

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI

Ciclo 35

Settore Concorsuale: 06/M1 - IGIENE GENERALE E APPLICATA, SCIENZE INFERMIERISTICHE E STATISTICA MEDICA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/03 - GENETICA MEDICA

RUOLO DI GLUTAREDOSSINA-2 NELLA TRASFORMAZIONE TUMORALE ONCOCITARIA

Presentata da: Greta Tedesco

Coordinatore Dottorato

Prof. Fabio Piscaglia

Relatore

Prof. Giuseppe Gasparre

Co-relatore

Dott.ssa Monica De Luise

Esame finale anno 2023

ABSTRACT

Gli oncocitomi sono tumori epiteliali caratterizzati da un accumulo di mitocondri strutturalmente e funzionalmente compromessi, a prognosi generalmente benigna. Le cause genetiche della trasformazione oncocitaria sono tuttora sconosciute; pertanto, lo studio di oncocitomi in contesti familiari sindromici è utile nella ricerca dei determinanti genetici predisponenti il fenotipo. Diversi membri di una famiglia affetta da sindrome dell'iperparatiroidismo con tumore della mandibola (HPT-JT), dovuta ad un'ampia delezione in *CDC73*, hanno mostrato recidiva di tumori paratiroidei oncocitari. Il sequenziamento dell'esoma ha escluso mutazioni private della famiglia; all'interno della delezione ereditata, tuttavia, sono stati individuati elementi regolatori del gene glutaredossina 2 (*GLRX2*), codificante un'isoforma mitocondriale deputata alla deglutinationilazione proteica reversibile - modificazione modulante l'attività di numerosi target- il cui ruolo nel cancro non è noto. La proteina è risultata assente in tutti i tumori e dimezzata nei tessuti sani dei soggetti. Per indagare se la sua assenza alteri la deglutinationilazione proteica predisponendo al fenotipo oncocitario, sono stati generati modelli cellulari TPC1 e HCT116 *GLRX2* KO in cui sono stati riscontrati un ridotto tasso proliferativo ed un'alterata glutationilazione proteica, particolarmente in seguito a stress ossidativo. Un esperimento pilota *in vivo* ha mostrato cellule KO oncocitoidi, con mitocondri morfologicamente alterati, suggerendo che l'alterazione redox innescata dall'assenza di *GLRX2* possa indurre una disfunzione metabolica mitocondriale tale da mimare quelle osservate negli oncocitomi. L'analisi proteomica ha individuato diversi target di glutationilazione nei campioni KO identificando proteine del ciclo di Krebs e della catena respiratoria mitocondriale. In particolare, una marcata glutationilazione del complesso della piruvato deidrogenasi (PDHc) è stata correlata ad una ridotta sintesi di ATP dipendente da piruvato. Considerando l'importanza dello stress ossidativo nella fisiopatologia del cancro ed il ruolo del glutatione nella risposta antiossidante, *GLRX2* rappresenta un potenziale candidato nella regolazione del metabolismo ossidativo nelle cellule tumorali esposte allo stress e nella modulazione del fenotipo tumorale.

Indice

Introduzione	5
- Caratteristiche molecolari dei tumori oncocitari.....	5
- Oncocitomi e mutazioni del mtDNA.....	7
- Oncocitomi familiari e ricerca dei geni predisponenti la trasformazione oncocitaria.	10
- Stress ossidativo e ruolo del glutatione nel cancro	13
- Sindrome dell'HPT-JT in relazione al fenotipo oncocitario.....	16
Scopo della tesi	20
Materiali e metodi	21
- Raccolta campioni pazienti HPT-JT.....	21
- WES- whole exome sequencing.....	21
- Colture Cellulari.....	22
- Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)	22
- CRISPR Interference (CRISPRi)	24
- Estrazione di RNA, retrotrascrizione e qRT-PCR	24
- Colorazione con ematossilina ed eosina (H&E) ed immunoistochimica (IHC).....	25
- Editing genetico CRISPR-Cas9 per la generazione delle linee <i>GLRX2</i> knock-out. .	26
- <i>Fluorescent-PCR</i> (F-PCR).....	27
- SDS-PAGE e Western blot.....	27
- Protein simple technology – Simple Western System WES™	28
- Analisi di proliferazione e di riparazione della ferita con sistema di <i>live cell imaging</i>	29
- Saggio di formazione delle colonie.....	30
- Misurazione GSH/GSSG	30
- Crescita degli xenograft e microscopia elettronica.	31
- MtDNA next generation sequencing (NGS).....	32

- Arricchimento delle proteine glutationilate ed analisi di proteomica	33
- Blue Native Page (BN-Page)	34
- Misurazione del tasso di consumo dell'ossigeno (OCR) – Seahorse.....	35
- Dosaggio della sintesi dell'ATP.....	36
- Immunofluorescenza- Mitotracker	37
- Analisi statistica	37
Risultati e discussione	38
- Il sequenziamento dell'esoma nei pazienti della famiglia HPT-JT non individua varianti associate al fenotipo oncocitario.	38
- Analisi in silico sulla delezione rivelano la perdita di un enhancer putativo del gene <i>GLRX2</i>	41
- L'espressione di <i>GLRX2</i> è dimezzata nei tessuti normali dei pazienti HPT-JT e assente nei tumori.....	45
- Il knock-out di <i>GLRX2</i> determina una riduzione della capacità proliferativa nei modelli tumorali <i>in vitro</i>	49
- Le linee cellulari <i>GLRX2</i> KO mostrano un rallentamento nella s-glutationilazione proteica in condizioni di stress ossidativo.	54
- Xenograft <i>GLRX2</i> knock-out mostrano un fenotipo simil-oncocitario <i>in vivo</i>	57
- Il knock-out di <i>GLRX2</i> determina una glutationilazione proteica differenziale a livello mitocondriale.	62
- Il complesso della piruvatodeidrogenasi (PDHc) è glutationilato nelle cellule <i>GLRX2</i> KO in seguito a stress ossidativo.	69
Conclusioni	77
Referenze	79
Materiali supplementari	87

Introduzione

Caratteristiche molecolari dei tumori oncocitari

Gli oncocitomi sono tumori di origine epiteliale che insorgono prevalentemente in tessuti endocrini ed esocrini come tiroide, paratiroide, reni, ghiandole salivari e ghiandola pituitaria, sebbene siano stati riportati casi di trasformazione oncocitaria anche in altri tipi di tumori tra cui neoplasie del seno¹, polmonari² e dell'endometrio³. Le cellule che compongono questo peculiare fenotipo tumorale – dette oncociti - nelle sezioni istologiche appaiono caratterizzate da un citoplasma eosinofilo granulare, dovuto all'accumulo di una grande quantità di mitocondri (iperplasia mitocondriale) che occupano quasi interamente lo spazio citoplasmatico. Per questa peculiare caratteristica gli oncociti vengono anche chiamati cellule ossifile, in virtù dell'affinità di componenti citoplasmatiche acidofile come i mitocondri con coloranti acidi come l'eosina. A livello ultrastrutturale i mitocondri appaiono ingranditi, di forma globulare e caratterizzati da creste piatte e lamelliformi (fig.1).

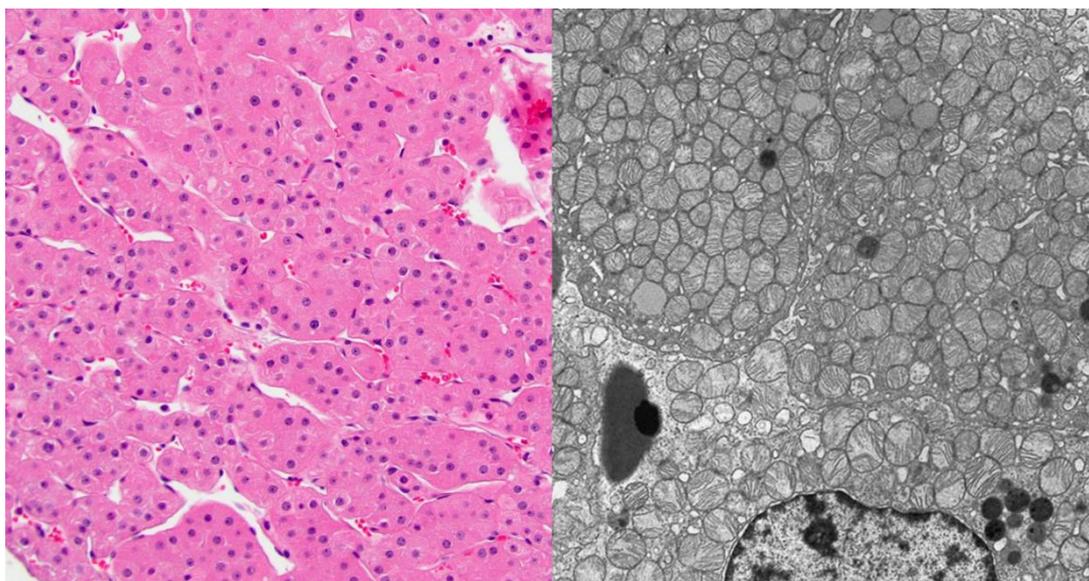


Figura 1. Colorazione Ematossilina-eosina di un oncocitoma renale (sx): il citoplasma è caratterizzato da un'intensa colorazione eosinofila. Microscopia elettronica a trasmissione di un oncocitoma renale (dx): il citoplasma presenta un numero anomalo di mitocondri strutturalmente difettosi. Fonte: Saleeb R. Oncocytoma. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumoroncocytoma.html>.

La maggior parte delle neoplasie oncocitarie presenta un carattere benigno (adenomi) ed è caratterizzata da una bassa invasività, sebbene siano stati riportati anche casi di carcinomi oncocitari, specialmente nella tiroide⁴. Le cause alla base dell'iperplasia mitocondriale non sono ancora state chiarite, l'ipotesi più accreditata prevede che sia il risultato di un aumento della biogenesi mitocondriale attuato per compensare un difetto bioenergetico: in uno studio su oncocitomi tiroidei, infatti, Savagner ed i suoi collaboratori hanno osservato un deficit nella

sintesi di ATP che correlava con una sovraespressione di un regolatore chiave della biogenesi mitocondriale, il coattivatore trascrizionale PRC⁵. Il deficit bioenergetico potrebbe pertanto innescare un meccanismo di segnalazione retrograda mitocondrio-nucleo in grado di attivare i regolatori della biogenesi nel tentativo di riparare il danno preesistente. Un'ulteriore caratteristica distintiva degli oncocitomi è la presenza di mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) in grado di compromettere la funzionalità della catena respiratoria: tra queste, le più comunemente riscontrate coinvolgono geni codificanti per subunità del Complesso I (CI) della catena respiratoria mitocondriale, esercitando un effetto distruttivo sul suo assemblaggio e, conseguentemente, sulla sua attività. In uno screening condotto dal nostro gruppo su 45 casi di tumori oncocitari della tiroide contro 52 tumori di controllo non oncocitari, il sequenziamento del mtDNA ha rivelato un'elevata incidenza di mutazioni di tipo frameshift e nonsense in particolar modo a carico di geni codificanti subunità del CI ed esclusivamente tra i casi di oncocitoma⁶; la stessa correlazione tra mutazioni nel CI e fenotipo oncocitario è stata osservata in oncocitomi renali^{7,8} e paratiroidi⁹. Il nostro gruppo di ricerca ha inoltre descritto il meccanismo attraverso il quale mutazioni disassemblanti del CI conferiscono un fenotipo tumorale benigno nella linea XTC1, unico modello cellulare di oncocitoma tiroideo attualmente disponibile (fig. 2): infatti, è stato osservato che il danno al CI presente nella linea è in grado di indurre l'accumulo di NADH e di α -chetoglutarato, un intermedio del ciclo di Krebs che è anche

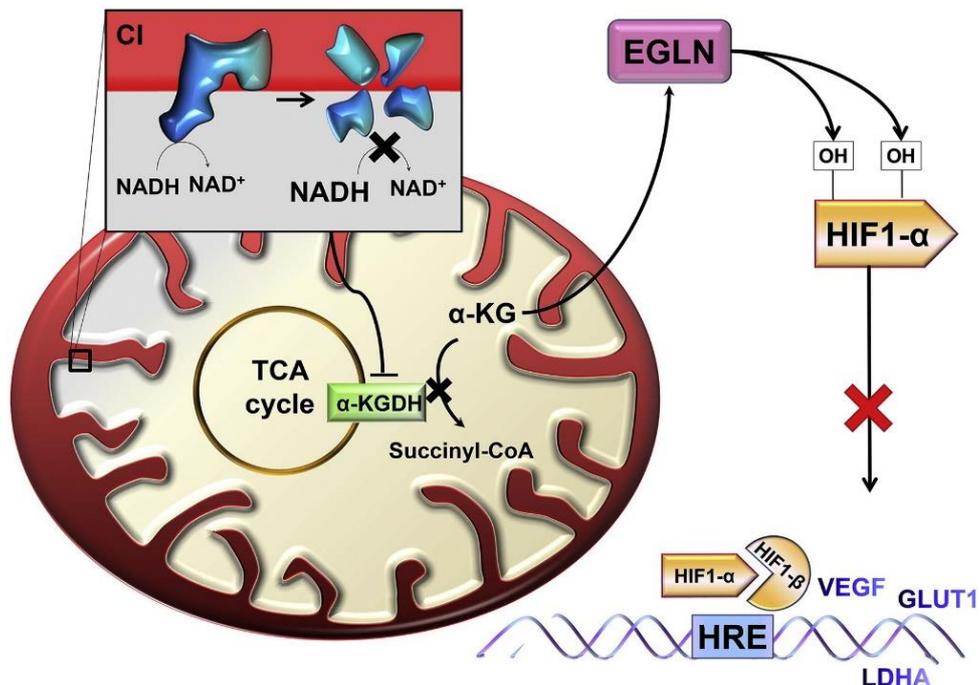


Figura 2. Degradazione di HIF1 α in condizioni di ipossia in presenza di mutazioni del mtDNA che causano il disassemblaggio del CI e il blocco della trascrizione dei geni in grado di promuovere lo shift glicolitico. Fonte: De Luise et al., *Biochimica et Biophysica acta- Bioenergetics*, 1858(8), 591–601.

un cofattore delle prolidrossilasi (PHD), ossia enzimi che catalizzano la degradazione mediata dal proteasoma del fattore indotto dall'ipossia, HIF1 α .

Quest'ultimo è un fattore di trascrizione che in condizioni di ipossia – tipiche di una massa tumorale in rapido accrescimento - regola la trascrizione di diversi geni implicati nell'angiogenesi, nel trasporto del glucosio, e nella conversione di piruvato a lattato, favorendo un cambiamento metabolico che predilige la glicolisi aerobia (effetto Warburg) all'OXPPOS. Nei tumori difettivi per il CI in cui la catena respiratoria è già compromessa, la destabilizzazione di HIF1 α e l'inibizione della trascrizione dei geni da esso regolati, impedisce anche lo shift metabolico verso la glicolisi e di conseguenza quell'adattamento del tumore alle condizioni di ipossia e carenza di nutrienti necessario per favorirne la progressione, spiegando il comportamento generalmente benigno di questo tipo di neoplasia¹⁰. È proprio questa associazione tra fenotipo oncocitario ed una prognosi più favorevole, a rendere gli oncocitomi un interessante campo di studio. Capire i meccanismi alla base dell'insorgenza di questo tumore ed identificare dei possibili bersagli molecolari e metabolici, potrebbe permettere di progettare una terapia per il trattamento di tumori più aggressivi, sopprimendone la progressione verso la malignità o almeno rallentandola allo scopo di ampliare la finestra d'intervento.

Oncocitomi e mutazioni del mtDNA

I mitocondri sono definiti organelli semiautonomi in quanto contengono un proprio DNA ed un proprio apparato per la sintesi proteica. Alcune proteine, infatti, sono codificate dal mtDNA e sintetizzate direttamente nel mitocondrio; altre invece, sono codificate da geni nucleari e vengono trasportate nel mitocondrio solo successivamente. L'mtDNA è una molecola circolare a doppio filamento (*H-Heavy Strand* e *L-Light strand*) di 16,569 bp e comprende 37 geni di cui 13 codificanti alcune proteine dei complessi respiratori, 22 tRNA e 2 rRNA specifici mitocondriali (fig.3)¹¹. È presente, inoltre, una regione di circa 1kb chiamata D-loop (*Displacement-loop*) che lega i fattori di trascrizione e svolge un ruolo fondamentale nella replicazione e trascrizione. Una singola cellula può avere centinaia di copie di mtDNA organizzate in nucleoidi, strutture ancorate alla membrana mitocondriale interna contenenti anche rRNA e proteine coinvolte sia nella trascrizione, come la DNA Polimerasi Gamma (POLG), che nella protezione da specie reattive dell'ossigeno (ROS), come la manganese-superossido dismutasi (MnSOD)¹². La vicinanza ai maggiori siti di produzione di ROS intracellulari rende infatti le molecole di mtDNA particolarmente esposte a mutazioni mitocondriali; altri fattori determinanti l'insorgenza di mutazioni risiedono nella struttura stessa

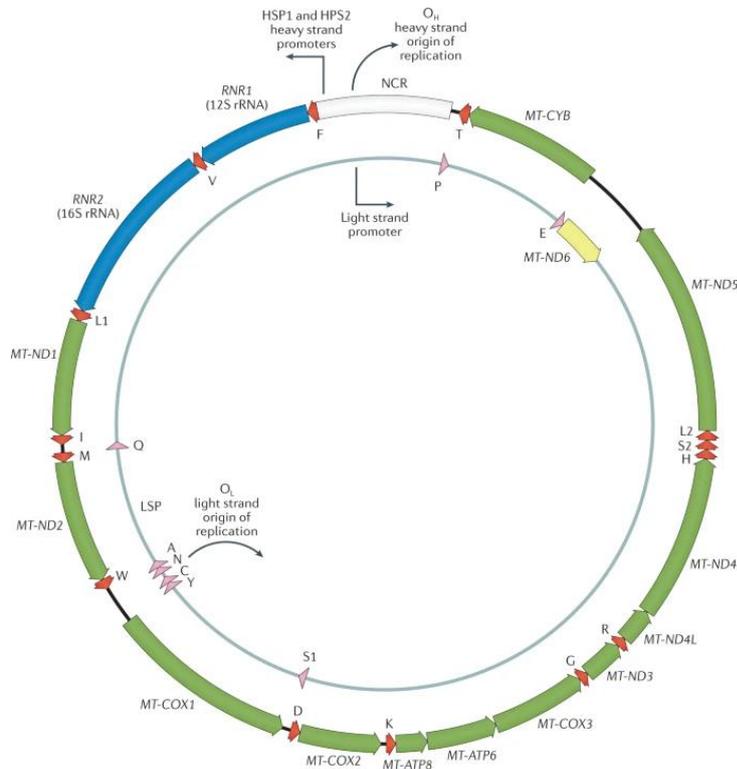


Figura 3. Rappresentazione schematica del mtDNA. Fonte: Stewart et al., *Nature Reviews Genetics*, 22,p106–118.

del mtDNA - altamente compatta e priva di sequenze di *buffering* come gli introni - , nella minore efficienza dei meccanismi di riparazione o in errori nella replicazione da parte di POLG¹³. Anche fattori esogeni quali radiazioni UV, radiazioni ionizzanti, metalli e farmaci chemioterapici¹⁴ possono agire da mutageni del mtDNA. La coesistenza nella stessa cellula di molecole di mtDNA recanti una mutazione e molecole di mtDNA wild-type è una condizione nota come eteroplasmia; al contrario l'omoplasmia si ha quando tutte le molecole di mtDNA, siano esse mutate o wild-type, sono uguali (fig. 4). Di conseguenza, affinché una mutazione manifesti il suo effetto fenotipico è necessario che una certa percentuale di copie di mtDNA sia mutata, una soglia che può variare a seconda della mutazione e del tessuto coinvolto. Mutazioni somatiche omoplasmiche del mtDNA sono state frequentemente riscontrate in tumori oncocitari, dal momento che è necessario che superino una determinata soglia per danneggiare la catena respiratoria; ad esempio, in uno studio condotto sulla mutazione m.3571insC nel gene mitocondriale codificante per la subunità ND1 del CI, è stato dimostrato che la mutazione comporta il disassemblaggio del CI solo se presente in omoplasmia, favorendo *in vivo* una ridotta crescita tumorale e l'acquisizione di un fenotipo tumorale oncocitico¹⁵. È tuttora argomento di dibattito se le mutazioni mitocondriali siano alla base dell'insorgenza del fenotipo oncocitario o se vengano selezionate solo secondariamente. È ormai noto, infatti, che lo shift omoplasmico di mutazioni distruttive del CI favorisca il manifestarsi del fenotipo oncocitario (in accordo con il meccanismo compensatorio), ma non sempre tutti i tumori oncocitari

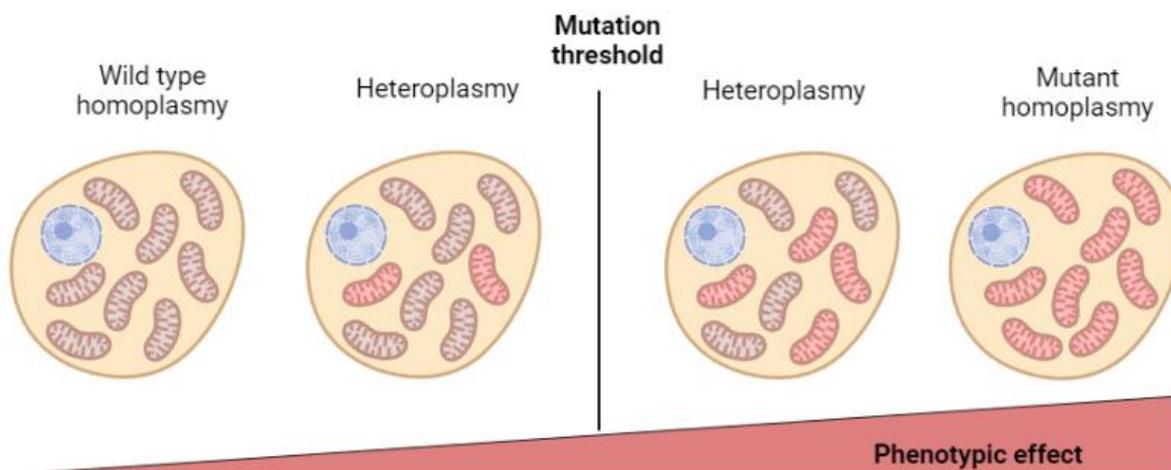


Figura 4. La condizione di omoplasma si raggiunge quando tutte le molecole di mtDNA sono identiche, wild type o mutanti, mentre l'eteroplasma è riferita alla coesistenza di diversi genomi mitocondriali. Per esercitare il loro effetto funzionale, le mutazioni del mtDNA devono essere accumulate e superare una specifica soglia di mutazione che dipende dal tipo di mutazione e dal tessuto o cellula colpiti.

presentano mutazioni del mtDNA: in tumori tiroidei oncocitari privi di mutazioni nel mtDNA sono stati sequenziati anche geni nucleari che codificano per le proteine OXPHOS alla ricerca di difetti mitocondriali, ma non sono state identificate lesioni genetiche funzionalmente significative¹⁶. Ciò potrebbe, ad esempio, essere distintivo di un fenotipo più aggressivo nonostante la trasformazione oncocitaria; i tumori oncocitari tiroidei infatti, sono i più comunemente associati a caratteristiche aggressive e mostrano una frequenza di mutazione del mtDNA inferiore se paragonati agli oncocitomi renali benigni, sebbene non vi sia un chiaro marker molecolare per distinguere le lesioni oncocitarie maligne da quelle benigne¹⁷.

