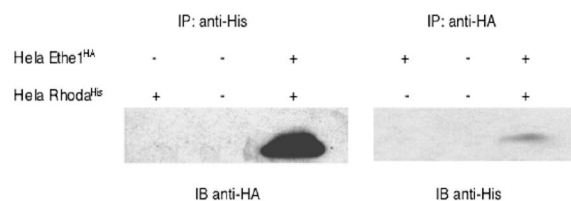


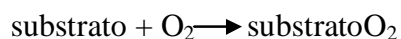
Fig. 8: da δ Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy; Tiranti et al. δ Supplementary, Fig. 3 Online (2009).

Per studiare invece l'eventuale legame funzionale tra ETHE1 e rodanese, sono stati analizzati i metaboliti dello zolfo. Nell'urina dei topi ETHE1^{-/-} e degli individui con EE è stata rilevata una concentrazione di tiosolfato molto maggiore e una concentrazione di solfato minore alla condizione normale, mentre non era stata individuata presenza di solfito. La concentrazione di tiosolfato era marcatamente superiore nel rene, nel fegato, nel muscolo e nel cervello di individui ETHE1^{-/-}. Si pensa che la grande quantità di tiosolfato, che in individui wildtype per ETHE1 è presente in tracce, rifletta la presenza di solfuro di idrogeno (H₂S). La concentrazione di solfuro di idrogeno in fegato, muscolo e cervello dei topi ETHE1^{-/-} è infatti molto maggiore rispetto a quella dei topi wildtype. H₂S è un gas prodotto da diversi tessuti umani durante le loro attività metaboliche e viene prodotto anche in maniera esogena. È rilasciato dalla flora batterica intestinale ed è infatti presente anche nel lume dell'intestino crasso. In quantità limitate regola il tono dei vasi capillari e funge da neurotrasmettitore, ma a concentrazioni sovralfisiologiche è un potente inibitore di COX. Negli omogenati di fegato di topo si è visto che anche l'attività di SCAD, deidrogenasi degli acil-coA a catena corta, è inibita da solfuro di idrogeno, e ciò giustifica l'accumulazione delle acilcarnitine C4 e C5 e dell'acido etilmalonico. L'acido solfidrico determina anche il danneggiamento della mucosa del colon, che causa una severa diarrea cronica. H₂S è una sostanza vasoattiva e ad alte concentrazioni, è tossica per le cellule endoteliali. Ciò potrebbe spiegare l'acrociatosi e il danneggiamento vascolare, caratteristiche tipiche della EE. È stato osservato quindi che il punto chiave dello studio sull'encefalopatia etilmalonica è H₂S. La constatazione dell'associazione tra l'accumulo di questa sostanza e i sintomi tipici della EE, ha portato ad avvicinarsi alla scoperta della funzione di ETHE1. I risultati ottenuti indicano infatti che l'encefalopatia etilmalonica è una malattia associata al danneggiamento del catabolismo dello zolfo inorganico che porta all'accumulazione di H₂S in alcuni tessuti. È stato studiato un sistema mitocondriale che utilizza H₂S come substrato respiratorio. Questa via è costituita dagli enzimi SQR (membrane-bound sulfide: quinone oxidoreductase), zolfo diossigenasi e rodanese. Il consumo di ossigeno molecolare degli individui ETHE1^{-/-} era minore rispetto a quello dei wildtype. L'attività di SQR e della rodanese erano normali, mentre era stata riscontrata una minore attività della zolfo diossigenasi. Inoltre l'attività della zolfo diossigenasi era marcatamente maggiore