Il perché solitamente vi sia questo accumulo mutazioni del mtDNA è probabilmente da ricondurre alle pressioni selettive che il microambiente esercita sul tumore: l'acidosi, l'ipossia, la ridotta disponibilità di nutrienti, l'azione dei chemioterapici, sono tutte condizioni alle quali la cellula cancerosa potrebbe adattarsi per poter progredire¹⁸. In questo contesto, appare dunque paradossale che le mutazioni riscontrate in omoplasma negli oncocitomi, con il danno bioenergetico che comportano, possano essere selezionate positivamente; diversi studi suggeriscono che ciò avvenga piuttosto per una "selezione negativa rilassata": la maggior parte delle cellule tumorali, specialmente nelle prime fasi della progressione tumorale, è lontana dai vasi sanguigni e si trova in ipossia. Questa condizione favorisce la selezione di tutte le cellule che presentano un metabolismo più glicolitico rispetto a quelle che dipendono dall'OXPHOS, promuovendo dunque indirettamente la selezione positiva delle cellule oncocitarie che, a causa dei deficit presenti a livello della catena respiratoria mitocondriale, attuano un metabolismo più glicolitico¹⁹.

La trasformazione oncocitaria, che sia innescata o meno da mutazioni nel mtDNA, rappresenta un evento secondario all'insorgenza del tumore, determinata da altre mutazioni *driver* a livello nucleare. Ciò è supportato da diverse evidenze: uno studio ad esempio riporta che in un paziente avente 3 noduli tumorali, solo uno di questi fosse oncocitario e avesse una mutazione di tipo distruttivo del CI⁶. In un altro studio, un paziente con oncocitoma nasofaringeo presenta una mutazione frameshift omoplasmica del mtDNA codificante la subunità ND5 del CI²⁰. Questa mutazione era tuttavia già presente nei tessuti del paziente prima della comparsa del tumore, in quanto ereditata a basso grado di eteroplasmia attraverso la linea germinale nella famiglia del paziente, e l'insorgenza del tumore ne ha favorito lo shift omoplasmico solo successivamente. Tale shift omoplasmico potrebbe rappresentare dunque l'elemento predisponente la trasformazione oncocitaria, ma è improbabile predisponga la trasformazione tumorale.

Oncocitomi familiari e ricerca dei geni predisponenti la trasformazione oncocitaria.

La presenza di tumori oncocitari familiari ha portato ad interrogarsi se alla base di questo fenotipo tumorale, così come accade per tutti i tumori, ci possa essere una predisposizione genetica. Attualmente non sono noti oncogeni in grado di predisporre la trasformazione oncocitaria, tuttavia lo studio di diversi casi di oncocitomi familiari, riscontrati esclusivamente in tiroide e rene, costituisce un valido metodo per individuare dei geni potenzialmente coinvolti. La maggior parte dei casi di cancro familiare della tiroide si collocano nel grande gruppo dei tumori tiroidei non midollari (*non-medullary familial thyroid cancer*, NMFTC) e sono comunemente riscontrati in sindromi come la poliposi adenomatosa familiare (FAP), la sindrome di Cowden e la sindrome di Werner. Gli oncocitomi tiroidei (ad eccezione della rara variante oncocitica del carcinoma midollare) costituiscono un piccolo sottogruppo degli NMFTC e possono essere sia benigni (adenomi oncocitici) che maligni (carcinomi oncocitici). Casi di familiarità di oncocitomi tiroidei sono stati ad esempio riportati in uno studio incentrato su tumori NMFTC, in cui Katoh ed i suoi collaboratori hanno riscontrato dei tumori con caratteristiche oncocitarie in due pazienti di sesso femminile ed in entrambe le loro figlie²¹. In una review sul carcinoma papillare ossifilo, Beckner riporta anche due altri casi di tumore oncocitario trasmesso dalle madri alle figlie²², mentre il gruppo di Nagamachi ha descritto il caso di due gemelle, ciascuna avente adenomi multipli della tiroide con caratteristiche fenotipiche dell'oncocitoma, rimossi all'età di 12 e nuovamente rimossi in un secondo intervento²³. Il fatto che anche i tumori oncocitari possano essere ereditari e svilupparsi nello

stesso individuo anche a distanza di tempo, suggerisce fortemente che possa esistere una mutazione germinale in grado di conferire una maggiore probabilità di sviluppare oncocitomi della tiroide. In una famiglia francese con casi ricorrenti di NMFTC con fenotipo oncocitario, il gruppo di Canzian ha individuato, attraverso analisi di linkage, un locus localizzato sul cromosoma 19p13 - denominato TCO (*thyroid tumors with cell oxyphilia*) – che potrebbe essere il fattore predisponente la formazione degli oncocitomi tiroidei sviluppati dalla famiglia, ma all'interno del locus non è stato identificato alcun gene candidato²⁴. Successivamente Devan ed il suo gruppo hanno nuovamente riscontrato una relazione tra lo sviluppo di NMFTC e il cromosoma 19p13.2, fornendo una conferma indipendente di TCO come locus predisponente NMFTC. Contrariamente alla famiglia francese però, i tumori della tiroide sviluppati da questa famiglia non presentavano caratteristiche oncocitarie²⁵. Includendo anche altre famiglie con individui affetti da oncocitoma tiroideo ed aggiungendo più marcatori, l'intervallo in cui ricercare geni candidati per la trasformazione oncocitaria nel locus del TCO è stato ristretto ad 1,6 Mb²⁶. In un primo studio è stato fatto uno screening su diversi geni localizzati nella regione di interesse che potessero essere coinvolti in pathway mitocondriali, nello sviluppo di tumori o nella funzionalità della tiroide: da questa analisi, solo due varianti indipendenti in TIMM44 - una traslocasi della membrana mitocondriale interna responsabile dell'import nella matrice di proteine mitocondriali a codifica nucleare - sembravano co-segregare con il fenotipo oncocitico in due famiglie indipendenti, tuttavia lo studio funzionale di entrambe non ha rivelato effetti negativi sulla funzionalità della proteina²⁷. Un altro gruppo ha riportato mutazioni somatiche e germinali in un altro gene localizzato nel locus TCO, *NDUFA13*, parte del CI e regolatore chiave della morte cellulare. Anche in questo caso però, sebbene fossero state riscontrate delle mutazioni del gene in oncocitomi sporadici, nei sei casi di oncocitomi tiroidei familiari inclusi nello studio, il gene non presentava mutazioni²⁸. È opportuno infine considerare che all'interno della famiglia francese in cui il locus è stato mappato per la prima volta, non vi era alcuna mutazione nei geni codificanti *NDUFA13* e *TIMM44*, escludendo dunque il loro coinvolgimento diretto nella predisposizione all'oncocitoma tiroideo.

Anche in contesti al di fuori del locus TCO si è osservato un aumentato rischio di sviluppo di tumori oncocitici. Un esempio comune è dato dall'insorgenza del fenotipo oncocitario in contesti sindromici familiari ereditari, in concomitanza ad altri tipi di cancro. È stato infatti riscontrato sviluppo di oncocitomi familiari in individui affetti da sindrome di Cowden (CS)²⁹. Questa è una rara malattia genetica ad ereditarietà autosomica dominante causata da mutazioni nel gene oncosoppressore *PTEN*, la cui azione normalmente previene l'iper-proliferazione cellulare, ed è caratterizzata dallo sviluppo di numerosi tumori soprattutto della pelle e delle

mucose del naso e della bocca, ma frequentemente anche della tiroide, dei reni e di altri tessuti del corpo.

Analogamente alla CS, anche la sindrome di Birt-Hogg-Dube (BHD) è caratterizzata da una maggiore suscettibilità allo sviluppo di lesioni a livello cutaneo, renale e polmonare. Questa sindrome – anch'essa autosomica dominante - è generalmente causata da mutazioni nel gene della folliculina (*FLCN*) ed è stata spesso associata allo sviluppo di oncocitomi renali familiari. In uno screening effettuato su 152 pazienti affetti da BHD appartenenti a 49 famiglie, solo 6 individui non hanno sviluppato tumori renali e ben due famiglie presentavano tumori renali oncocitari³⁰. In un altro studio è stata condotta un'analisi genetica su due oncocitomi, uno parotideo ed uno tiroideo, sviluppati rispettivamente da un paziente con BHD e CS: l'oncocitoma parotideo presentava una mutazione germinale in eterozigosi di *FLCN* ed una delezione somatica di un allele di *PTEN*, senza altre anomalie genetiche rilevanti. Curiosamente, l'oncocitoma tiroideo del paziente affetto da CS presentava la stessa doppia eterozigosi per entrambi i geni, in quanto aveva una mutazione germinale in eterozigosi di *PTEN* ed anche una delezione somatica di un allele di *FLCN*³¹. Tali difetti genetici, speculari in queste neoplasie oncocitarie associate a BHD e CS, hanno suggerito che le due sindromi possano essere correlate e che *FLCN* e *PTEN* possano convergere in un pathway comune; la deregolazione di questo pathway potrebbe concorrere alla trasformazione oncocitaria in una modalità d'azione alternativa rispetto alle mutazioni patogene del mtDNA (non riscontrate in questi tumori), modulando ad esempio la via di segnalazione di mTORC1 (già noto target di *PTEN* e *FLCN*) che a sua volta è in grado di regolare la trascrizione di *PGC1a* ed incrementare la biogenesi mitocondriale³². È opportuno, tuttavia, considerare che non sono state rilevate mutazioni *FLCN* e/o *PTEN* in 22 casi di oncocitomi sporadici, suggerendo che questa doppia eterozigosi potrebbe essere associata esclusivamente ad un contesto sindromico.

Sebbene lo studio di oncocitomi in sindromi le cui cause genetiche sono note favorisca la ricerca di geni in grado di determinare la trasformazione oncocitaria, la maggior parte delle mutazioni identificate finora sembrerebbero essere esclusive di una specifica famiglia o presenti solo in un numero molto piccolo di famiglie/casi. La ricerca è resa ancora più difficile se si considera che il cambiamento fenotipico si verifica in pochi casi e non in tutti gli individui affetti dalla sindrome. Nella maggior parte delle famiglie con tumori oncocitari ereditari, ad oggi non sono state identificate alterazioni genetiche causative del fenotipo. Questi studi, tuttavia, suggeriscono che nel ricercare geni candidati predisponenti la trasformazione oncocitaria, i geni nucleari codificanti per proteine coinvolte nella funzionalità mitocondriale non devono essere

trascurati, distinguendoli in modo opportuno da quelli che predispongono alla trasformazione neoplastica.

Stress ossidativo e ruolo del glutathione nel cancro

In uno studio comparativo su oncocitomi renali e tessuti renali sani adiacenti, condotto mediante approcci multi-omici, l'analisi del metaboloma ha rivelato un consistente aumento nei livelli intracellulari dell'antiossidante glutathione (GSH), giustificato dagli autori dalla necessità di detossificare i ROS prodotti dal deficit nel funzionamento del CI o CIII della catena respiratoria – frequentemente riscontrati in questo tipo di tumore – al fine di sostenere la sopravvivenza e la crescita del tumore³³. Secondo gli autori il mantenimento di ROS ad un livello basso sarebbe inoltre in grado di prevenire una trasformazione maligna del tumore impedendo ai radicali liberi di agire come mutageni. Il glutathione è il più importante antiossidante non enzimatico della cellula: esso è un tripeptide costituito da glutammato, cisteina e glicina sintetizzato da due enzimi ATP-dipendenti – la cisteina-glutammato ligasi (GCL) e la GSH sintetasi (GS) – entrambi localizzati nel citosol, con un meccanismo strettamente conservato tra gli organismi³⁴ (fig.5).

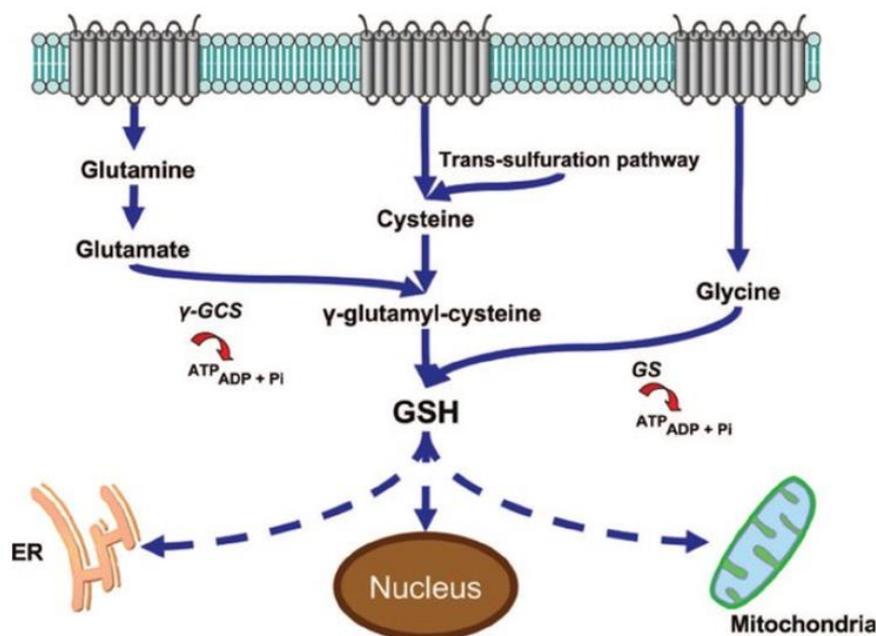


Figura 5. Sintesi del glutathione. Il GSH è un tripeptide formato dagli aminoacidi glutammato, cisteina e glicina: La sintesi del glutathione è mediata dall'attività della cisteina-glutammato ligasi (GCL) e della glutathione sintetasi (GS). Il glutathione è distribuito liberamente nel citosol e può essere compartimentato nei mitocondri, nel reticolo endoplasmatico o nel nucleo dove partecipa a processi biologici distinti. Fonte: Franco et al., Archives of Physiology and Biochemistry 113(4-5):234-58.

Il tiolo (gruppo -SH) della cisteina costituente il GSH è responsabile della sua capacità antiossidante: quando il GSH riduce la molecola bersaglio, il residuo si ossida formando

glutathione disolfuro (GSSG), costituito da due molecole di GSH ossidate unite tra loro da un ponte disolfuro. Questo infine è nuovamente ridotto in due molecole di GSH grazie all'azione della glutathione reduttasi (GR) che utilizza gli equivalenti riducenti forniti dal coenzima NADPH, per attuare un meccanismo di riciclaggio rapido volto a garantire che il pool di glutathione all'interno della cellula sia ampiamente ridotto a discapito del GSSG³⁵. Il GSH citosolico rappresenta il 70% del glutathione cellulare totale, mentre nei mitocondri, nel nucleo ed in minor parte nel reticolo endoplasmico è localizzato il restante 30%; le concentrazioni sono generalmente comprese tra 1 e 11 mM³⁶. Il GSH è implicato in diversi meccanismi di difesa dallo stress ossidativo (fig.6): può infatti eliminare direttamente i radicali liberi e ridurre l'H₂O₂ ad H₂O ed O₂ e partecipa anche come cofattore a diverse reazioni, inclusa l'eliminazione dei perossidi da parte della GSH Perossidasi (GPx) e l'eliminazione di agenti xenobiotici da parte della glutathione S-transferasi (GST).

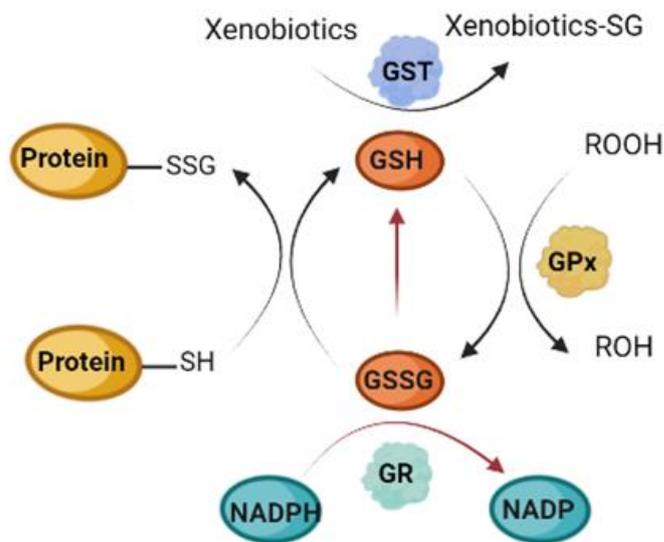


Figura 6. Meccanismi antiossidanti del glutathione. La detossificazione dei perossidi mediata dalla glutathione perossidasi (GPx), l'eliminazione di xenobiotici ad opera della glutathione s-transferasi (GST) e la prevenzione dell'ossidazione proteica da parte dei ROS mediante glutathionilazione, rappresentano le funzioni principali svolte dal glutathione. La sua forma ossidata è nuovamente ridotta dalla glutathione reduttasi (GR) per mezzo dell'*NADPH*, al fine di garantire uno stato ridotto del pool di GSH intracellulare.

Il meccanismo d'azione più studiato tuttavia, prevede il legame del GSH ai gruppi tiolici proteici attraverso una reazione di glutathionilazione, una modificazione post-traduzionale reversibile: quando il gruppo tiolico di una proteina (P-SH) viene ossidato ad acido sulfenico (P-SOH) dai ROS, il GSH reagisce rapidamente legandosi ad esso e prevenendo un'ulteriore ossidazione che inattiverebbe irreversibilmente la proteina target. Questo evento oltre a rappresentare un meccanismo di protezione efficace, determina cambiamenti strutturali importanti nella proteina (aumento del peso molecolare di ~305,6 g/mol e un netto aumento della carica negativa dato dal glutammato) cui inevitabilmente seguono cambiamenti

funzionali³⁷. Per rimuovere il GSH legato ai tioli e ripristinare la normale funzionalità proteica, invece, è necessaria una reazione di deglutationilazione (fig.7), catalizzata da due degli enzimi della famiglia delle glutaredossine (GLRX) che esplicano il loro ruolo in diverse localizzazioni subcellulari: GLRX1 si trova nel citosol, mentre GLRX2 è localizzata prevalentemente nella matrice mitocondriale e nel nucleo.

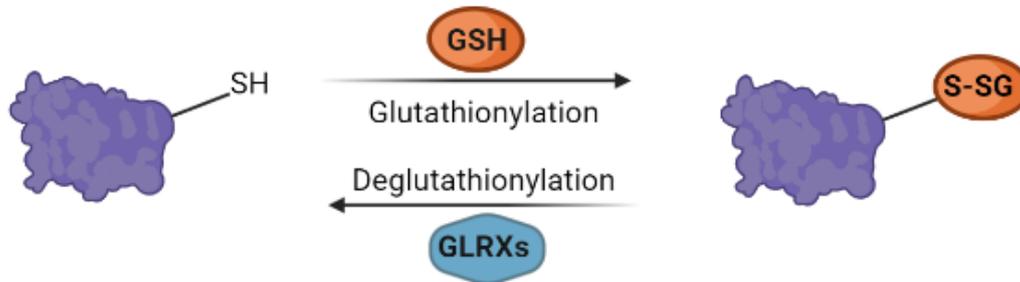


Figura 7. La glutationilazione proteica è una modifica post traduzionale reversibile che prevede il legame covalente di una molecola di GSH ai gruppi tiolici delle proteine e ricopre un ruolo sia nella segnalazione cellulare sia nella protezione proteica da danni causati da ROS, determinando però cambiamenti strutturali e funzionali. La normale struttura e funzionalità proteica è ripristinata dalle glutaredossine mediante la deglutationilazione.

La glutationilazione non costituisce solo un meccanismo di difesa da stress ossidativo ma, attraverso la modulazione dell'attività proteica, rappresenta parte dei meccanismi di segnalazione redox che hanno luogo in condizioni fisiologiche nella cellula. La maggior parte delle cellule di cancro ha un livello di ROS più elevato rispetto al tessuto sano circostante; ciò supporta la crescita tumorale, la proliferazione, la metastatizzazione e la sopravvivenza in vari microambienti o condizioni³⁸. L'aumento della produzione di ROS da parte di molte cellule tumorali si verifica spesso in concomitanza con una maggiore espressione e attività dei sistemi antiossidanti. È ad esempio nota la sovraregolazione di *NRF2* (*nuclear factor, erythroid-derived 2-like 2 factor*) in un'ampia gamma di tumori tra cui mammella, ovaio, prostata, pelle, polmone e pancreas³⁹. Tra i diversi target di questo fattore di trascrizione vi sono diversi enzimi responsabili sia della sintesi del glutatione che del suo utilizzo⁴⁰; il GSH infatti modula l'attività di diverse proteine, inclusi fattori di trascrizione come p53, c-jun e HIF1 α . In uno studio su cellule tumorali di colon trattate con farmaci chemioterapici come il CPT e il cisplatino è stato osservato che circa il 6-10% della p53 totale fosse glutationilato e che questa glutationilazione aumentasse in seguito a stress ossidativo. È stato inoltre visto che la modificazione determinava cambiamenti strutturali in p53 impedendone il legame al DNA. Gli autori dello studio hanno ipotizzato che essendo p53 un attore chiave nell'espressione di molti geni proapoptici (*PUMA*, *Bax* ecc.), l'inattivazione del soppressore tumorale attraverso la glutationilazione potesse rappresentare una strategia di adattamento della cellula tumorale per sopprimere i segnali

apoptotici e promuovere la sopravvivenza⁴¹. In un altro studio è stato osservato che in condizioni di ipossia la glutationilazione di HIF1 α ne incrementa la stabilità, con conseguente aumento dell'espressione dei geni da esso regolati e coinvolti nello shift glicolitico tumorale, attuato come strategia di sopravvivenza a tale condizione; questo effetto è stato poi annullato dalla sovraespressione di GLRX1 che, mediando la deglutinationilazione di HIF1 α , ne ha ridotto la stabilità, abbassando anche i livelli di mRNA dei suoi geni responsivi⁴².

La glutationilazione, oltre a svolgere una normale funzione protettiva, sembrerebbe essere in grado di modulare la funzione di una serie di proteine che svolgono un ruolo importante nello sviluppo, nella progressione e nella metastasi del tumore; ciò ha recentemente reso il glutatione e tutti gli enzimi coinvolti nel suo metabolismo un valido bersaglio per lo sviluppo di farmaci nella terapia anticancro. Nel panorama degli enzimi coinvolti nel metabolismo del glutatione, la GLRX2 con le sue due isoforme localizzate nel mitocondrio e nel nucleo, potrebbe essere un target di studio interessante per modulare l'attività di diverse proteine. A differenza di GLRX1, esclusivamente citosolica, la GLRX2 è caratterizzata da un sito catalitico la cui sequenza amminoacidica differisce dalle altre proteine della famiglia per un amminoacido (CSYC contro il più comune CPYC); tale cambio P/S è stato associato ad una maggiore affinità della proteina ai substrati glutationilati rispetto a GLRX1⁴³. Si sa ancora molto poco su questa proteina nel cancro; è stato dimostrato che cellule tumorali con sovraespressione di *GLRX2* sono più resistenti allo stress ossidativo indotto da doxorubicina⁴⁴. Ancora più importante, è stato visto in cellule HeLa che GLRX2 preserva uno stato antiossidante e antiapoptotico, anche quando altri enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi 1 e la tioredossina riduttasi risultano disfunzionali⁴⁵. Sebbene siano state studiate in contesti differenti dal cancro, è stata individuata una vasta gamma di proteine target, prevalentemente mitocondriali, la cui funzionalità dipende dai meccanismi di deglutinationilazione mediati da GLRX2: l'assenza della proteina è stata infatti associata all'alterazione dell'attività di diversi enzimi del ciclo di Krebs, della catena respiratoria e della fusione/fissione mitocondriale⁴⁶; l'alterazione della glutationilazione di queste proteine chiave del metabolismo, in un contesto tumorale, potrebbe dunque avere un ruolo chiave nella progressione tumorale.

Sindrome dell'HPT-JT in relazione al fenotipo oncocitario.

Il cancro della paratiroide è un tumore raro il cui unico trattamento curativo noto prevede la resezione chirurgica completa. Può presentarsi sporadicamente o in contesti sindromici familiari, come nel caso della sindrome dell'iperparatiroidismo con tumore della mandibola

(HPT-JT)⁴⁷. I principali segni clinici della sindrome sono l'ipercalcemia, alti livelli di paratormone circolante e l'elevata incidenza di tumori della paratiroide nei soggetti affetti (sia adenomi che carcinomi). L'identificazione del principale driver genetico dell'HPT-JT, il gene *CDC73*, ha aiutato nella diagnosi molecolare e anche nel follow up dei soggetti a rischio di sviluppare una lesione paratiroidea nelle forme familiari⁴⁸. La sindrome è ad ereditarietà autosomica dominante, le mutazioni generalmente riscontrate sono puntiformi o piccole inserzioni, sebbene siano stati riportati casi di grandi delezioni parziali o complete del gene⁴⁹. *CDC73* codifica per la parafibromina, una delle proteine costituenti il complesso Paf che si associa alla RNA polimerasi II e che, pertanto, è coinvolta in processi trascrizionali, nonché nella regolazione del ciclo cellulare⁵⁰. È stato infatti visto che la parafibromina induce l'arresto del ciclo cellulare reprimendo la trascrizione della ciclina D1 attraverso l'interazione con l'istone metiltransferasi SUV39H1⁵¹. La maggior parte delle mutazioni del gene *CDC73* (> 80%) è con perdita di funzione, risultando nel troncamento prematuro della proteina; ciò, insieme alla perdita di eterozigosi (loss of heterozygosity, LOH) del locus di *CDC73*, un evento genetico comune che coinvolge geni oncosoppressori, determina una mancata regolazione della proliferazione cellulare con la conseguente trasformazione tumorale cellulare. Caratteristica principale dell'HPT-JT è infatti l'iperattività delle ghiandole paratiroidei, solitamente causata dalla presenza di carcinomi paratiroidei; gli individui affetti possono inoltre presentare fibromi ossificanti della mandibola e, meno frequentemente, tumori renali e uterini^{52,53}.

I membri della famiglia oggetto di questo lavoro di tesi sono affetti da HPT-JT, causata da una grande delezione che interessa i primi dieci esoni di *CDC73*; la particolarità che ha suscitato interesse nell'approfondire lo studio di questa famiglia è che 4/5 membri affetti hanno sviluppato tumori oncocitari della paratiroide (fig.8), fenotipo generalmente non associato alla sindrome⁵⁴⁻⁵⁶, spingendoci quindi a ricercare dei possibili determinanti genetici comuni che possano aver predisposto la trasformazione oncocitaria dei tumori sviluppati. I soggetti della famiglia hanno sviluppato sia adenomi che carcinomi oncocitari; in particolare al soggetto I.2 è stato diagnosticato un adenoma paratiroideo oncocitario all'età di 62 anni; II.2 ha sviluppato un carcinoma paratiroideo oncocitario con metastasi tiroidea all'età di 42 anni ed è morto a 46 anni; i soggetti II.3 e II.4 hanno sviluppato rispettivamente un adenoma paratiroideo oncocitario all'età di 47 anni e un carcinoma paratiroideo all'età di 37 anni e ad oggi risultano entrambi privi di recidive⁵⁷. Una prima caratterizzazione istologica e molecolare di questi tumori è già stata descritta dal nostro gruppo in un recente lavoro⁵⁷ e costituisce la parte preliminare di questo studio, proseguito con l'obiettivo di approfondire ulteriori aspetti che possano aver contribuito alla trasformazione oncocitaria dei tumori dei pazienti.

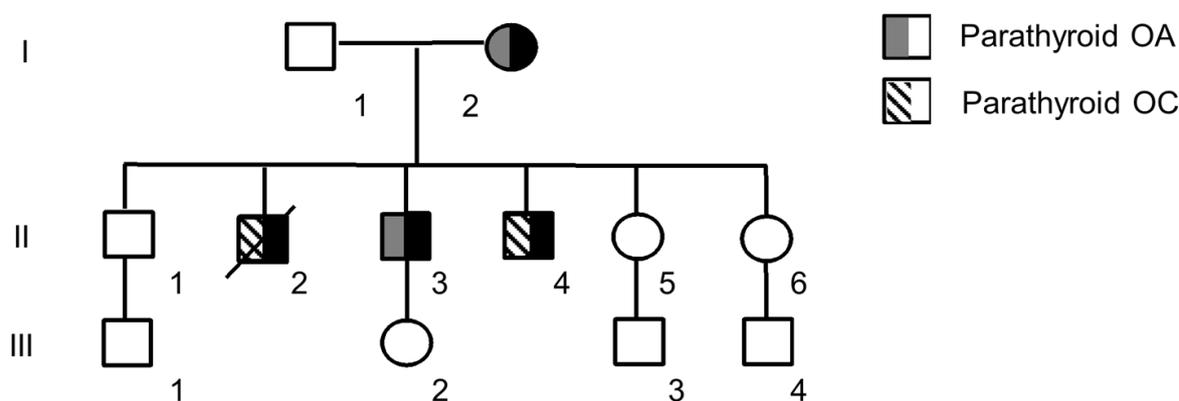


Figura 8) Albero genealogico della famiglia affetta da HPT-JT. In nero: membri della famiglia portatori della delezione in CDC73

Nel complesso, i membri di questa famiglia affetti da HPT-JT hanno sviluppato adenomi o carcinomi, tutti caratterizzati da un fenotipo oncocitario distinto. Una delle caratteristiche distintive delle neoplasie oncocitarie è la presenza di mutazioni omoplasmiche del mtDNA di tipo distruttivo in geni che codificano subunità della catena respiratoria mitocondriale. Il sequenziamento dell'mtDNA nei tumori dei pazienti ha permesso di individuare diverse mutazioni somatiche patogene del mtDNA, insieme ad una rara variante germinale - m.2356A>G - presente nel sangue di tutti gli individui affetti.

La variante germinale *novel* a carico del gene *MT-RNR2*, codificante l'RNA ribosomiale 16S e ampiamente descritta nel lavoro precedentemente citato⁵⁷ con dati antecedenti a questo elaborato, si è rivelata responsabile del rallentamento della sintesi proteica mitocondriale ed è stata riscontrata ad alti livelli di eteroplasmia nei tumori di tutti i soggetti ad eccezione del carcinoma paratiroideo del soggetto II.2 e della rispettiva infiltrazione tiroidea, in cui è stato osservato uno shift omoplasmico dell'allele wild type e, di conseguenza, una concomitante controselezione dell'allele mutato. Laddove i livelli di eteroplasmia delle mutazioni del mtDNA aumentino al punto da superare la soglia oltre la quale si manifesta l'effetto fenotipico, sono in grado di impattare sulla funzionalità della catena respiratoria mitocondriale, determinando una crisi metabolica responsabile del rallentamento della replicazione e della riduzione dell'aggressività del tumore, che acquisisce così un fenotipo indolente⁵⁸. Anche in questo caso nel tumore più benigno (adenoma del soggetto I.2) si è osservato un accumulo maggiore di mutazioni omoplasmiche patogene del mtDNA in aggiunta alla variante germinale, mentre non sono state riscontrate mutazioni somatiche – ad eccezione della mutazione in *MT-ND6* nell'infiltrazione tiroidea - nel tumore più aggressivo e metastatico del soggetto II.2, in cui anche la variante patologica germinale è stata controselezionata, a sostegno dell'ipotesi che per

favorire la progressione tumorale sia necessaria una catena respiratoria correttamente funzionante. La variante individuata, tuttavia, potrebbe aver favorito l'insorgenza e l'accumulo delle mutazioni mitocondriali somatiche osservate nei tumori di tutti gli altri individui. La disfunzione nella sintesi proteica mitocondriale generata dalla m.2356A>G, infatti, potrebbe aver determinato uno shift glicolitico nelle cellule recanti la mutazione, favorendo quindi la loro selezione durante quelle fasi di accrescimento tumorale in cui viene prediletto un metabolismo più glicolitico al fine di garantire una rapida crescita del tumore. Ciò potrebbe aver determinato la spontanea insorgenza di altre mutazioni dell'mtDNA ed il loro accumulo oltre la soglia fenotipica, promosso da dei meccanismi di selezione negativa "rilassata". L'assenza della mutazione germinale in *MT-RNR2* nel tumore del soggetto II.2, anch'esso con fenotipo oncocitario, ha permesso di escludere che quest'ultima possa essere la causa della trasformazione oncocitaria dei tumori della famiglia, suggerendo la ricerca di un determinante genetico a codifica nucleare.

Scopo della tesi

La presenza di tumori oncocitari familiari suggerisce che anche per questo particolare fenotipo tumorale vi possa essere una predisposizione genetica. Ad oggi, tuttavia, non sono ancora stati individuati dei geni nucleari candidati in grado di determinare la trasformazione oncocitaria nei tumori familiari studiati. In questo contesto, lo studio genetico di oncocitomi insorti in contesti familiari sindromici in cui il gene responsabile dello sviluppo della sindrome è noto e non correlato al fenotipo osservato, può facilitare l'individuazione di possibili geni candidati.

Diversi membri di una famiglia affetta HPT-JT a causa di un'ampia delezione nel gene *CDC73*, hanno sviluppato tumori paratiroidei (adenomi o carcinomi), tutti con fenotipo oncocitario. Dal momento che la causa genetica predisponente la trasformazione neoplastica in questa sindrome risiede nella delezione del gene *CDC73* e che ad oggi non è stata riscontrata alcuna correlazione tra mutazioni che coinvolgono questo gene e l'insorgenza del fenotipo oncocitario, lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare e studiare il/i determinante/i genetico/i nucleare che possa aver favorito la trasformazione oncocitaria nei tumori della famiglia in esame ed offrire quindi uno spunto per lo studio di nuovi target in grado di modulare il fenotipo tumorale e quindi di possibile impiego nella terapia anticancro.

Materiali e metodi

Raccolta campioni pazienti HPT-JT

I campioni sono stati raccolti presso l'Ospedale S. Orsola-Malpighi e il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i soggetti analizzati (protocollo approvato dal Comitato Etico AVEC della Regione Emilia-Romagna, N.497/2018/Sper/AOUBo). Il sangue periferico è stato prelevato da 4 individui (I.2, II.3, II.4 e II.5) affetti dalla sindrome HPT-JT, a causa di una grande delezione del gene *CDC73* ereditata in eterozigosi (Fig.8). Un campione di sangue periferico di controllo è stato ottenuto da due altri individui appartenenti alla stessa famiglia ma non affetti dalla sindrome (II.1 e II.6, Fig.8). Dal paziente II.3 sono stati prelevati anche i fibroblasti, successivamente messi in coltura ed impiegati per le analisi di *quantitative real time PCR* (qRT-PCR). Sezioni di tessuto in paraffina (FFPE) erano disponibili da tre individui della famiglia: un adenoma oncocitario paratiroideo (I.2) e rispettivo tessuto sano; carcinoma paratiroideo oncocitario (II.2), infiltrazione tiroidea del carcinoma paratiroideo oncocitario e rispettivo tessuto tiroideo normale (II.2); carcinoma paratiroideo oncocitario e rispettivo tessuto paratiroideo normale (II.4).

WES- whole exome sequencing

Il DNA genomico dei pazienti I.2, II.4 e II.6 è stato estratto a partire da linfociti del sangue periferico utilizzando il kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen #51106). È stata quindi allestita una libreria di frammenti sequenziata con reads single-end da 100bp con la piattaforma Illumina HiSeq2500. Il BWA aligner (v.07.5a) è stato utilizzato per allineare le reads sul genoma di riferimento umano hg.19. L'analisi bioinformatica è stata poi condotta utilizzando una pipeline di analisi interna precedentemente riportata⁵⁹. La resa del sequenziamento e le metriche di coverage per ogni campione sono elencate nella tabella sottostante (Tab. 1). Sono state considerate le varianti in grado di alterare la sequenza proteica (SNV, siti di splicing e inserzioni/delezioni) con bassa frequenza allelica $\leq 0.1\%$ e con uno score di patogenicità CADD non assegnato (per indels) o ≥ 15 (per SNV). Sono state filtrate solo le varianti condivise dai soggetti I.2 e II.4 (in quanto portatori della delezione), mentre per il soggetto II.6 (non portatore) è stato consentito qualsiasi genotipo. Le successive analisi di associazione delle varianti individuate con il fenotipo oncocitario sono state condotte attraverso il software Phenolyzer (<http://phenolyzer.wglab.org/>) e Cytoscape (<https://cytoscape.org/>).

Family ID	I.2	II.4	II.6
Total bases	1409518420	1585292722	1348402752
Mean on-target coverage	40.80	45.89	39.03
Median on-target coverage	57	64	55
Percentage of target >20X	79.9	83.2	77.6
Percentage of duplicate reads	18	22	25

Tabella 1. Resa del sequenziamento e metriche di coverage per ogni campione.

Colture Cellulari

In questo lavoro sono state utilizzate due linee cellulari tumorali stabili, una derivata da tumore papillare della tiroide (TPC1) ed una derivata da carcinoma coloretale (HCT116). Le linee sono state coltivate rispettivamente in RPMI (Euroclone #ECB9006L) e DMEM high glucose (Euroclone #ECM7501L) supplementati con 10% FBS (Euroclone #ECS0180L), 2 mM L-glutamina (Euroclone #ECB3000D), 1mM penicillina/streptomicina (Euroclone #ECB3001D), in incubatore umidificato a 37°C in atmosfera contenente il 5% di CO₂. Al fine di standardizzare gli esperimenti, le linee cellulari sono state sostituite con un nuovo batch di cellule ogni mese ed è stata verificata l'assenza di micoplasma prima dello smaltimento e dopo ogni scongelamento. Dove specificato nei successivi paragrafi, le cellule sono state trattate con acqua ossigenata (Merck #H1009) alle concentrazioni e per i tempi indicati.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

In seguito al cross-linking con 1% formaldeide le cellule HCT116 e i Fibroblasti CDC73^{+/+} sono stati lisati e gli estratti nucleari sono stati sonicati con il sonicatore Bioruptor® Pico (Diagenode). La cromatina è stata precipitata con le biglie magnetiche *Magna ChIP™ Protein G Magnetic Beads* (Millipore, #16-662) e l'anticorpo α -H3K27Ac (Abcam, #ab4729) concentrato 1ug for $>20 \cdot 10^6$ cellule. I frammenti di DNA immunoprecipitati sono stati analizzati mediante qPCR con le coppie di primer elencate in tabella 2, prendendo in considerazione i promotori di *GLRX2* e *CDC73* e la regione tra di essi compresa. Per ogni esperimento, una quantità di cromatina corrispondente all'1% della cromatina utilizzata per l'immunoprecipitazione è stata mantenuta come controllo di input. Ciascun valore di qPCR è

stato normalizzato rispetto al relativo controllo e riportato nei grafici come percentuale di input (valore qPCR/valore di input \times 100).