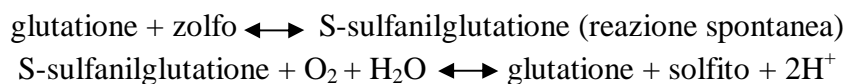
nelle cellule HeLa in cui ETHE1 era sovraespressa. Si deduce quindi che ETHE1 codifica per una zolfo diossigenasi che opera in stretta associazione funzionale con SQR e la rodanese. Le basse concentrazioni di solfito e solfato nelle urine sono dovute alla perdita di funzione della zolfo diossigenasi. Per questo motivo, anche la concentrazione di tiosolfato dovrebbe essere minore rispetto agli individui wild-type, ma risulta maggiore per la presenza di vie alternative che fissano l'accumulo di H₂S in solfito, il quale viene convertito dalla rodanese in tiosolfato. La zolfo diossigenasi è un enzima che fa parte della famiglia delle β -lattamasi e ha un sito di legame per il ferro. La spettrometria ICP-OES del contenuto metallico di ETHE1^{His} purificato per affinità, in cui i risultati sono espressi in parte per milione (ppm), dimostra che il ferro è l'elemento predominante mentre K, Mg e altri elementi sono presenti in minore e più variabile quantità e sono perciò considerati contaminanti. La spettrometria ha dimostrato la presenza di ferro in un rapporto molare ferro:ETHE1 di 0,5. Questo risultato è stato confermato mediante saggio chimico basato sull'utilizzo della batofenantrolina disulfonata. È stata misurata in ETHE1^{His} l'assorbanza specifica per il complesso BPS, a 535 nm, e non è stato riscontrato un incremento di assorbimento. Ciò indica che nessun ferro libero era presente nel mezzo. Dopo denaturazione per 30 minuti, che permette il rilascio del Fe²⁺ legato strettamente, è stato misurato il picco a 535 nm, che corrisponde ad un rapporto molare ferro/ETHE1 di 0,5. Si può quindi concludere che ETHE1 codifica per una metallo-proteina che coordina il ferro e che un singolo atomo di ferro è legato al monomero ETHE1. L'analisi quantitativa della concentrazione del ferro intracellulare può essere effettuata usando una varietà di metodi analitici. I fattori più importanti che devono essere considerati quando si quantifica la concentrazione intracellulare di ferro, sono la sensibilità del metodo e l'abilità nel determinare la bassa concentrazione di ferro. Un metodo per la determinazione del ferro è la tecnica MRI (cellular magnetic resonance imaging), che però in molti laboratori non è disponibile. Anche la spettrometria di assorbimento atomico ha un'alta sensibilità, ma richiede un'apparecchiatura costosa. La spettrometria ICP-OES risulta vantaggiosa perché ha un'alta sensibilità, ha limiti di rilevabilità estremamente bassi, a livello di ng/L, ha la capacità di effettuare analisi quantitative veloci e con un buon livello di accuratezza ed è in grado di quantificare le impurezze. Uno svantaggio è il tempo necessario per la misurazione. L'analisi richiede circa un giorno, al quale si devono aggiungere dai 3 ai 5 giorni, necessari per realizzare il processo di digestione in soluzione del campione. Questa tecnica è costosa e non sempre disponibile nei laboratori. È stata utilizzata per la misurazione del ferro legato ad ETHE1 e l'accuratezza del risultato è molto elevata. Tra i vari metodi disponibili per la determinazione della concentrazione di ferro intracellulare, quelli più comunemente usati in laboratorio sono i metodi colorimetrici che si basano sulla digestione acida delle cellule, seguita da un saggio per il ferro basato sull'utilizzo di un agente chelante cromogeno come la batofenantrolina, il ferene, la ferrozina o altri. La procedura è

molto semplice e rapida e necessita solo di reagenti economici. Il confronto di questo metodo con alcuni test per reagenti disponibili in commercio mostrano un'eccezionale concordanza. La precisione del metodo quindi è molto elevata. Per queste caratteristiche, questa tecnica è considerata la procedura più semplice e veloce per la stima della concentrazione del ferro nei laboratori. Il saggio con la ferrozina ha molti vantaggi rispetto agli altri attualmente utilizzati. Non richiede un precedente trattamento del campione (deproteinizzazione), non richiede riscaldamento né aggiunta di acido. Il metodo basato sull'uso della batofenantrolina disulfonata è stato proposto nel 1978 dal Comitato per la Standardizzazione in Ematologia (ICSH) per la determinazione del ferro nel siero. Nel 1990, il ICSH ha sostituito la batofenantrolina disulfonata con il ferene, un cromogeno più sensibile e con una maggiore assorbanza. La sensibilità del saggio, definita come la pendenza della curva di calibrazione, è di 0,215 con la batofenantrolina e di 0,333 con il ferene e il limite di rilevazione per il ferene è più basso di quello della batofenantrolina (0.15 vs 0.30 mmol/L). Inoltre, il ferene è più economico della batofenantrolina.⁽⁸⁾ Il metodo colorimetrico è valido per la determinazione della concentrazione del ferro in piccoli campioni ma nel caso in cui fosse necessario analizzare la presenza di ferro in volumi tissutali elevati, risulta svantaggioso. Per facilitare le analisi su larga-scala è stato creato il saggio su micropiastre.⁽⁹⁾

La funzione della zolfo diossigenasi è di detossificare le cellule da H₂S e la detossificazione avviene grazie al nucleo catalitico in cui, come dimostrato precedentemente, è presente l'atomo di ferro, metallo ambivalente capace di disattivare l'acido solfidrico. In assenza della proteina ETHE1, questo meccanismo viene a mancare e l'acido solfidrico si accumula nei tessuti, danneggiandoli. La diossigenasi è un enzima che catalizza reazioni in cui entrambi gli atomi di una molecola di ossigeno vengono incorporati nelle molecole dei substrati:



La zolfo diossigenasi, nello specifico, è un enzima appartenente alla classe delle ossido-reduttasi e catalizza la reazione:



Il glutatione, è un tripeptide, costituito da glicina, acido glutammico e cisteina, necessario per l'attivazione dello zolfo, ma non consumato durante la reazione. Solo S-sulfanilglutazione può essere ossidato a formare solfito (H₂SO₃). Il solfito può essere poi convertito in solfato (SO₄²⁻) dalla solfito ossidasi o in tiosolfato (H₂SSO₃) dalla rodanese. Alla luce della scoperta della funzione di ETHE1, è stato constatato che la perdita di funzione dell'enzima giustifica il quadro clinico e biochimico dell'encefalopatia etilmalonica: tale perdita di funzione impedisce il

catabolismo dell'acido solfidrico e determina quindi un'alta concentrazione di H₂S e di tiosolfato nei tessuti. L'accumulo di acido solfidrico giustifica la microangiopatia, l'acrocianosi, la diarrea cronica, la deficienza della citocromo c ossidasi e di SCAD. L'ossidazione degli acidi grassi a catena corta risulta danneggiata e ciò determina l'accumulazione di acilcarnitine e l'escrezione di acido etilmalonico e di tiosolfato.

H₂S provoca inoltre alterazioni nel metabolismo energetico mitocondriale e la conseguente comparsa di miopatia. L'EE è il primo caso, per quanto scoperto finora, di malattia mitocondriale ereditaria che risulta da un'inibizione tossica del metabolismo dell'energia aerobia. La malattia provoca un difetto della catena respiratoria mitocondriale e invece del metabolismo aerobio, si utilizza quello anaerobio, con produzione di acido lattico: piruvato + NADH → lattato + NAD⁺. Prima della scoperta della funzione del gene, i pazienti affetti da EE venivano trattati con risultati più o meno soddisfacenti con L-carnitina, riboflavina e/o coenzima Q₁₀ e con altre terapie vitaminiche in grado di migliorare il metabolismo energetico e di alleviare lo stress ossidativo. L'identificazione del gene responsabile per la EE offre uno strumento per una diagnosi precoce, per un'assistenza genetica e per la ricerca di una valida terapia.⁽²⁾ I ricercatori infatti stanno cercando di capire se riducendo la quantità di acido solfidrico si possano migliorare le condizioni di vita dei pazienti e aumentarne la sopravvivenza. Una strategia terapeutica infatti potrebbe essere l'utilizzo di farmaci che riducono la produzione batterica di H₂S o viceversa, che fanno aumentare l'azione detossificante del sistema ETHE1. Un'altra strategia potrebbe essere quella di intervenire con un trapianto di midollo osseo sul sistema reticolo-endoteliale, quella particolare porzione del sistema immunitario che ha il compito di eliminare le sostanze tossiche dall'organismo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) DI DONATO S. (2009) ó Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *J Neurol.*; 256(5): 693-710.
- (2) TIRANTI V., D'ADAMO P., BRIEM E., FERRARI G., MINERI R., LAMANTEA E., MANDEL H., BALESTRI P., GARCIA-SILVA M.T., VOLLMER B., RINALDO P., HAHN S.H., LEONARD J., RAHMAN S., DIONISI-VICI C., GARAVAGLIA B., GASPARINI P., ZEVIANI M. (2004) - Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in Ethe1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am. J. Hum. Genet.*; 74: 239-252.
- (3) TIRANTI V., BRIEM E., LAMANTEA E., MINERI R., PAPALEO E., DE GIOIA L., FORLANI F., RINALDO P., DICKSON P., ABU-LIBDEH B., CINDRO-HEBERLE L., OWALDHA M., JACK R.M., CHRISTENSEN E., BURLINA A., ZEVIANI M. (2006) - ETHE1 mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. *J Med Genet*; 43: 340-346.
- (4) SHUEY D. J., ATTARDI G. (1985) - Characterization of an RNA Polymerase activity from HeLa cell mitochondria, which initiates transcription at the heavy strand rRNA promoter and the light strand promoter in human mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.*; 260: 1952-1958.
- (5) NELSON D. L., COX M. M. ó I principi di Biochimica di Lehninger, edizione IV.
- (6) TORAL M. I., RICHTER P., TAPIA A. E., HERNANDEZ J. (1999) - Simultaneous determination of iron and ruthenium as ternary complexes by extractive second derivative spectrophotometry. *Talanta*; 50: 183-191.
- (7) RAD A. M., JANIC B., ISKANDER A., SOLTANIAN-ZADEH H., ARBAB A. S. (2007) - Measurement of quantity of iron in magnetically labeled cells: comparison among different UV/VIS spectrometric methods. *BioTechniques*; 43: 627-636.
- (8) PIERONI L., KHALIL L., CHARLOTTE F., POYNARD T., PITON A., HAINQUE B., IMBERT-BISMUT F. (2001) - Comparison of bathophenanthroline sulfonate and ferene as chromogens in colorimetric measurement of low hepatic iron concentration. *Clinical Chemistry*; 47, No. 11.
- (9) GRUNDY M. A., GORMAN N., SINCLAIR P. R., CHORNEY M. J., GERHARD G. (2004) - High-throughput non-heme iron assay for animal tissues. *J. Biochem. Biophys. Methods*; 59: 195-200.