GLRX2_P	fw: 5'-ACACCAGAAAACCTGTTCCGTT-3'
	rev: 5'-ACAAGACGCCGCAATCAATT-3'
CDC73_P	fw: 5'-TTCTCCTGGCCCAAGAATGT-3'
	rev: 5'-GGGAGGGGTTAAGAAAGAGGT-3'
Pos_CT (GAPDH)	fw: 5'-ATTGGGCGCCTGGTCAC-3'
	rev: 5'-AACATGTAAACCATGTAGTTGAGGTCA-3'
Neg_CT	fw: 5'-AGAGTTCTCTGCTGCCTTGT-3'
	rev: 5'- AGTGCAAGGTCAAGAGGTCA-3'
#0	fw: 5'-AATCCTTCAAATTGGCCGGG-3'
	rev: 5'-GTTTCACTATGTTGGCGGG-3'
#1	fw: 5' -ACAGATCCCCAAATGACCACT- 3'
	rev: 5' -GATTTGGCCTGCAGAGTTGT- 3'
#2	fw: 5'-CAAAGCCTATCTGTGGTCTG-3'
	rev: 5'-TCCCCTCCCATGTATTCTCCT-3'
#3	fw: 5'-CAAAGCCTATCTGTGGTCTGTT-3'
	rev: 5'-CATCATCGCATTCCAGCCTG-3'
#4	fw: 5'-CTTGACAGAGCCCTTATGTGG-3'
	rev: 5'-TGCCGACTCTTCACAGTTCT-3'
#6	fw: 5'-AGTTCAGCTAAAGACGGGGT-3'
	rev: 5'-CCCTTTTCTTCCCTTTCACCC -3'
#7	fw: 5'-GCAATTTGGCATCCTCAGCA-3'
	rev: 5'-CAAATATCACCAGGGGCACAC-3'
#8	fw: 5'-TTCTATCCTTGTGCTGGCCC-3'
	rev: 5'-AAACTAAGGAGGATGTCTTTGCA-3'
#9	fw: 5'-TGCATGTTTATCTGTCTAACTGGT-3'
	rev: 5'-TCCTCATGAAGTCTTCCTCACT-3'
#10	fw: 5'-AGTACTCATTTTGGCAGCACG-3'
	rev: 5'-AGTACGGTAACAAGGGCTATTCA-3'
#11	fw: 5'-TTACTGTGAGAGCAAACGTGG-3'
	rev: 5'-GAAACTGTTCTGGCTTCAAACA-3'
#12	fw: 5'-TCACTTGTTTTCAGCAGGGG-3'
	rev: 5'-CCCCAGCAGGTTAGACTCTAG-3'
#13	fw: 5'-TAGCAGCTCCTTTCACCTGG-3'
	rev: 5'-CCTGGTTCTGATGCTTGCTC-3'
#14	fw: 5'-TCATGCCTGTAATCCCAGCA-3'
	rev: 5'-CGGGGTTTCACTGTGTTAGC-3'
#15	fw: 5'-ACTCCGAAACTGAACAGCAA-3'
	rev: 5'-TGACCTCGTGATCTGCCC-3'

Tabella 2. Lista dei primer per qPCR utilizzati in seguito alla ChIP con α -H3K27Ac sulla linea HCT116 e sui fibroblasti CDC73+/+.

CRISPR Interference (CRISPRi)

I sgRNA per la CRISPRi – elencati in tabella 3 - sono stati disegnati con i tool CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) e IDT (<https://eu.idtdna.com/pages>); ognuno di essi è stato singolarmente clonato nel vettore lentivirale pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro (Addgene, #71236) con l'enzima di restrizione BsmBI. Le TPC1 e HCT116 sono state infettate con le guide dirette contro la regione prossimale (Reg1) e distale (Reg2) a *GLRX2* individuate rispettivamente dalle coppie di primer #4 e #12 della ChIP (tab. 2), le guide contro i promotori di *CDC73* e *GLRX2* ed una guida non-targettante (NT1) come controllo. Le cellule infettate sono state selezionate con 1 µg/ml di puromocina per 7 giorni e, una volta terminata la selezione, tenute alla dose di mantenimento 0.5 µg/ml.

GLRX2prom	5'-CACCGCCAAATCATGGTCAGAGCC-3'
CDC73prom	5'-CACCGCTGCTGTTGGTTCGTCGCGG-3'
Reg1	5'-CACCGCTTCACAGTTCTTGATCAGG-3'
Reg2	5'-CACCGACCACTTGAGTCAATCCCC-3'
Reg2 g2	5'-TCCAGGGGGATTGACTCAAG-3'
Reg2 g3	5'-CTTCCACCCTTAATTGGGAC-3'

Tabella 3. Elenco dei sgRNA impiegati per la CRISPRi.

Estrazione di RNA, retrotrascrizione e qRT-PCR

L'RNA è stato estratto dai pellet cellulari utilizzando *l'RNasy mini-kit* (QIAGEN #74106) e quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). Trecento nanogrammi di RNA totale sono stati retrotrascritti utilizzando il kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems #4368814) con esameri casuali. La PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) è stata eseguita utilizzando una mastermix contenente il fluoroforo intercalante *SYBR® Green dye* (Promega). Le sequenze dei primer sono state progettate utilizzando il software Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). La formazione di omodimeri ed eterodimeri è stata esclusa utilizzando il tool IDT OligAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/analyzer/>) e la struttura secondaria del cDNA della sequenza target è stata stimata con il server web Mfold (<http://www.unafold.org/>). Per l'allestimento della reazione è stata impiegata la GoTaq qPCR Master Mix (Promega #A6002). Sono stati utilizzati i seguenti primer: GLRX2mt (Fw 5'-CCGGGCTCTGACCATGATTT- 3', Rev. 5'-AGATGATGATGTATTGCTCTCCA), GLRX2 (Fw5'-TCTTTGGAGAATTTAGCGACGG-

3', Rev. 5'-TTCAAGCAGGTCCAGTTCCA- 3'), TBP (Fw 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA- 3', Rev. 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA- 3'), U2AF2 (Fw 5'-CAGTGTTGGCTGTGCAGATT- 3', Rev. 5'-GCCTGCGGATCTTTAGTGAC-3'). La reazione di amplificazione è stata condotta nella macchina *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystem), utilizzando le seguenti condizioni: 95 °C 5 min; 40 cicli di 95 °C 15 s e 63 °C 45 s. La quantificazione relativa è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ [$2^{\Delta CT}$ (esperimento)/ $2^{\Delta CT}$ (reference)]. La significatività statistica è stata calcolata sui valori di ΔCT [CT (gene target) -CT (gene housekeeping)] per ogni replicato biologico. Per valutare l'espressione di GLRX2 e CDC73 in seguito alla CRISPRi sono state usate le coppie di primer GLRX2 e TBP sopraindicate, insieme alla coppia CDC73 (Fw 5'-TTGTGGTGAAGGGAGACGAA-3', Rev. 5'- GTTGGCCTTCCTTTCCAGTC-3'). La reazione è stata allestita utilizzando la Ssofast EvaGreen Super Mix (Bio-Rad) secondo le istruzioni del fornitore e condotta nella macchina CFX96 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). Il silenziamento dei target è stato valutato in relazione al campione di controllo (cellule infettate con la guida NT1), normalizzando per il gene housekeeping TBP.

Colorazione con ematossilina ed eosina (H&E) ed immunoistochimica (IHC)

I tessuti inclusi in paraffina sono stati tagliati al microtomo in sezioni dello spessore di 4µm ed utilizzati per la colorazione Ematossilina-Eosina (H&E) e le analisi di immunoistochimica (IHC). Per l'H&E le sezioni sono state deparaffinate, reidratate, colorate per 5min a temperatura ambiente (t.a.) con ematossilina e, in seguito al lavaggio con acqua, con eosina per 3 min. Dopo un ulteriore lavaggio sono state disidratate; per il montaggio del vetrino copri-oggetto è stato impiegato il montante Bio Mount HM (Bio Optica #05-BMHM100). Per l'IHC è stato impiegato l'anticorpo anti-GLRX2 (Sigma, #HPA023087) diluito 1:400. Le sezioni sono state deparaffinate, reidratate e sottoposte a smascheramento dell'antigene in bagnetto a 98.5°C usando il buffer Tris-EDTA a pH 9.0 (20 min). L'attività della perossidasi endogena è stata inibita utilizzando una soluzione di H₂O₂ allo 0,5% in metanolo per 20 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state incubate overnight a 4°C e successivamente processate con un metodo di detection che non prevede l'uso di biotina (Novolink, Novocastra) secondo le istruzioni del fornitore. Per lo sviluppo le sezioni sono state incubate per 10 min con una soluzione di 3,3'-diaminobenzidina (DAB)/H₂O₂ in PBS a pH 7.2-7.4. Le sezioni sono poi state lavate con acqua distillata, sottoposte a colorazione di contrasto con ematossilina di Harris e

disidratate; per il montaggio è stato impiegato il montante Bio Mount HM (Bio Optica # 05-BMHM100).

Editing genetico CRISPR-Cas9 per la generazione delle linee *GLRX2* knock-out.

Partendo dalle linee tumorali impiegate, sono stati generati due modelli *knock-out* (KO) per *GLRX2* mediante il sistema di editing genetico *Alt-R CRISPR-Cas9 System* (Integrated DNA Technologies, IDT). Sono stati acquistati da IDT tre crRNA diversi aventi come target l'esone 4 (1) ATCCTGTTCTTACTGTACAA-TGG; 2) ACTGGTTTCCATATTCAAGC-AGG 3) GAACTGGACCTGCTTGAATA-TGG), per ottenere il knock-out di tutte le isoforme e sono stati impiegati secondo le istruzioni del produttore. Allo scopo di individuare il crRNA più efficiente nel procedimento di gene editing, i tre crRNA sono stati miscelati separatamente con il tracrRNA (IDT #1072532) ed il Nuclease-free Duplex Buffer (IDT #11-0-03-01) forniti dal kit, con una concentrazione finale pari a 1 μ M. Le soluzioni sono state incubate per 5 minuti a 95°C per permettere la formazione dell'RNA guida, composto da crRNA:tracrRNA. I complessi ottenuti sono stati quindi miscelati in Opti-MEM (Thermo Fisher #51985091), con l'HiFi nuclease Cas9 V3 (IDT #1081060) ed il Cas9 PLUSTUM Reagent (dal kit Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfection Reagent (Thermo Scientific #CMAX00008) ed incubati a temperatura ambiente per 5 minuti per permettere la formazione del complesso ribonucleoproteico (RNP). È stata in seguito incubata per 20 minuti a temperatura ambiente una soluzione contenente il complesso RNP ed il reagente di trasfezione dal kit Lipofectamine CRISPRMAX in terreno Opti-MEM. Allo scopo di eseguire una trasfezione inversa, ogni soluzione contenente un diverso crRNA è stata dispensata in un pozzetto di una 96 well insieme alla linea cellulare di interesse, ad una concentrazione di 40.000 cellule/pozzetto. Dopo la trasfezione, le piastre da 96 pozzetti sono state poste nell'incubatore umidificato a 37°C, 5% CO₂. Dopo 48 ore dalla trasfezione, è stato eseguito un passaggio 1:2 delle cellule, in modo da ottenere una replica della piastra e un pellet per l'estrazione del DNA per la *Fluorescent PCR* (F-PCR). Verificata l'avvenuta trasfezione, è stata effettuata la selezione clonale per identificare i cloni cellulari con mutazioni frameshift di *GLRX2*. Cresciuti i cloni, è stato effettuato anche in questo caso un passaggio 1:2 per ottenere una replica della piastra per estrarre il DNA e verificare la presenza del taglio mediante F-PCR. Sono quindi stati costituiti dei pool cellulari *GLRX2* KO e WT, a partire da 3 cloni KO e 4 cloni WT per le TPC1 e 3 cloni KO e 5 cloni WT per le HCT116. L'espressione della proteina è stata valutata mediante

Western blot come descritto nel paragrafo dedicato. Sono stati effettuati controlli periodici sui pool mediante Fluorescent-PCR e Western blot per verificare che la composizione del pool fosse sempre omogenea nel tempo.

Fluorescent-PCR (F-PCR)

Il DNA è stato estratto dalle cellule trasfettate e successivamente dai singoli cloni utilizzando 8µl di Lysis Solution (Sigma-Aldrich # L3289) e 80µl di Neutralization buffer (Sigma-Aldrich #N9784) per campione. L'efficienza di trasfezione e taglio è stata valutata nei campioni estratti allestendo una F-PCR con i primer GLRX2-ex4 (fw*5'-AGCCCAGAATCATGAGAGACC, rev. 5'-TCTAGGCTCTGGGTGATCTA) e la Taq Polimerasi KAPA2G (Kapa Biosystems #KK5601) impostando una temperatura di annealing a 62°C; il DNA delle linee parentali è stato usato come controllo per stabilire la grandezza del picco WT. Al termine della reazione i campioni sono stati preparati per la lettura al sequenziatore ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems): per ogni campione sono stati aliquotati 2µl di una diluizione 1:50 del prodotto di F-PCR, 7,8µl di formammide e 0,2µl di LIZ dye size-standard (Thermo Fisher #4322682). Le grandezze dei picchi sono state analizzate con il software Peak Scanner (Thermo-Fisher).

SDS-PAGE e Western blot

I lisati totali impiegati per il western blot contro gli enzimi antiossidanti sono stati ottenuti da cellule in coltura (300000/well TPC1 e 700000/well HCT116 *ex vivo* seminate in 6-well), solubilizzate risospendendo il pellet in buffer RIPA buffer [TrisHCl pH7.4 (50mM), NaCl (150mM), SDS (1%), Triton (1%), EDTA pH7.6 (1mM)] supplementato con inibitore di proteasi (Roche #11873580001). I campioni hanno subito due cicli di congelamento/scongelamento per favorire la rottura delle membrane cellulari ed in seguito sono stati centrifugati per 15min a 13000rpm a 4°C, conservando il surnatante e quantificandolo con metodo Lowry (Biorad #5000116). Per l'analisi dell'andamento della glutationilazione in seguito a stress le cellule sono state trattate con H₂O₂ (1mM TPC1 e 12mM HCT116) per i tempi indicati e successivamente raccolte con lo scraper in Lysis buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100, pH 7,7, 50 mM NEM, 10mM Hepes pH 7,6); sono state quindi pellettate per 10min a 13000rpm a 4°C ed è stato conservato il surnatante,

successivamente quantificato con BCA assay (Thermofisher #23225) secondo le istruzioni del fornitore. Con i campioni ottenuti è stato quindi effettuato un SDS-PAGE e alla fine della corsa i campioni sono stati trasferiti su una membrana di nitrocellulosa del sistema Turbo-pack (Biorad #1704159SP5). Le membrane sono state bloccate in blocking latte 5% in TBS-Tween per 1 ora t.a. e incubate con gli anticorpi primari con le seguenti diluizioni/tempi: anti-PRDX3 (Merck, #AV52341) 1:2000 1h t.a., anti-CAT (Merck, #C0979-2ML) 1:4000 2h t.a., anti-GSH (Merck #MAB5310) 1:1000 over night a 4°C, anti-ACTB (Merck #128K4805) 1:1000 1h t.a. e anti-VINC (Cell signaling #E1E9V) 1:10000 over night a 4°C. Successivamente, sono state incubate per 30 min a t.a. con gli anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch Laboratories #111035144 e #111035146) diluiti 1:10000 in TBS-Tween. Per lo sviluppo della membrana è stato utilizzato il Clarity Western ECL (Biorad #1705061) e lo strumento ChemiDoc XRS+ (Biorad).

Protein simple technology – Simple Western System WES™

Per verificare la mancata espressione proteica di GLRX2 nei modelli KO è stato periodicamente effettuato un western blot nello strumento WES (Bio-technie), che permette di ridurre notevolmente i tempi sperimentali ed ha una sensibilità di rilevazione superiore al western blot classico, particolarmente utile nel caso di anticorpi che restituiscono un segnale debole e richiederebbero tempi di esposizione al transilluminatore troppo lunghi, come l'anticorpo anti-GLRX2 (Merck, #HPA023087). I lisati totali cellulari sono stati estratti in RIPA buffer e quantificati come precedentemente descritto. Tutti i campioni sono stati denaturati in presenza di una Master Mix fluorescente fornita dal kit per 5 minuti a 95°C. I campioni sono stati preparati secondo le indicazioni del kit (Bio-technie, #SM-W004) impiegando 4ug di proteina per ogni campione, ad una concentrazione finale di 0,5ug/uL e caricati utilizzando la cartridge del modulo di separazione da 12-230 kDa fornita dal kit. La miscela di anticorpi primari anti-GLRX2 (Merck, #HPA023087) e anti-ACTB (Merck #128K4805) è stata preparata diluendo gli anticorpi 1:250 e 1:1000 rispettivamente, con la soluzione diluente in dotazione. Gli anticorpi secondari sono stati preparati in un'unica miscela contenente sia l'anticorpo anti-mouse che anti-rabbit utilizzando la stessa soluzione diluente utilizzata per la diluizione dell'anticorpo primario. Infine, per la rilevazione delle proteine di interesse sono stati impiegati il luminolo/perossido e la streptavidina HRP in dotazione nel kit di rilevazione (Bio-technie, #DM-001). La cartridge è stata quindi caricata nello strumento WES™ che permette di

automatizzare interamente tutti i passaggi del western blot effettuando la corsa elettroforetica e la rilevazione su capillare nell'arco di 3h. I risultati possono essere visualizzati come picchi di segnale o come bande del western blot classico; per la visualizzazione e l'elaborazione dei dati è stato impiegato il software Compass per SW v4.0.0.

Analisi di proliferazione e di riparazione della ferita con sistema di *live cell imaging*

Saggio di proliferazione cellulare

Lo strumento Incucyte® Live-Cell Analysis Systems è posizionato all'interno di un incubatore, in modo da garantire il mantenimento delle condizioni di coltura standard (37°C e 5% di CO₂) durante le analisi di imaging operate da un sistema di obiettivi, posti al di sotto dei supporti per le piastre di coltura. Il sistema ottico completamente automatizzato include diversi obiettivi con diversi ingrandimenti ed autofocus. Lo strumento è collegato ad un software attraverso il quale è possibile impostare le condizioni sperimentali, la visualizzazione delle immagini e l'analisi dei dati. Per i saggi di proliferazione, le cellule tumorali sono state seminate in una piastra 96-well, alla concentrazione di 2500cellule/pozzetto per le HCT116 e 1500cellule/pozzetto per le TPC1. La proliferazione è stata monitorata per 96h e come impostazioni di acquisizione è stato scelto un obiettivo 10X a contrasto di fase impostando 4 campi per pozzetto con acquisizioni ogni 2 ore. Per ottenere i dati relativi alla confluenza, il software applica una maschera di confluenza che viene adattata dall'operatore in base alla morfologia della linea cellulare che sta analizzando. I dati di confluenza per ogni tempo e per ogni linea sono stati normalizzati sul rispettivo T0. Per gli esperimenti di *rescue*, le cellule sono state seminate in 96well ad una concentrazione di 20000cellule/pozzetto (HCT116) e 30000cellule/pozzetto (TPC1) e, dopo trattamenti con H₂O₂ per 30min, è stato effettuato un cambio terreno; le piastre sono state inserite nello strumento e sono state monitorate ogni 2h per le successive 24h con le stesse impostazioni dell'analisi di proliferazione, al fine di valutare se vi fosse o meno il rescue del fenotipo da stress.

Scratch-wound assay

Per lo scratch-wound assay le cellule sono state seminate alla concentrazione di 60000 cellule/pozzetto per le HCT116 WT e KO e 50000 cellule/pozzetto per le TPC1 WT e KO in una 96well ImageLock (Sartorius, #4379) per avere il giorno seguente un monostrato confluento. La ferita è stata realizzata con il wound-maker (Sartorius, #4563), uno strumento che permette di creare delle ferite della stessa ampiezza nel monostrato di cellule in ogni

pozzetto. In seguito a due lavaggi in terreno vuoto per rimuovere le cellule staccatesi che interferirebbero con l'acquisizione delle immagini, le cellule adese sono state incubate con i rispettivi terreni con 1% FBS e inserendo la piastra nello strumento Incucyte® Live-Cell Analysis Systems. Impostazioni di acquisizione: obiettivo 10X a contrasto di fase con modalità di scansione Wide Mode, acquisizioni ogni ora per 24h. Per l'analisi il software applica una maschera che riesce a riconoscere l'ampiezza iniziale della ferita e a monitorare la confluenza cellulare all'interno di essa nel tempo, esprimendola come percentuale.

Saggio di formazione delle colonie

Le linee HCT116 *GLRX2* WT e KO sono state seminate in piastre 6-well alla concentrazione di 500 cellule/well, le linee TPC1 invece 250 cellule/well, Le piastre seminate sono state riposte in incubatore per circa dieci giorni, al fine di permettere la formazione delle colonie. Queste sono state quindi fissate al fondo della well con TCA al 10% per 1h a 4°C, dopodichè sono stati effettuati 5 lavaggi in acqua distillata. Una volta asciutti, i pozzetti delle piastre sono stati colorati con sulforodamina B (SRB) per 30min al buio per permettere una visualizzazione più chiara delle colonie. In seguito ad ulteriori lavaggi in acido acetico all'1% e all'asciugatura, le piastre sono state fotografate con lo strumento ChemiDoc XRS+ (Biorad). La conta delle colonie è stata effettuata con il software ImageJ.

Misurazione GSH/GSSG

Per la misurazione del contenuto intracellulare di GSH e GSSG sono state preparate due soluzioni, una di GSH e una di GSSG 10mg/ml in acido Mercaptopropionico (MPA) al 6%. Partendo da queste due soluzioni sono state create due curve di calibrazione da tre punti, con le seguenti concentrazioni: GSSG 2ug/ml – 1ug/ml – 0,5ug/ml; GSH 4ug/ml – 2ug/ml – 1ug/ml. Le cellule TPC1 WT e KO sono state seminate alla concentrazione di 4×10^6 in 2 dish da 100mm per linea; il giorno seguente sono state staccate e contate. Circa $8-10 \times 10^6$ di cellule per ogni piastra sono state risospese in 1ml di PBS mettendo da parte 100ul per la quantificazione proteica. Le proteine sono state quindi nuovamente centrifugate a 13000rpm per 2min a 4°C ed il pellet è stato risospeso in 900uL di MPA 6%. Dopo 5min sono state nuovamente centrifugate alla 13000rpm per 5min ed è stato prelevato il surnatante dividendolo in triplicati tecnici da 200uL per la misurazione del GSSG e 500uL per la misurazione del GSH. Per la misurazione

del GSSG ad ogni campione sono stati aggiunti in sequenza 12uL di trietilamina (TEA) e 8ul di 2-vinilpiridina (2-VP), agitando (con l'uso di un vortex) dopo ogni passaggio e lasciando successivamente i campioni a t.a. per 1h. Nei campioni per la misurazione del GSH sono stati aggiunti 950ul di MPA 6% per diluire di 20 volte il GSH presente nel campione prima della misurazione. Per la reazione è stato preparato un buffer di lettura con KH_2PO_4 (KPi) 0,1M, EDTA 5mM (pH 7,4), 0,5mM DTNB e 0,4mM NADPH. Parallelamente l'enzima glutatione reduttasi (GR) (Merck, #G3664-2,5KU) è stato diluito 1:5 nel buffer KPi+EDTA. In una piastra da 24-well sono stati aliquotati 860uL di buffer di reazione per pozzetto insieme a 100ul di ciascun campione; sono stati quindi aliquotati 40ul di GR diluita e la piastra è stata inserita nel lettore di piastre Victor2 (Perkin-Elmer) misurando l'assorbanza a 405nm a 37°C. I dati di assorbanza sono stati normalizzati per il bianco e sulla concentrazione proteica dei 100ul precedentemente tenuti da parte, misurata con metodo Bradford.

Crescita degli xenograft e microscopia elettronica.

I modelli murini impiegati in questo studio sono topi nudi privi di timo, non in grado di produrre cellule T e, pertanto, immunodeficienti (CD-1® Nude Mouse Crl:CD1-Foxn1n). Gli animali esclusivamente di sesso femminile sono stati acquistati dai laboratori Charles River e mantenuti secondo le linee guida e le normative istituzionali; la sperimentazione è stata eseguita secondo il protocollo approvato dal Comitato etico con codice 437/2018-PR. A 5- 6 settimane è stato effettuato un inoculo sottocute delle cellule HCT116 e TPC1 WT e KO, risospese in un volume totale di 100µl in PBS e matrigel con fattori di crescita (Corning #354234); il numero di cellule e il fianco di inoculo sono variabili a seconda dell'esperimento. Per il primo esperimento pilota sono stati impiegati 12 topi per il modello di tiroide e 12 per quello di colon ed in entrambi i casi sono stati effettuati degli inoculi bilaterali (uno per fianco): per ogni modello sono stati inoculati equamente sia i singoli cloni WT e KO, sia i pool WT e KO alla concentrazione di 1×10^6 cellule/inoculo. Nel corso del secondo esperimento pilota sono stati inoculati solo i pool WT e KO di entrambi i modelli cellulari ottenuti dall'unione dei singoli cloni in coltura: sono stati impiegati 12 topi (3 topi per ognuno dei quattro gruppi sperimentali); per ogni animale sono state inoculate $2,5 \times 10^6$ cellule sul fianco sinistro e 5×10^6 cellule sul fianco destro. Nel terzo ed ultimo esperimento sono stati impiegati 12 topi inoculando esclusivamente le HCT116 WT e KO ($2,5 \times 10^6$ cellule) distribuendo equamente i gruppi sperimentali. La dimensione degli xenograft è stata valutata con un calibro due volte a settimana e calcolata con la formula

volume=(larghezza x altezza x lunghezza)/2. I topi sono stati scarificati consecutivamente, quando ogni xenograft ha raggiunto un volume corrispondente al 10% del peso corporeo dell'animale oppure al termine stabilito per la sperimentazione. Laddove reso possibile dalle dimensioni, ogni xenograft è stato diviso in quattro parti per le successive analisi: una destinata al congelamento snap-frozen in azoto per estrazione di DNA/RNA e proteine, una fissata in formalina e poi processata secondo protocolli standard per l'inclusione in paraffina, una parte impiegata per ottenere delle colture *ex vivo* ed infine una piccola parte è stata fissata in glutaraldeide 2,5% per le successive analisi al TEM. I campioni sono stati preparati per la microscopia elettronica seguendo un protocollo precedentemente descritto⁶⁰ in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale (DIMES) dell'Università di Bologna.

MtDNA next generation sequencing (NGS)

Per ogni campione sono state allestite 2 long-PCR con le seguenti coppie di primer MTL1 (Fw: 5'-AAAGCACATACCAAGGCCAC- 3' e Rev: 5'-GGTTCTGTGGGCAAATTTAAAG- 3') e MTL2 (FW: 5'-TGAGGCCAAATATCATTCTGAG- 3' E Rev: 5'-AATGTTGAGCCGTAGATGCC- 3'). Queste due coppie di primer sono state selezionate specificamente per amplificare l'intero genoma mitocondriale in due frammenti parzialmente sovrapposti. Per la reazione di amplificazione è stata usata la polimerasi primeSTAR Max (Takara, #R045B) una polimerasi ad alta fedeltà e con una maggiore efficienza di estensione. I prodotti di PCR purificati sono stati quindi uniti facendo una mix in base all'intensità della banda di PCR visualizzata su gel di agarosio. In seguito, i campioni sono stati quantificati al Qubit e diluiti 0,8ng/ul. Per l'allestimento delle librerie per l'NGS è stato usato il kit *Illumina MiSeq Nextera* seguendo il protocollo del fornitore per gli step di frammentazione del DNA, aggiunta dei tag, amplificazione e *cleanup* delle librerie. Infine, le librerie sono state unite in ugual volume in un'unica eppendorf e sequenziate con il sistema Illumina MiSeqTM. La pipeline MToolBox è stata utilizzata per estrapolare ed annotare le varianti alleliche di ciascun campione presente nel seguente studio⁶¹. Tale pipeline si basa sui seguenti step: filtraggio dei NumtS, processamento post-mapping, assemblaggio del genoma, predizione aplogruppo e annotazioni delle varianti. I fasta file di ogni campione sono stati caricati sull'applicativo MToolBox al fine di estrapolare le varianti mitocondriali. Il processo di estrapolazione delle varianti, si basa sul confronto della sequenza in esame con tre sequenze di riferimento comunemente utilizzate:

rCRS, RSRS e MHCS. In particolare, quest'ultima deriva da 32 allineamenti multipli di sequenze mitocondriali di 14.144 pazienti sani disponibili su HmtDB appartenenti a 32 macro-aplogruppi. Nel multi-allineamento, per ogni specifico macro-aplogruppo, è stato effettuato un'analisi della composizione nucleotidica mediante SiteVar algorithm¹⁵³ al fine di determinare l'allele che con maggiore frequenza è presente in una specifica posizione. Il processo di estrapolazione realizzato con MToolBox prevede per ogni variante la frequenza allelica di un sito specifico stimata sulla base dei multi-allineamenti di genomi di pazienti sani riportati in HmtDB

Arricchimento delle proteine glutationilate ed analisi di proteomica

Le linee TPC1 *GLRX2* WT e KO sono state seminate alla concentrazione di 8×10^6 cellule in dish da 150mm, laddove specificato nel testo le linee TPC1 sono state trattate con $100 \mu\text{M}$ di H_2O_2 per 30 min. Il protocollo per l'arricchimento delle proteine glutationilate è stato adattato a partire dall'articolo pubblicato da Dian Su et al.⁶². Per ottenere i lisati totali, le cellule sono state raccolte con lo scraper in Lysis buffer in un volume di $400 \mu\text{l}$ /campione (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100, pH 7,7, 50 mM NEM, 10mM Hepes pH 7,6). Per ottenere le frazioni cellulari arricchite di mitocondri invece, le cellule sono state raccolte in PBS, pellettate e risospese in buffer isosmotico (220mM mannitolo, 70mM saccarosio, 1mM EGTA, 1mM MgCl_2). Sono state quindi omogenizzate in ghiaccio impiegando un omogenizzatore di tipo Potter-Elvehjem (Mortaio in vetro borosilicato, pestello in PTFE con asta in acciaio inox) e sottoposte ad una prima centrifugazione a 2000rpm per 10min a 4°C per rimuovere i nuclei e le membrane ed una seconda centrifugazione del surnatante effettuata a 13000rpm per 20min a 4°C al fine di pellettare i mitocondri crudi. In seguito, le proteine totali e mitocondriali sono state quantificate con il BCA Assay (Thermofisher #23225). È stato quindi preso 1mg di proteine/campione, diluito in Alkylation buffer (250 mM HEPES pH 7,7, 20 mM NEM, 2% SDS, 1 mM NaASC, $1 \mu\text{M}$ CuCl) per mascherare i tioli proteici liberi. La reazione di alchilazione è stata condotta in termomixer a 55°C con 850 rpm di shaking per 30 min, al buio. I campioni alchilati sono stati trasferiti in colonne con filtro Amicon Ultra 3K per il cambio di buffer: sono stati effettuati lavaggi a t.a. da 20min a 14000g, 3 volte con 500uL di Urea 6M e 2 volte con 500uL H_2O , seguiti dall'eluizione capovolgendo la colonnina in una eppendorf pulita e centrifugando per 15min a 1000g. Secondo il protocollo, circa $500 \mu\text{g}$ dei campioni alchilati sono stati diluiti in 25mM HEPES (pH 7,7) alla concentrazione finale di

1µg/µL È stata quindi condotta una reazione di riduzione al fine di ridurre il legame tra il GSH e le proteine impiegando i seguenti reagenti: enzima ricombinante GRX (IMCO, #GRX-04), aggiunto alla concentrazione di 2,5 µg/ml, 1mM GSH (Merck, #G4251), 1mM NADPH (Merck, #N5130) e 4 U/ml di GR (Merck, #G3664-2,5KU). I campioni sono stati incubati a 37°C per 10 min e trasferiti nuovamente in filtri Amicon Ultra 3K per ripetere il cambio di buffer effettuato post-alchilazione. In seguito alla riduzione selettiva, circa 350µg di proteine glutationilate sono stati diluiti con HEPES 25mM e caricati su colonne Mini-Spin precedentemente preparate utilizzando 35 mg di resina tiopropil sefarosio 6B (Ge Healthcare #17-0420-01): in questo modo, i gruppi tiolici delle proteine precedentemente glutationilati ed ormai liberi in seguito alla riduzione sono stati catturati per affinità dalla resina. Per permettere il legame, i campioni sono stati incubati in un termomixer a temperatura ambiente, con shaking a 850 rpm per 2 ore. Le proteine non legate in modo specifico sono state rimosse lavando la resina cinque volte con ciascuna delle seguenti soluzioni: urea 6M, NaCl 2M, acetonitrile 80%+ acido formico 0,1% e 25mM HEPES a pH 7,7. La digestione delle proteine su resina è stata eseguita a 37° C, 850 rpm o.n. risospendendo la resina in 120µL di Digestion Buffer (25 mM HEPES pH 7,7, 0,1% SDS, 4µg di tripsina e 1mM CaCl₂) per 16h. I peptidi sono stati quindi eluiti risospendendo la resina con 100ul di ditiotreitolo 20mM (DTT) e bicarbonato di ammonio 25mM con 3 successive incubazioni da 30min a t.a. in termomixer a 850rpm, e centrifugando brevemente a 1500g per raccogliere l'eluato (step ripetuto 3 volte). L'analisi proteomica è stata condotta presso l'istituto Max Planck di Genetica Molecolare di Berlino con una metodica quantitativa label-free utilizzando lo spettrometro Q Exactive HF (Thermo Scientific) accoppiato ad un sistema nanoLC. Per l'analisi dei dati e la statistica (two sample t-test, impiegando la correzione Benjamini-Hochberg per ridurre il *false discovery rate*) è stata usata la piattaforma Perseus (<https://maxquant.net/perseus/>).

Blue Native Page (BN-Page)

L'esperimento è stato condotto al fine di analizzare i complessi della catena respiratoria in forma isolata per valutarne lo stato di glutationilazione. Le cellule sono state seminate in dish da 100mm alla concentrazione di $4,2 \times 10^6$ /dish. Per ogni linea cellulare è stato previsto un campione non trattato, uno trattato con H₂O₂ per 5min ed uno trattato per 30min; le concentrazioni di H₂O₂ impiegate sono state 1mM per le TPC1 e 12mM per le HCT116 *ex vivo*. Le cellule sono state trattate per i tempi previsti e successivamente raccolte con lo scraper e

pellettate. Il pellet è stato risospeso in 800 μ L di PBS in modo tale da avere 6×10^6 di cellule/mL. Successivamente si è aggiunta la Digitonina (Calbiochem, #3000410) alla concentrazione finale di 60 μ g/ml ed incubato per circa 1-2 minuti a t.a. invertendo la eppendorf durante il tempo di incubazione. Il detergente lega il colesterolo permeabilizzando la membrana plasmatica e favorendo l'arricchimento dei mitocondri in seguito a centrifugazione per 10min a 130000rpm a 4°C. La frazione mitocondriale arricchita è stata quantificata con metodo Bradford e solubilizzata in DDM per 5min in ghiaccio (2.5 mg DDM/mg proteina totale) per isolare i complessi della catena. I campioni sono stati quindi centrifugati a 14000rpm per 30min a 4°C conservando il surnatante, nuovamente quantificato con metodo Bradford. Per separare i complessi in condizioni native in base alla loro dimensione, è stata eseguita l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (1D BN-PAGE). 50 μ g di proteine sono stati caricati su gel Bis-Tris Native 3-12% (Life Technologies) a 150 V e 4°C per 4 ore. Per la separazione, sono stati impiegati 3 buffer: Cathode buffer A (50mM Tricina, 0,02% Serva Blue-G250, 15mM Bis-Tris, pH 7), Cathode buffer B (tricina 50mM, 0,002% Serva Blue-G250, Bis-Tris 15mM, pH 7) e Anode buffer (50mM Bis-Tris, pH 7). Quando il fronte di corsa ha raggiunto circa la metà del gel, il buffer A è stato sostituito con il buffer B. Il gel è stato successivamente utilizzato in Western blotting. In seguito al trasferimento, la membrana è stata tagliata in modo da incubare sia l'anticorpo anti-GSH (Merck, #MAB5310) che gli anticorpi per il riconoscimento delle subunità dei complessi della catena respiratoria: anti-NDUFB6 (CI) - Abcam #ab110244; anti-UQCRC2 (CIII) - Abcam #ab14745, anti-MTCO2 (CIV) - #ab110258, anti-SDHA (CII) - Abcam #ab459200). La porzione di membrana in cui sono stati incubati questi ultimi anticorpi è servita per determinare quali complessi sono target di glutationilazione in seguito all'allineamento delle due membrane.

Misurazione del tasso di consumo dell'ossigeno (OCR) – Seahorse

La respirazione mitocondriale è stata misurata utilizzando il protocollo XFe Seahorse Mito Stress Test Kit (Agilent #103015-100) per colture cellulari, seguendo le istruzioni del produttore. Le cellule sono state seminate in piastre XFe96 alle concentrazioni di 10000/pozzetto per le HCT116 ex vivo e 16000/pozzetto per le TPC1, in 80 μ L di terreno ed incubate per 24 ore a 37°C e 5% di CO₂. Il terreno di crescita è stato sostituito con 180 μ L di Terreno XF (Agilent #103575-100) addizionato con glucosio 10mM, sodio piruvato 1mM e 2mM L-glutamina, a pH 7,4. Per equilibrare la temperatura ed il pH, le cellule sono state

incubate a 37°C per 1 ora senza il controllo della CO₂. Sono state effettuate tre misurazioni di riferimento del tasso di consumo di ossigeno (OCR) per ogni step: in ogni pozzetto sono stati aggiunti negli appositi slot della piastra 1µM di oligomicina, 0,75µM di carbonil cianuro-p-trifluorometossifenilidrazone (FCCP), 1µM di rotenone e 1µM di antimicina A, iniettati in sequenza dallo strumento all'inizio dei diversi step di misurazione. Alla fine del test, il terreno è stato rimosso ed è stato eseguito un saggio SRB per determinare il contenuto proteico per la normalizzazione. In breve, la piastra è stata incubata con acido tricloroacetico (TCA) al 10% per 1 ora a 4°C per fissare le proteine contenute nelle cellule sul fondo della piastra, successivamente lavata per 5 volte con acqua distillata. Una volta asciutta, le proteine sono state colorate mediante incubazione con 0,4% di SRB per 30 min a TA. SRB è stato solubilizzato con Tris 10mM ed è stata determinata l'assorbanza a 560 nm utilizzando un lettore di piastre Victor2 (Perkin-Elmer). I dati (pmol/min) sono stati normalizzati sull'assorbanza dell'SRB corretta per il bianco.

Dosaggio della sintesi dell'ATP

La velocità di sintesi di ATP mitocondriale è stata misurata utilizzando un test luciferina/luciferasi in cellule TPC1 e HCT116 *ex vivo* WT e KO non trattate ed in seguito a trattamento con H₂O₂ concentrata rispettivamente 1mM e 12mM per 5 e 30min. Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 2.5x10⁶/piastra in piastre da 100mm e 24h dopo raccolte con lo scraper, contate, e 6x10⁶ di cellule sono state prelevate e centrifugate a 1800rpm per 10min a t.a. Il pellet è stato quindi risospeso in 600 µL di tampone contenente 150mM KCl, 25mM Tris-HCl, 2mM EDTA, fosfato di potassio 10mM, MgCl₂ 0,1mM, pH 7,4 in modo da avere 6x10⁶ di cellule/mL e diviso in 3 eppendorf (sono stati prelevati anche 20µL circa di sospensione per la successiva quantificazione proteica per normalizzare). Successivamente, ogni sospensione cellulare è stata incubata per 1 min con 50µg/mL di digitonina agitando per inversione. Alla fine dell'incubazione circa il 90-100% delle cellule risultava positivo alla colorazione Trypan Blue. A questo punto le cellule permeabilizzate sono state trattate con H₂O₂ per i tempi e alle concentrazioni previste. Tutti i campioni sono stati quindi pellettati e risospesi in un tampone contenente 150mM KCl, 25mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0,1% di BSA, fosfato di potassio 10mM, MgCl₂ 0,1mM, pH 7,4 in 180µL di tampone e trasferiti in cuvetta per la misurazione al luminometro. La chemiluminescenza è stata determinata in funzione del tempo con il luminometro Sirius L Tube (Titertek-Berthold). In cuvetta sono stati aggiunti i seguenti

reagenti: l'inibitore dell'adenilato chinasi, il P1, P5-di(adenosina-5') pentaosfato (Sigma-Aldrich # A2754) ad una concentrazione finale 1,3mM, 0,9mM Piruvato (Sigma-Aldrich # P2256) (N.B: per il tasso di sintesi di ATP con il secondo metodo, il piruvato è stato sostituito con glutammato), 0,9mM Malato (Sigma-Aldrich # M1125), 32ul di campione e 10ul del kit luciferina/luciferasi (Sigma-Aldrich #FLAAM-5VL). Iniziata la misurazione, dopo circa 20sec è stato aggiunto ADP (Sigma-Aldrich # A2754) alla concentrazione finale di 0,09mM continuando a misurare; dopo altri 30sec è stato aggiunto il rotenone (cf 1µM) per fermare la reazione ed infine dopo altri 30sec è stato aggiunto ATP (cf 11µM) come standard interno per calibrare il segnale di luminescenza. La velocità di sintesi di ATP è stata normalizzata sul contenuto proteico calcolato con metodo Bradford.

Immunofluorescenza- Mitotracker

Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 1×10^5 cellule/piastra su vetrini coprioggetto (\varnothing 10 mm) e messe in incubatore per 24h con 2 mL di terreno di coltura. In seguito, le cellule sono state incubate per 10 minuti a 37 °C con 10nM MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, # M7512) per il reticolo mitocondriale e Hoechst 1µg/ml per i nuclei, diluiti in terreno di coltura standard. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate con PBS e il vetrino è stato posto in una griglia metallica specifica con 1mL di terreno di coltura senza rosso fenolo integrato con HEPES 25mM (Gibco #21063029) per stabilizzare il pH durante l'acquisizione. Il reticolo mitocondriale è stato visualizzato con un sistema di imaging digitale utilizzando un microscopio a epifluorescenza invertito con un obiettivo a olio con apertura numerica (NA) \times 63/1,4 (Nikon Eclipse Ti-U; Nikon). Le immagini sono state acquisite con un sistema di telecamere CCD Photometrics Cascade retroilluminato (Roper Scientific) ed elaborate con il software di acquisizione/analisi Metamorph (Universal Imaging Corp.). L'analisi dell'intensità della fluorescenza è stata eseguita utilizzando ImageJ. I dati sull'intensità della fluorescenza per ciascuna immagine sono stati normalizzati sul numero di nuclei.

Analisi statistica

Il software Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.) è stato utilizzato per l'analisi statistica e per creare i grafici. Salvo indicazioni specifiche nel testo, per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired t-test assumendo uguale varianza tra i valori medi dei gruppi. Un p-value $< 0,05$ è stato considerato significativo (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

Risultati e discussione

Il sequenziamento dell'esoma nei pazienti della famiglia HPT-JT non individua varianti associate al fenotipo oncocitario.

Lo sviluppo di tumori oncocitari in concomitanza con la sindrome dell'HPT-JT è un evento molto raro; ciò ha portato ad escludere un ruolo causativo delle mutazioni nel gene *CDC73* - già alla base dello sviluppo della sindrome - nella trasformazione oncocitaria. Il manifestarsi di questo peculiare fenotipo nei tumori della famiglia in esame potrebbe pertanto essere legato ad altre mutazioni o varianti a penetranza incompleta private della famiglia. Con il fine di individuare la causa genetica alla base della predisposizione alla trasformazione oncocitaria dei tumori dei pazienti HPT-JT, è stata condotta un'analisi dell'esoma (*whole exome sequencing* - WES) sul DNA da sangue dei soggetti I.2, II.4 e II.6 per individuare se nella linea germinale ci fossero varianti condivise tra i membri della famiglia. Il soggetto II.6 è stato incluso pur non presentando la delezione in *CDC73*, tenendo in considerazione che la manifestazione del fenotipo oncocitario possa non essere strettamente legata ad uno specifico oncogene o oncosoppressore, ma piuttosto ad un gene modificatore del fenotipo, e di conseguenza non è da escludere che il soggetto II.6 possa aver ereditato la/e variante/i. Le varianti sono state filtrate in modo tale da selezionare quelle condivise da entrambi i soggetti affetti dalla sindrome, mentre per il soggetto II.6 sono stati inclusi tutti i possibili genotipi (wt=0/0, het=0/1, hom=1/1). Dal filtraggio sono risultate 81 varianti rare e potenzialmente in grado di alterare le sequenze proteiche di 79 geni (Suppl.1). Per esaminare la possibile associazione delle varianti trovate con il fenotipo di interesse, è stata eseguita una ricerca con il software bioinformatico Phenolyzer⁶³ fornendo come input il termine "oncocytoma", da cui è emerso che nessuno dei 79 geni indagati presentava una stretta correlazione con il termine clinico usato per la ricerca. Come mostrato nel *barplot* in figura 9, infatti, lo *score* più alto corrisponde a 0,05 per il gene *KRT24*; dal momento che l'intervallo dei valori dello *score* è compreso tra 0 (non associato) e 1 (associato), tutti i geni individuati presentavano una scarsa associazione con il fenotipo indagato.

È stata quindi eseguita un'analisi mediante il software Cytoscape applicando il numero massimo di evidenze per il filtro "mitocondrio" al fine di individuare quali dei geni riscontrati potesse essere coinvolto a livello mitocondriale, essendo il fenotipo oncocitario strettamente associato a disfunzioni mitocondriali. Dall'analisi sono risultate due varianti, rispettivamente g.56598154G>A nel gene *SEPT4* e g.25597404G>A in *MRPL39*. La Septina 4 è una proteina

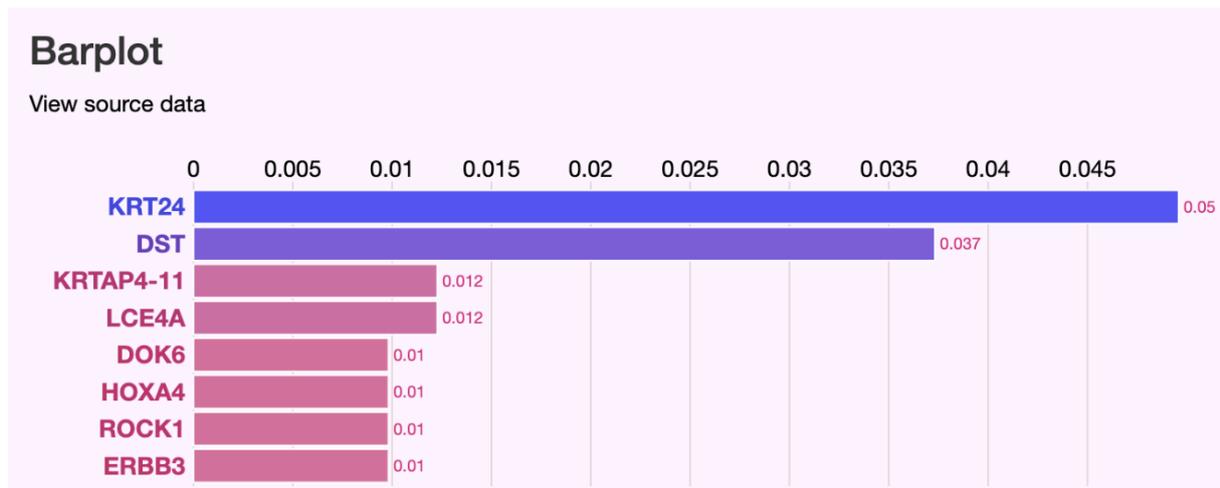


Figura 9. Barplot raffigurante i geni con lo score di associazione al termine “oncocytoma” più alto tra i 79 geni individuati dal WES, elencati in ordine decrescente. Fonte: Hui Yang, Peter N. Robinson, Kai Wang. *Phenolyzer: phenotype-based prioritization of candidate genes for human diseases. Nature Methods, 12:841-843 (2015).*

legante il GTP localizzata nel mitocondrio e coinvolta in diversi processi cellulari, tra cui la proliferazione e l’apoptosi⁶⁴. Quando l’espressione di *SEPT4* aumenta, agisce sulle caspasi 3 e 9 promuovendo l’apoptosi; al contrario, è stato osservato che la perdita - o l’inibizione - dell’espressione della Septina 4 favorisce la proliferazione cellulare ed ha una funzione pro-tumorigenica^{65,66}. MRPL39 è parte della famiglia di proteine mitocondriali ribosomiali ed è pertanto coinvolta primariamente nel processo di traduzione proteica, ma è stato anche osservato che la sua sovraespressione ha effetti inibitori sulla proliferazione cellulare nel cancro gastrico, inibendo inoltre l’invasività e la migrazione⁶⁷. La localizzazione mitocondriale di entrambe le proteine, la loro capacità di regolare meccanismi di proliferazione e morte cellulare ed in particolar modo il coinvolgimento di MRPL39 nei processi di traduzione del mtDNA, ha permesso di ipotizzare che le proteine individuate potessero essere funzionalmente coinvolte con la trasformazione oncocitaria. Per confermare le varianti individuate in WES, è stato quindi eseguito un sequenziamento Sanger a partire da DNA da sangue dei pazienti II.4 e II.3, in quanto in entrambi è stato riscontrato lo sviluppo di tumori paratiroidei oncocitari (Tab.4): entrambe le varianti sono risultate presenti in eterozigosi nel soggetto II.4, ma assenti nel soggetto II.3. Il coinvolgimento delle varianti individuate nello sviluppo di un fenotipo oncocitario è stato pertanto escluso, avendo anche il paziente II.3 sviluppato un tumore con questo fenotipo.

Il risultato ottenuto è indicativo della difficoltà di individuare fattori genetici comuni predisponenti alla trasformazione oncocitaria. Ad oggi, infatti, pur essendo state esaminate diverse famiglie con tumori oncocitari della tiroide ereditari, non è stato possibile individuare un comune denominatore genetico che potesse spiegare l’insorgenza di questo fenotipo. L’area

Gene	Chr.	Base change	AA change	Consequence	SIFT	PolyPhen	CADD	M-CAP	Inheritance			Sanger Validation	
									I.2	II.4	II.6	II.4	II.3
SEPT4	17	g.56598154G>A	P435S	Missense	tolerated	benign	22,2	tolerated	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
MRPL39	21	g.25597404G>A	R200H	Missense	tolerated	benign	18,16	tolerated	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0

Tabella 4. Il sequenziamento dell'esoma ha rivelato due varianti nei geni SEPT4 e MRPL39 presenti in tutti gli individui inclusi nell'analisi. La validazione mediante sequenziamento Sanger non ha confermato la mutazione nel sangue del soggetto II.3. Chr=chromosome; AA=amminoacido; SIFT=predittore di patogenicità in grado di predire se una sostituzione amminoacidica può essere tollerata o meno; PolyPhen prevede il possibile impatto di una sostituzione amminoacidica sulla struttura e la funzione di una proteina; CADD valuta la patogenicità di SNV così come di inserzioni e delezioni (range 1-99). M-CAP è in grado di classificare varianti missenso rare distinguendole tra tolerated e damaging.

genomica più frequentemente riportata in associazione allo sviluppo di tumori oncocitici familiari è il locus TCO descritto da Canzian e colleghi; all'interno di esso sono stati indagati diversi geni, la cui analisi funzionale tuttavia non ha rivelato una causalità tra le mutazioni riscontrate ed il fenotipo oncocitario. Questi rappresentavano inoltre dei casi privati del singolo individuo o della famiglia, non permettendo di generalizzare un loro possibile coinvolgimento con l'insorgenza del fenotipo. Un ri-sequenziamento del locus TCO alla ricerca di mutazioni anche in regioni non codificanti è stato proposto come possibile strategia di individuazione di nuove varianti⁶⁸. È opportuno, infatti, considerare che questi studi, parallelamente all'analisi dell'esoma condotta su questa famiglia, presentano il limite di tener conto solo delle regioni codificanti dei geni, non tenendo conto di mutazioni in regioni non codificanti quali introni, enhancer e silencer che potrebbero determinare ugualmente un forte impatto sull'espressione di un potenziale gene candidato.

Analisi in silico sulla delezione rivelano la perdita di un enhancer putativo del gene *GLRX2*

Esclusa la presenza di varianti comuni a livello germinale, la ricerca del determinante genetico del fenotipo oncocitario nei tumori della famiglia si è focalizzata sulla grande delezione ereditata dai soggetti in esame. I membri della famiglia oggetto di questo studio (fig.8 dell'intro) infatti presentano una grande delezione in eterozigosi comprendente i primi 10 esoni di *CDC73* (breakpoint centromerico 193,083,733–193,083,949 e telomerico 193,126,404–193,126,441 (GRCh37/hg19)) (fig.10).

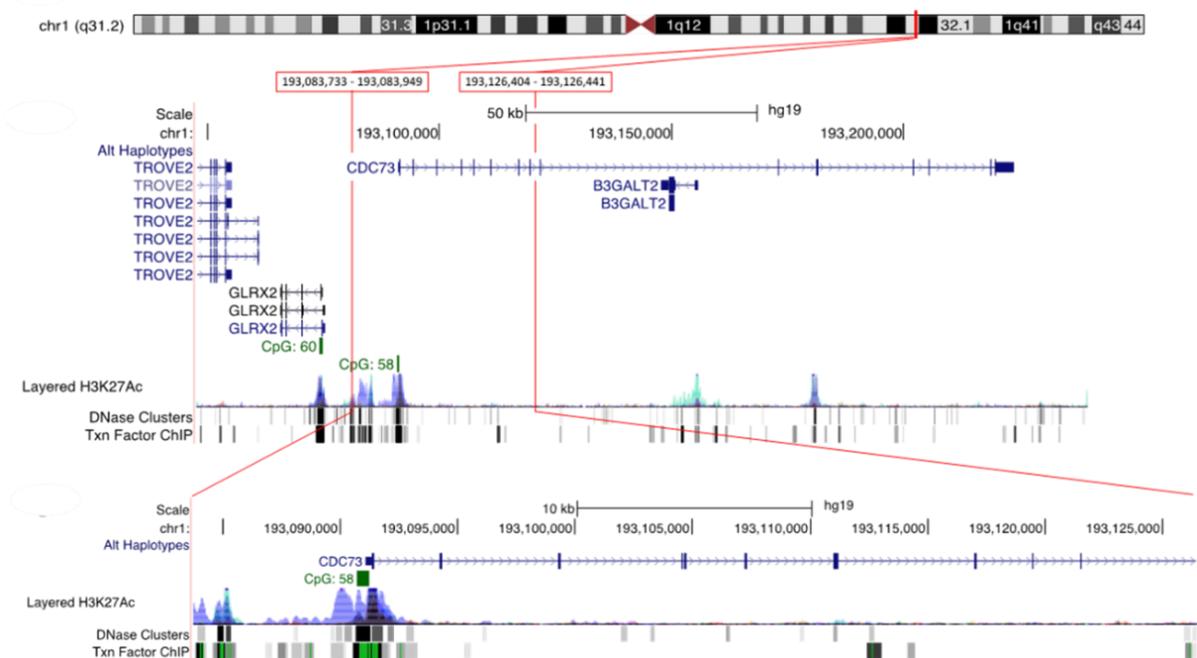


Figura 10. Mutazione in *CDC73* ereditata dai membri della famiglia. In alto il locus di *CDC73* sul cromosoma 1 e i breakpoints della mutazione. La porzione deleta (ingrandita in basso) comprende i primi 10 esoni di *CDC73* ed una porzione a monte del promotore; L'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (*H3K27Ac*) è marker di cromatina attivamente trascritta. Per la visualizzazione dei dati è stata impiegata la banca dati UCSC Genome Browser.

Si è ipotizzato infatti che la mutazione genetica predisponente la trasformazione oncocitaria potesse segregare con la delezione - dal momento che quest'ultima segrega con il fenotipo oncocitario - e che fosse probabilmente associata ad essa, sebbene non strettamente a mutazioni in *CDC73*. La delezione ereditata dai pazienti, infatti, oltre a comprendere i primi dieci esoni del gene *CDC73*, include anche una regione a monte del gene: l'analisi *in silico*, condotta sfruttando il tool bioinformatico UCSC ha rivelato due regioni dense di elementi regolatori all'interno della porzione deleta a monte di *CDC73*, evidenziate dall'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3, marker comunemente associato a regioni trascrizionalmente attive (fig.11A). Adiacente alla delezione vi è un gene codificante per la glutaredossina 2 (*GLRX2*), un importante enzima mitocondriale, presente in due isoforme – una a localizzazione nucleare ed

una mitocondriale - coinvolto nell'omeostasi redox⁶⁹ e trascritto in direzione opposta rispetto a *CDC73*. Si è ipotizzato dunque che l'assenza di queste regioni regolatorie potesse avere delle conseguenze sull'espressione di questo gene.

Per investigare se ci potesse essere un'interazione tra le regioni regolatorie delete e il promotore di *GLRX2* è stata condotta una *Virtual 4C-Seq* (*Circularized Chromosome Conformation Capture followed by deep Sequencing*) (fig. 11B), un'analisi *in silico* che permette di avere informazioni sull'organizzazione spaziale della cromatina nel nucleo e di evidenziare interazioni tra loci che linearmente sarebbero distanziati da molti nucleotidi ma che in una visione tridimensionale sono spazialmente vicini, come può essere effettivamente un'interazione enhancer-promotore.

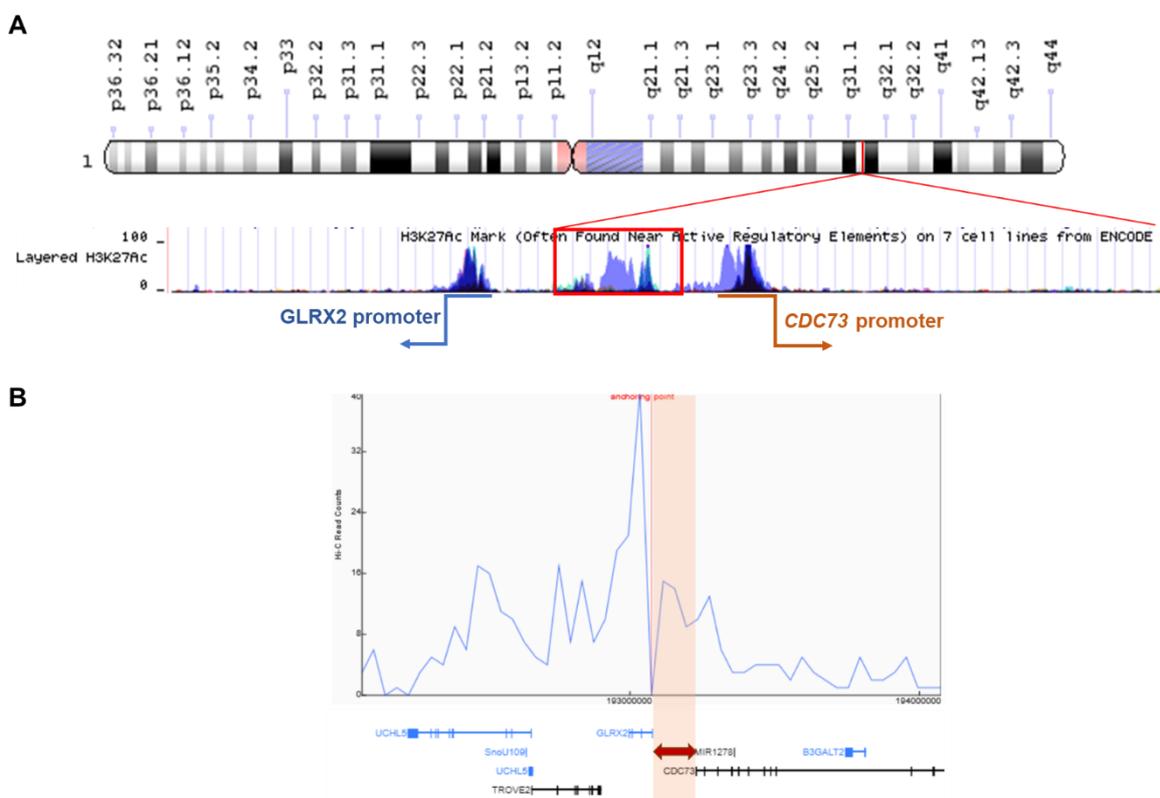


Figura 11. Predizione in silico di regioni regolatorie tra il promotore di *CDC73* e quello di *GLRX2*. A) Ingrandimento della porzione delete adiacente al promotore di *CDC73*, i dati sull'acetilazione dell'istone H3 di ENCODE indicano una regione attivamente trascritta tra i due promotori (UCSC database). B) Virtual 4C: l'anchoring point rappresenta il promotore di *GLRX2*, i picchi mostrano che vi è un'interazione tra gli elementi presenti nella porzione delete ed il promotore di *GLRX2* (The 3D Genome Browser)

Nel dettaglio, l'*anchoring point* rappresenta il promotore di *GLRX2* e i diversi picchi blu sono indice della frequenza con cui un determinato locus è stato visto interagire con il promotore di *GLRX2*: come si può apprezzare, la porzione delete include delle regioni che interagiscono fisicamente con il promotore, avvalorando l'ipotesi che possano essere elementi regolatori del gene.

Al fine di confermare la presenza di elementi regolatori di *GLRX2* all'interno della delezione ereditata dai pazienti HPT-JT, è stata condotta un'analisi di immunoprecipitazione della cromatina seguita da sequenziamento (ChIP-Seq). Dal momento che il fenotipo oncocitario è stato riscontrato solo in tessuti di origine epiteliale di ghiandole endocrine ed esocrine e che non esistono linee di tumore paratiroideo disponibili in commercio, l'analisi è stata condotta su una linea stabile di carcinoma papillare della tiroide, TPC1, organo nel quale la trasformazione oncocitaria è stata frequentemente osservata. Nella regione compresa tra il promotore di *CDC73* e quello di *GLRX2* sono state individuate due zone arricchite per H3K27ac, H3K4me1, H2k4me3 e Pol II - marker comunemente associati alla cromatina trascrizionalmente attiva - chiamate rispettivamente Reg1 e Reg2 (fig.12A). La presenza di queste regioni è stata quindi confermata ripetendo la ChIP contro l'H3K27Ac sia su una coltura primaria di fibroblasti della pelle derivata da un membro sano della famiglia con genotipo *CDC73+/+*, che su una ulteriore linea di tumore epiteliale, la linea coloretale HCT116 (fig. 12B): diverse coppie di primer disegnate per amplificare porzioni della Reg1 e Reg2 hanno permesso di verificare che entrambe le regioni fossero associate a cromatina trascrizionalmente attiva in quanto immunoprecipitate con l'anticorpo.

Con l'obiettivo di verificare il coinvolgimento delle due regioni individuate nel regolare l'espressione di *GLRX2*, Reg1 e Reg2 sono state inibite a livello trascrizionale mediante *CRISPR interference* (CRISPRi): la tecnica consiste nell'utilizzo di una Cas9 priva di attività endonucleasica fusa ad un repressore trascrizionale come KRAB che, mediante un *single guide RNA* (sgRNA) appositamente disegnato per essere complementare alla regione di interesse, interferisce con l'espressione genica reprimendo l'inizio o l'allungamento della trascrizione. Nel disegnare le diverse guide sono state prese in considerazione tre regioni *target*: il promotore di *GLRX2* e le due regioni putative enhancer individuate; a queste è stata aggiunta una quarta guida di controllo che non ha come bersaglio geni umani (NT=*not targeting*). La proteina di fusione Cas9-KRAB e le guide sono state successivamente clonate in un vettore lentivirale con il quale sono state infettate sia le TPC1 che le HCT116.

Terminata la selezione delle cellule infettate con le tre diverse guide, l'espressione di *GLRX2* è stata valutata a livello trascrizionale mediante qPCR, verificando parallelamente che il silenziamento dato dalle guide non coinvolgesse la trascrizione di *CDC73*, al fine di escludere che le regioni in esame regolino questo gene piuttosto che *GLRX2*.

Nelle cellule della linea HCT116 infettate con le guide dirette contro la Reg1 è stata osservata una riduzione del trascritto di *GLRX2* pari al 20% rispetto al controllo NT (fig. 12C), non riscontrata nella linea tiroidea. La differenza di efficacia dell'inibizione dell'espressione di *GLRX2* osservata potrebbe essere imputabile alla diversa efficienza del sistema di repressione nei due diversi modelli, dal momento che anche utilizzando la guida diretta contro il promotore di *GLRX2* nella linea TPC1 non si osserva la stessa riduzione dell'espressione della proteina riscontrata nella linea HCT116.

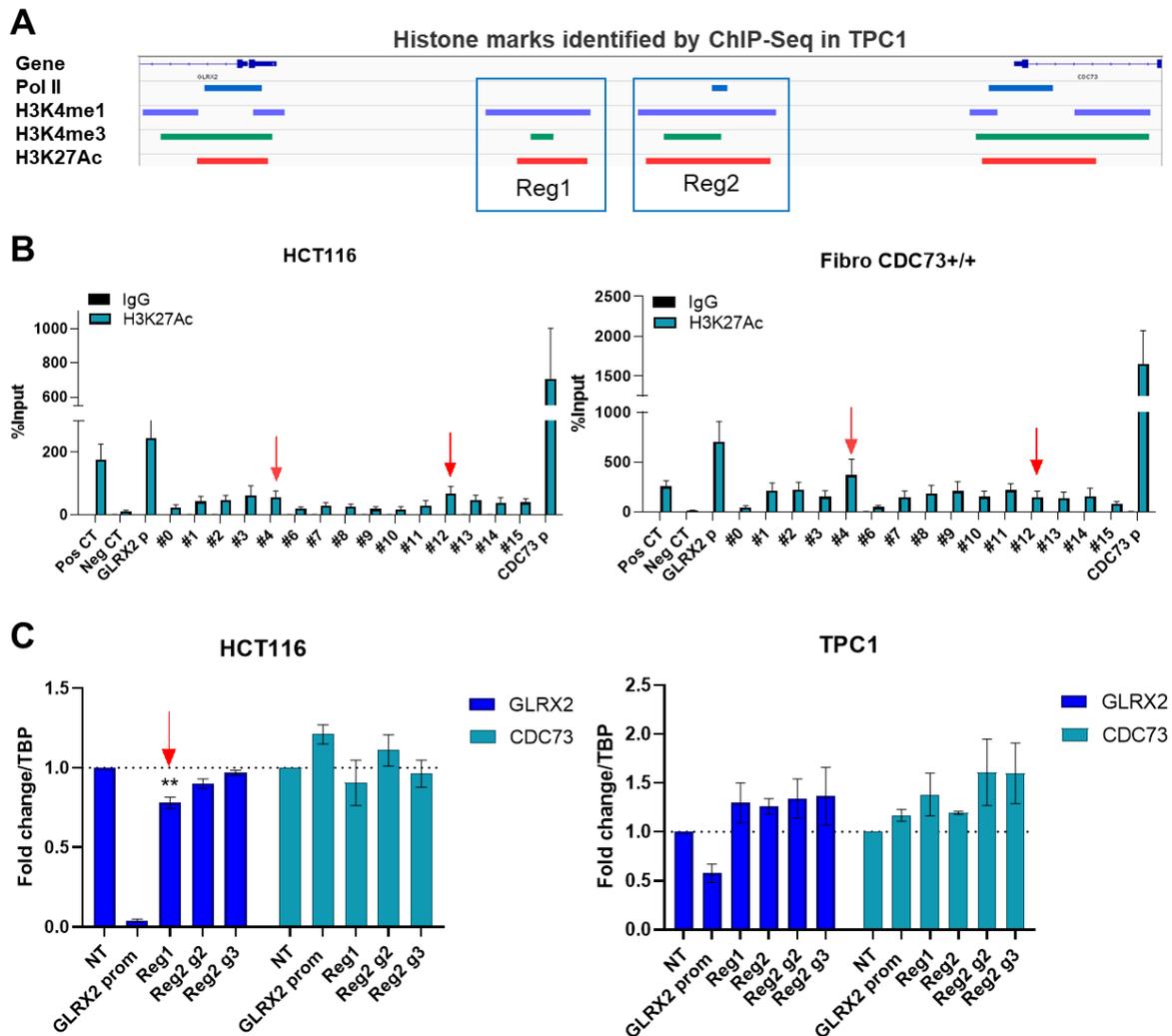


Figura 12. Verifica della presenza di due regioni regolatorie di *GLRX2* nella porzione deleta. A) Summary della ChIP-Seq condotta sulla linea TPC1: marker istonici associati a cromatina trascrizionalmente attiva individuano due regioni, Reg1 e Reg2, tra i promotori di *GLRX2* e *CDC73*. B) ChIP contro H3K27Ac sulla linea HCT116 e su fibroblasti CDC73+/+: tutte le coppie di primer sono state disegnate per amplificare diverse porzioni della Reg1 e Reg2, che dall'analisi risultano dunque attivamente trascritte in quanto immunoprecipitate con H3K27Ac (Pos CT= controllo positivo, coppia di primer disegnata per amplificare GAPDH, gene attivamente trascritto; Neg CT= controllo negativo, coppia di primer che amplifica una sequenza di DNA nota non trascritta); le sequenze amplificate dai primer #4 e #12 sono state scelte per disegnare i gRNA per la CRISPRi in quanto più rappresentate. C) qRT-PCR per *GLRX2* e *CDC73* su cDNA da cellule su cui è stata condotta la CRISPRi con i sgRNA contro il promotore di *GLRX2*, Reg1 e Reg2: nelle HCT116 in cellule infettate con la guida diretta contro la Reg1 si osserva una riduzione di circa il 20% dell'espressione di *GLRX2* rispetto al campione infettato con la guida di controllo (NT1); nella linea TPC1 non si osserva una riduzione del trascritto di *GLRX2* con nessun sgRNA. (n=4).

Nel complesso, i risultati ottenuti relativi all'espressione di *GLRX2* hanno permesso di verificare un'effettiva relazione tra una delle regioni regolatorie delete e l'espressione di *GLRX2*, dimostrando che la delezione ereditata dai pazienti possa aver effettivamente, determinato un'alterazione della sua espressione. *GLRX2* riveste un ruolo fondamentale nella regolazione redox mitocondriale, mediando attraverso reazioni di deglutinationilazione l'*interplay* tra il pool di GSH e le proteine mitocondriali, influenzandone la funzionalità stessa⁷⁰. Sebbene non ci siano numerose evidenze sul ruolo di *GLRX2* nel cancro, vi è un gran numero di target dipendenti dalla sua corretta attività, tra cui diverse proteine legate al metabolismo mitocondriale^{71,72}. Ciò l'ha resa un interessante elemento di studio nell'approfondire un suo potenziale coinvolgimento con lo sviluppo dei tumori oncocitari nei pazienti.

L'espressione di *GLRX2* è dimezzata nei tessuti normali dei pazienti HPT-JT e assente nei tumori.

Per verificare i dati ottenuti sui modelli cellulari tumorali e valutare gli effetti della delezione sull'espressione di *GLRX2* nei campioni provenienti dai pazienti HPT-JT, è stata effettuata una qPCR partendo da mRNA estratto da linfociti del sangue periferico dei pazienti I.2, II.3, II.4 e II.5 (*CDC73*^{-/+}) e da due membri della famiglia che non hanno ereditato la mutazione in *CDC73*, i soggetti II.1 e II.6, usati come controlli (fig. 13A). Dal momento che non era noto l'impatto che la delezione potesse avere sull'espressione delle due isoforme della proteina, è stata valutata separatamente l'espressione della sola isoforma mitocondriale (*GLRX2*_{mt}) – di principale interesse vista la sua peculiare localizzazione ed il coinvolgimento nella funzionalità mitocondriale – e quella globale di entrambe le isoforme (*GLRX2*); dall'analisi è stato riscontrato che l'espressione di *GLRX2* risulta dimezzata nei pazienti portatori della delezione rispetto ai controlli, ed è stato confermato che in tale riduzione d'espressione è inclusa l'isoforma mitocondriale.

In seguito all'ottenimento di linee linfoblastoidi e fibroblasti dai membri della famiglia HPT-JT, è stata nuovamente confermata con entrambi i modelli una riduzione dell'espressione globale di *GLRX2* nei pazienti portatori della delezione, ed ancora una volta è stata osservata una sensibile riduzione dell'isoforma mitocondriale (fig. 13B-C). L'espressione della proteina a livello somatico è stata valutata mediante immunostochimica (IHC) per *GLRX2* sulle sezioni dei tumori dei pazienti (fig. 13D): a livello citosolico è stata sempre riscontrata una colorazione

negativa, mentre a livello nucleare si è osservata positività solo nel soggetto I.2, suggerendo che l'isoforma nucleare possa essere ancora espressa.

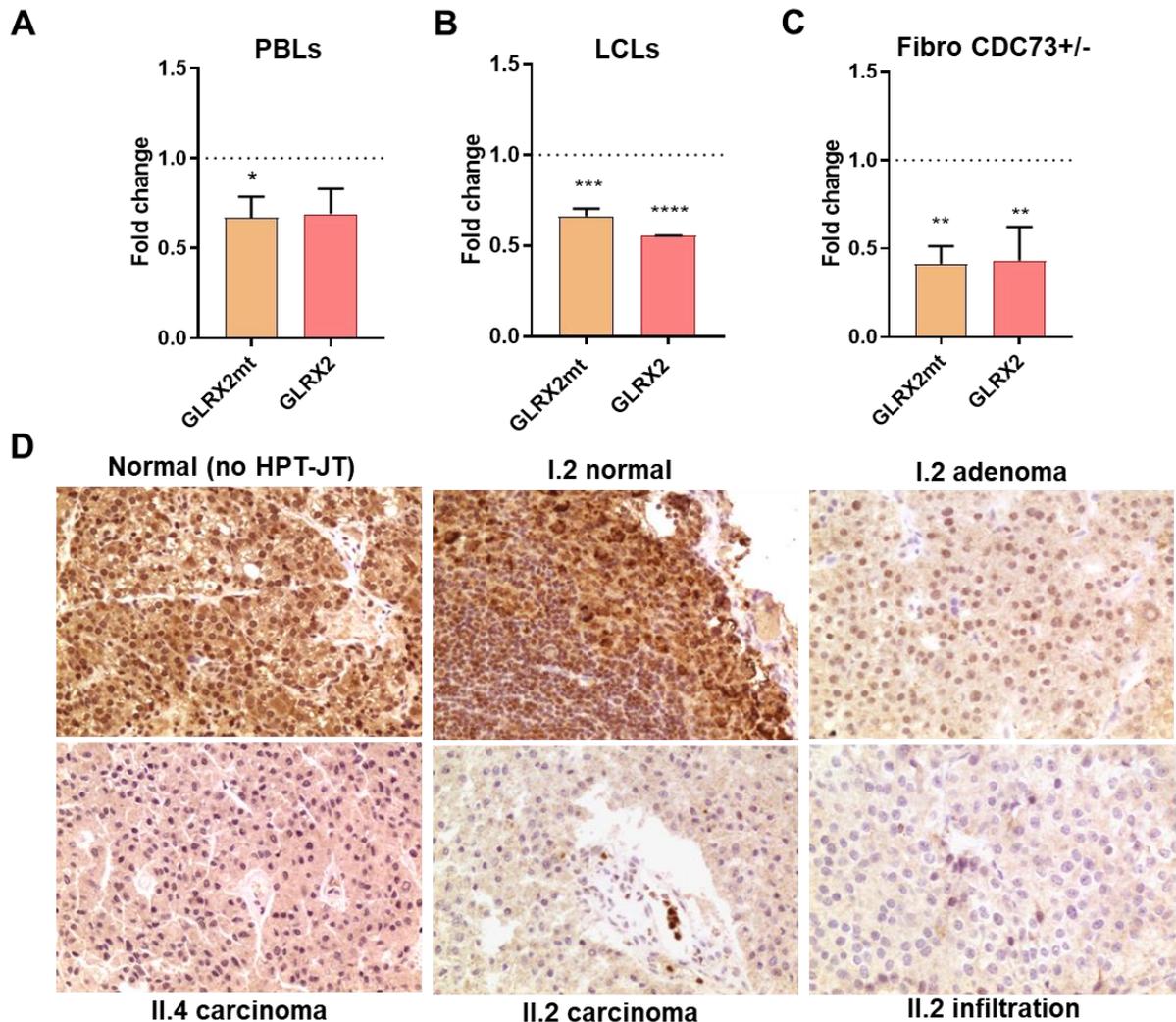


Figura 13. L'espressione di *GLRX2* è dimezzata nei tessuti sani dei pazienti e scompare nei tumori. **A)** Espressione di *GLRX2* nel sangue dei pazienti I.2, II.3, II.4 e II.5 (*CDC73*^{+/-}) contro due controlli II.1 e II.6 (*CDC73*^{+/+}) della stessa famiglia, N=3. **B)** Espressione di *GLRX2* in linee linfoblastoidi ottenute dai pazienti II.3 e II.5 (*CDC73*^{+/-}) confrontati con due controlli sani (*CDC73*^{+/+}). N=3 **C)** Espressione di *GLRX2* in coltura di fibroblasti primari di paratiroidi ottenuta dal paziente II.3 (*CDC73*^{+/-}) confrontati con un controllo sano (*CDC73*^{+/+}), N=6. Dati espressi come fold change, (*CDC73*^{+/-})/(*CDC73*^{+/+}). Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, p<0.05 (*); p<0.01 (**); p<0.001(***). **D)** IHC per *GLRX2* nel tessuto FFPE di ghiandole paratiroidi dei soggetti della famiglia HPT-JT. Colorazione di tessuto paratiroidi normale di un soggetto non HPT-JT, non correlato alla famiglia; tessuto paratiroidi normale del paziente HPT-JT I.2; adenoma paratiroidi del paziente HPT-JT I.2; i carcinomi paratiroidi dei pazienti HPT-JT II.4 e II.2; colorazione dell'infiltrazione tiroidea del carcinoma paratiroidi del soggetto HPT-JT II.2. Ingrandimento 40X.

La presenza di *GLRX2* nei nuclei dell'adenoma del soggetto potrebbe sortire un effetto protettivo sul genoma contro i danni dello stress ossidativo; prove recenti hanno dimostrato che il GSH svolge un ruolo chiave nel preservare lo stato redox del nucleo durante il ciclo cellulare, è stato infatti osservato che anche quando la membrana nucleare si dissolve durante la mitosi, il pool di GSH rimane nelle immediate vicinanze della cromatina durante tutti gli stadi della divisione cellulare, probabilmente al fine di proteggere il DNA dai danni da parte dei ROS⁷³.

Inoltre, è noto che la capacità di *binding* al DNA di molti fattori di trascrizione è regolata attraverso meccanismi di glutathionilazione e deglutathionilazione, tra cui anche p53, noto per la sua funzione di “guardiano del genoma”. È dunque plausibile ipotizzare che il mantenimento dell’espressione della GLRX2 nel nucleo del soggetto I.2 abbia conferito al paziente maggiore stabilità genomica e che al contrario la sua assenza nei nuclei dei soggetti che hanno sviluppato i carcinomi (II.2 e II.4) possa aver in parte contribuito allo sviluppo di un fenotipo tumorale maligno; sfortunatamente la scarsa qualità del tessuto FFPE dell’adenoma del soggetto II.3 non ha permesso di valutare l’espressione della proteina per poter esplorare ulteriormente questa ipotesi. La totale perdita di espressione di GLRX2 mitocondriale osservata in tutti i tumori invece, potrebbe essere causa di gravi danni funzionali dettati dalla mancanza del principale catalizzatore della deglutathionilazione proteica; sono molteplici infatti le proteine legate dal GSH a livello mitocondriale tra cui proteine del ciclo di Krebs, della OXPHOS, proteine di trasporto e proteine coinvolte nella fissione e fusione⁴⁶. Normalmente tale legame servirebbe a modularne l’attività e rappresenterebbe una protezione per i tioli proteici dall’ossidazione irreversibile; tuttavia, la persistenza del legame P-SSG potrebbe determinare una costante inibizione dell’attività delle proteine coinvolte, con esiti deleteri sulla funzionalità mitocondriale. Nei tumori associati alla sindrome HPT-JT è stata frequentemente riscontrata perdita di eterozigosi (LOH) del locus di *CDC73* in accordo con l’ipotesi del "doppio hit" di Knudson che prevede che, affinché si manifesti il tumore, entrambi gli alleli di un gene oncosoppressore debbano essere inattivati, tramite mutazioni o tramite silenziamento epigenetico. Ciò è confermato dal fatto che oltre il 75% dei pazienti con tumore paratiroideo presenta un’immunoreattività della parafibromina ridotta o assente. È stato riportato che l’inattivazione biallelica di *CDC73* è generalmente causata da mutazioni puntiformi o da mutazioni puntiformi combinate con LOH del braccio lungo del cromosoma 1 (1q)^{52,74,75}. Per capire se alla base dell’assenza di GLRX2 mitocondriale nei tumori HPT-JT ci fosse una LOH del cromosoma 1 o almeno della regione che include *CDC73* e *GLRX2*, è stata eseguita la genotipizzazione dei tumori FFPE di due soggetti, II.2 e II.4 che ha rivelato che il secondo hit mutazionale in *CDC73* è rappresentato da due mutazioni nonsense - c.64G>T e c.165C>G, già riportate in letteratura in associazione alla sindrome, escludendo dunque la presenza di una delezione cromosomica che potrebbe aver coinvolto anche il locus di *GLRX2*. L’LOH del locus specifico di *GLRX2* è stata inoltre esclusa grazie all’individuazione di un polimorfismo (c.118A/T) in eterozigosi individuato solo nel tessuto sano del soggetto I.2 - non ereditato dai soggetti II.2 e II.4 - e riscontrato nuovamente anche nell’adenoma del soggetto, suggerendo che entrambi gli alleli *GLRX2* fossero ancora presenti nel tumore. I meccanismi responsabili della

mancata espressione di GLRX2 nei tumori dei pazienti potrebbero pertanto essere molteplici, andando dal controllo epigenetico a possibili alterazioni nelle modificazioni delle proteine istoniche che potrebbero rendere il gene inaccessibile al macchinario di trascrizione. Un'altra ipotesi potrebbe essere legata all'insorgenza di mutazioni introniche; è stato infatti riscontrato che mutazioni del DNA distanziate da giunzioni esone-introne portano comunemente all'inclusione di pseudoesoni, a causa dell'attivazione di siti di splicing non canonici, oppure che grandi mutazioni introniche possono interrompere sequenze regolatrici della trascrizione⁷⁶. Infine, il silenziamento potrebbe anche innescarsi post-trascrizionalmente a causa della degradazione dell'mRNA e/o della repressione della sua traduzione da parte di siRNA o miRNA, ma saranno necessarie ulteriori indagini per chiarire questo aspetto.

Il knock-out di GLRX2 determina una riduzione della capacità proliferativa nei modelli tumorali *in vitro*.

Con il fine di indagare l'effetto fenotipico della mancanza di GLRX2 e valutare se questa possa, attraverso una alterazione della deglutationilazione, determinare una riduzione nella funzionalità proteica - in particolar modo di proteine legate al metabolismo mitocondriale - mimando le disfunzioni osservate nei tumori oncocitari, sono stati creati due modelli *GLRX2* KO a partire dalle linee cellulari di carcinoma della tiroide (TPC1) e colon (HCT116) mediante *genome editing* con la tecnica CRISPR-Cas9. Per ogni linea trasfettata è stata effettuata una selezione clonale e lo status di *GLRX2* nei singoli cloni è stato verificato mediante *Fluorescent-PCR capillary gel electrophoresis* e sequenziamento Sanger, validando la scomparsa della proteina mediante western blot (fig. 14A-B); terminato lo screening, sono stati creati per entrambi i modelli cellulari scelti, due pool di cloni, uno wild-type per *GLRX2* ed uno KO, utilizzati in tutte le successive analisi. In accordo con il ridotto tasso proliferativo dei tumori oncocitari, la prima caratteristica distintiva riscontrata in seguito alla perdita della proteina nei pool ottenuti è stata la ridotta capacità proliferativa delle linee *GLRX2* KO rispetto alle controparti WT (fig.14C), misurata come percentuale di confluenza nel tempo, impiegando il sistema di *Live cell Imaging* Incucyte. Una riduzione della capacità proliferativa nei nostri modelli KO è stata inoltre riscontrata mediante un saggio di formazione delle colonie, test che esamina la capacità di una singola cellula di andare incontro a continue divisioni cellulari risultanti nella formazione di una colonia. Come si può osservare in fig.14D, la capacità di entrambi i modelli *GLRX2* KO di formare colonie è significativamente ridotta rispetto alle controparti WT, a conferma che la perdita della proteina sia in grado di determinare un abbassamento del tasso proliferativo cellulare. È noto dalla letteratura che durante la replicazione cellulare il pool di glutatione (GSH) nucleare è fortemente ridotto: il gruppo di ricerca di Markovic ha osservato che durante il ciclo cellulare il livello delle proteine nucleari glutationilate è maggiore prima e durante la proliferazione cellulare e diminuisce quando la replicazione è completa⁷³; gli autori attribuiscono l'aumento di glutationilazione nelle prime fasi della proliferazione cellulare all'incremento dei ROS citoplasmatici che innescano la cascata di segnalazione mediata dal fattore di crescita dell'epidermide (EGF) che successivamente attiva la replicazione del DNA e la divisione cellulare⁷⁷. Un livello elevato di GSH nel nucleo potrebbe pertanto fornire protezione alle proteine contro la minaccia ossidativa proveniente dal citoplasma nella fase iniziale della proliferazione cellulare attraverso la glutationilazione, in quanto modificazione reversibile.

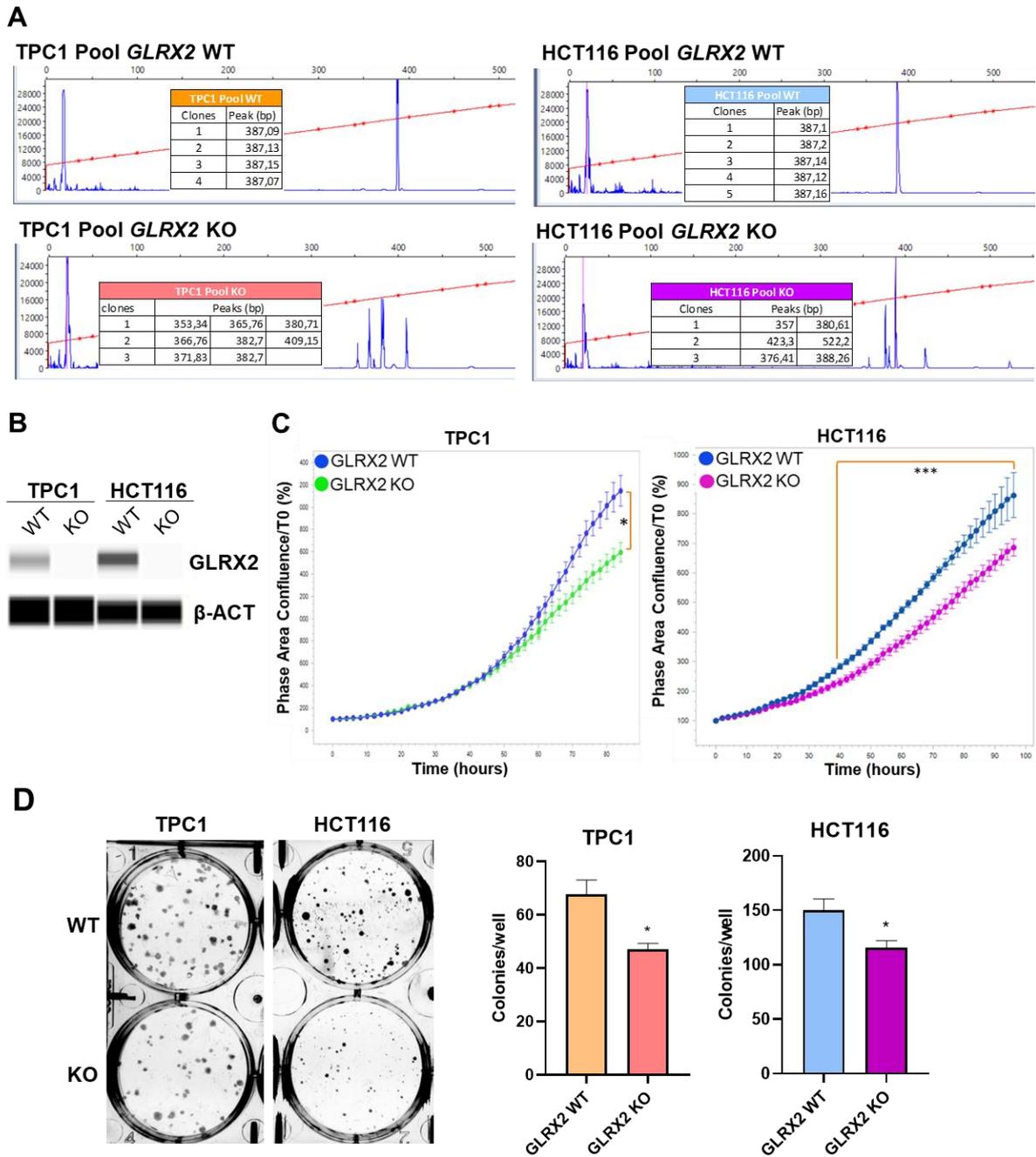


Figura 14. I pool GLRX2 mostrano una ridotta capacità proliferativa in vitro. A) Esempio di Fluorescent-PCR capillary gel electrophoresis sui pool TPC1 e HCT116 GLRX2 WT e KO; i primer fluorescenti amplificano un frammento di GLRX2 di ampiezza pari a 387bp che include la regione target del sistema CRISPR-Cas9; la PCR effettuata sui DNA estratti dai pool WT dà un unico prodotto dell'ampiezza attesa in entrambi i modelli; la PCR effettuata sui DNA dei pool KO dà prodotti di dimensioni diverse a seconda del tipo di mutazione (del/ins) avvenuta in ogni clone, non ci sono picchi WT. B) Western-blot per GLRX2 sui pool TPC1 e HCT116 WT e KO confermano la scomparsa della proteina. C) Percentuale di confluenza di tutte le linee GLRX2 WT e KO nell'arco di 96 ore calcolata con il sistema di Live-cell Imaging Incucyte, scansionando la piastra ogni ora. N=3 D) Colony formation assay effettuato sui pool TPC1 e HCT116 GLRX2 WT e KO, N=3. Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

La mancanza dell'isoforma nucleare della proteina, in grado di mediare la deglutinationilazione proteica separando il GSH dalle proteine, potrebbe pertanto aver determinato nei nostri modelli

KO un abbassamento del pool di glutazione nucleare ed il conseguente squilibrio nelle diverse fasi di glutationilazione e deglutationilazione proteica nel corso del ciclo cellulare, determinando il rallentamento della proliferazione osservato. Effettivamente, in un esperimento preliminare di misurazione del pool GSH/GSSG intracellulare condotto nelle nostre linee TPC1 *GLRX2* WT e KO è stata riscontrata nella linea KO una netta riduzione del GSH intracellulare insieme ad un significativo shift ossidativo nel ratio GSSG/GSH totale (fig.15).

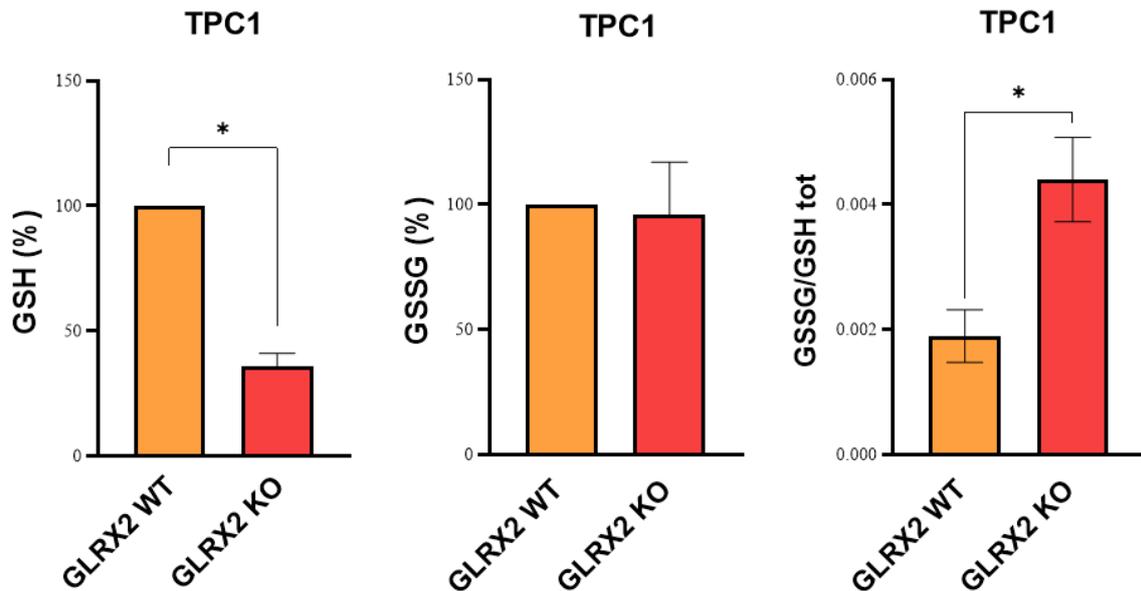


Figura 15. Ossidazione del pool di GSH nella linea TPC1 *GLRX2* KO. Dati espressi come fold change *GLRX2* KO/WT, N=3. Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

Dal momento che il GSH è sintetizzato nel citosol e solo successivamente trasportato nel nucleo e nel mitocondrio, è plausibile ipotizzare che un abbassamento del pool GSH/GSSG citosolico nei nostri modelli possa riflettersi in una riduzione della disponibilità di GSH anche nei due organelli. Essendo inoltre la deplezione di *GLRX2* l'unica variabile tra la linea WT e la linea KO, è plausibile ritenere che la riduzione del GSH riscontrata possa essere correlata alla persistenza della glutationilazione proteica dovuta alla mancanza del principale catalizzatore della deglutationilazione. Un ulteriore impatto sulla proliferazione dovuto alla deplezione di *GLRX2* e alla riduzione del GSH nucleare potrebbe riguardare la sintesi stessa del DNA. L'isoforma nucleare di *GLRX2* è in grado, infatti, di regolare l'attività della ribonucleotide reduttasi (RNR), responsabile della riduzione del ribosio a deossiribosio e quindi della sintesi stessa dei deossiribonucleotidi, gli elementi costitutivi del DNA⁷⁸. *GLRX2* nucleare è inoltre coinvolta, attraverso il mantenimento del pool GSH/GSSG nucleare in stato ridotto, nella regolazione dell'attività di diverse proteine - tra cui fattori di trascrizione - che necessitano di un ambiente ridotto per legarsi al DNA⁷³. In aggiunta a ciò, non è trascurabile il danno che

l'assenza di *GLRX2* potrebbe aver determinato a livello mitocondriale, in quanto è stato più volte dimostrato che la proteina ricopre un ruolo centrale nel modulare la produzione di energia da parte della catena respiratoria mitocondriale, mediando la deglutinationilazione proteica. Evidenze riportano infatti che in cellule KO per *GLRX2* si osserva una glutattonilazione stabile del CI, in particolar modo della subunità di 75kDa, e che ciò comporta una diminuzione critica della sua attività, ripristinata solo dalla reintroduzione di *GLRX2*⁷⁹. Anche il complesso della ATP sintasi (CV) è un target di glutattonilazione: è stato infatti dimostrato che la glutattonilazione della subunità α del complesso contribuisce, in condizioni fisiologiche, a regolare la sintesi di ATP e ridurre la produzione mitocondriale di ione superossido, ed in caso di stress ossidativo impedisce l'ossidazione irreversibile del complesso; una glutattonilazione prolungata tuttavia, come quella che potrebbe essere determinata dalla mancanza di *GLRX2*, è stata associata ad una riduzione cronica della sintesi di ATP e allo sviluppo di patologie cardiache^{70,80}. Insieme a questi due esempi, moltissime altre proteine coinvolte nel metabolismo energetico sono noti target di glutattonilazione tra cui l'Aconitasi⁸¹, la Piruvato Deidrogenasi⁸², l' α -chetoglutarato deidrogenasi⁸³ ed il CII⁸⁴, strettamente dipendenti da una regolazione redox della loro attività. Nel complesso, sulla base di quanto osservato sperimentalmente e di quanto riportato in letteratura è quindi plausibile pensare che la mancanza di *GLRX2* nei nostri modelli, data la sua peculiare doppia localizzazione nucleare e mitocondriale ed il suo coinvolgimento in diversi aspetti della replicazione e del metabolismo cellulare, possa aver determinato degli squilibri redox in entrambi gli organelli, tali da determinare una riduzione della velocità di replicazione. Dal momento che la ridotta proliferazione è una caratteristica tipica dei tumori oncocitari, il risultato ottenuto con il KO di *GLRX2* ha avvalorato la nostra ipotesi che il gene possa essere in qualche modo coinvolto con lo sviluppo di questo peculiare fenotipo nei tumori dei pazienti.

Un'ulteriore caratteristica comunemente riscontrata nei tumori oncocitari, in particolar modo quelli renali, è una ridotta capacità di metastatizzare⁸⁵. È stato dunque ipotizzato che qualora *GLRX2* sia coinvolta nella trasformazione oncocitaria, la sua assenza potrebbe avere un impatto anche sulla capacità invasiva dei modelli. Al fine di indagare se al ridotto tasso proliferativo dei modelli *GLRX2* KO si associasse anche una ridotta capacità migratoria è stato effettuato un saggio di *wound healing*: a partire da un monostrato confluyente di cellule è stata creata una "ferita", ovvero una zona priva di cellule, monitorata nell'arco di 24 ore, per poter valutare la capacità di invasione e di riparazione della ferita dei modelli. Dall'analisi è risultato che mentre

nelle HCT116 la linea WT ha una maggiore capacità migratoria rispetto alla KO, nelle TPC1 è la linea GLRX2 KO a migrare più rapidamente rispetto alla controparte WT (fig.16).

Indubbiamente è possibile che cellule di diversa origine tissutale regolino diversamente la migrazione e che non necessariamente una riduzione del tasso proliferativo -come quella

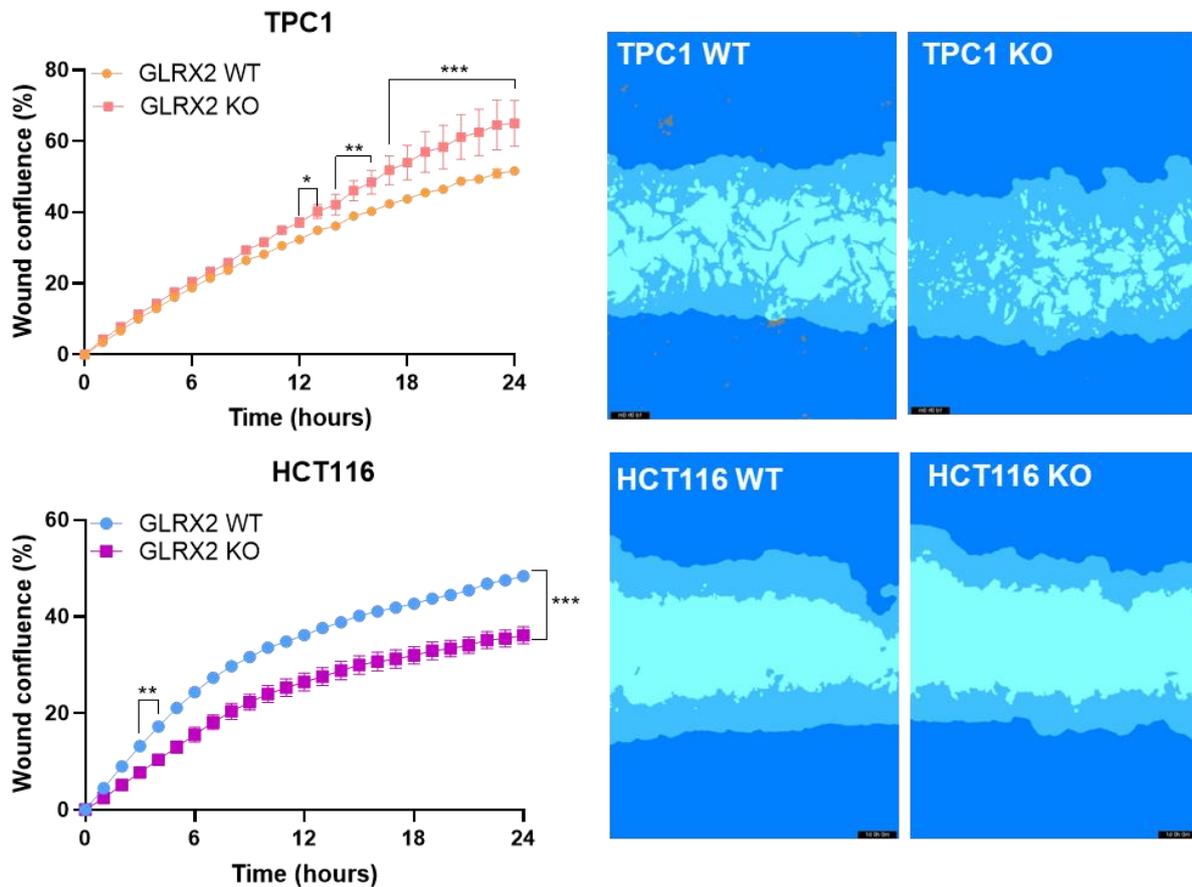


Figura 16. Misurazione della capacità migratoria dei modelli GLRX2 WT e KO. Migrazione cellulare misurata come percentuale di confluenza cellulare all'interno della ferita nell'arco di 24h. Le scansioni sono state effettuate ogni ora mediante lo strumento di Live-cell imaging incucyte e le analisi sono state effettuate con il software dello strumento, N=3. Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***).

osservata in entrambi i modelli KO- si rifletta in una minore capacità invasiva. È opportuno inoltre considerare che sono stati riscontrati dei casi di metastatizzazione tra i carcinomi tiroidei, tumori caratterizzati da un'elevata eterogeneità, indipendentemente dal verificarsi della trasformazione oncocitaria. In aggiunta a ciò, sono ancora pochi gli studi che indagano il ruolo della glutationilazione nel processo di invasione: è noto ad esempio che l'actina sia un target di glutationilazione e che questa modifica post traduzionale riduca la capacità della proteina di polimerizzare⁸⁶, ma poco si sa sulla regolazione delle altre proteine che entrano in gioco in questo meccanismo. Nel caso specifico dell'actina, inoltre, è stato visto che la deglutationilazione della proteina è mediata da GLRX1, data la sua localizzazione citosolica⁸⁶. Sebbene siano necessari ulteriori studi per comprendere in che modo – e con quale effetto - la

mancanza di GLRX2 a livello nucleare e mitocondriale possa contribuire all'invasività cellulare, il risultato ottenuto non esclude che la proteina possa essere comunque coinvolta nel processo di trasformazione oncocitaria dei tumori osservati.

Le linee cellulari GLRX2 KO mostrano un rallentamento nella s-glutationilazione proteica in condizioni di stress ossidativo.

È noto che in caso di stress ossidativo acuto i tioli proteici vadano incontro a glutationilazione con il fine di evitare l'ossidazione irreversibile e la conseguente inattivazione della proteina. L'attività di GLRX2 è indispensabile per rendere questo processo reversibile ed evitare conseguenze deleterie date da una glutationilazione del proteoma stabile. Con l'intento di valutare variazioni nell'andamento della glutationilazione proteica in risposta a stress ossidativo nei nostri modelli cellulari TPC1 e HCT116 *GLRX2* WT e KO, le linee sono state sottoposte ad un trattamento acuto con H₂O₂ 1mM (TPC1) e 12mM (HCT116) per diversi tempi, ed i lisati proteici totali estratti sono stati analizzati in Western Blot utilizzando un anticorpo α-GSH (fig.17A). Nella linea TPC1 WT è stata osservata un'immediata risposta alla condizione di stress, evidenziata dall'incremento della glutationilazione delle proteine totali già dopo 5 min di trattamento, seguita poi da una tendenza al ripristino della glutationilazione basale per tempi di trattamento più lunghi. Nella linea KO invece, sebbene si sia osservato un incremento immediato anche in questo caso in seguito a stress acuto, la glutationilazione proteica è risultata persistere nel tempo, confermando che l'assenza di GLRX2 risulta in una compromissione dei meccanismi di de-glutationilazione proteica. Le linee HCT116 *GLRX2* WT e KO, al contrario, non mostrano alcuna differenza significativa nella capacità di glutationilare o de-glutationilare le proteine totali. Tale discrepanza potrebbe dipendere dalla diversa capacità di detossificazione dell'H₂O₂ dei due modelli cellulari. In un Western blot preliminare, infatti, è stato riscontrato che le HCT116 sembrerebbero esprimere maggiormente già in condizioni basali alcuni enzimi antiossidanti quali la Catalasi (CAT), principale ossidoreduttasi citosolica in grado di ridurre in due step l'H₂O₂ ad H₂O e ossigeno molecolare, e la Perossiredossina 3 (PRDX3), preposta alla detossificazione da perossidi all'interno del mitocondrio (fig. 17B).

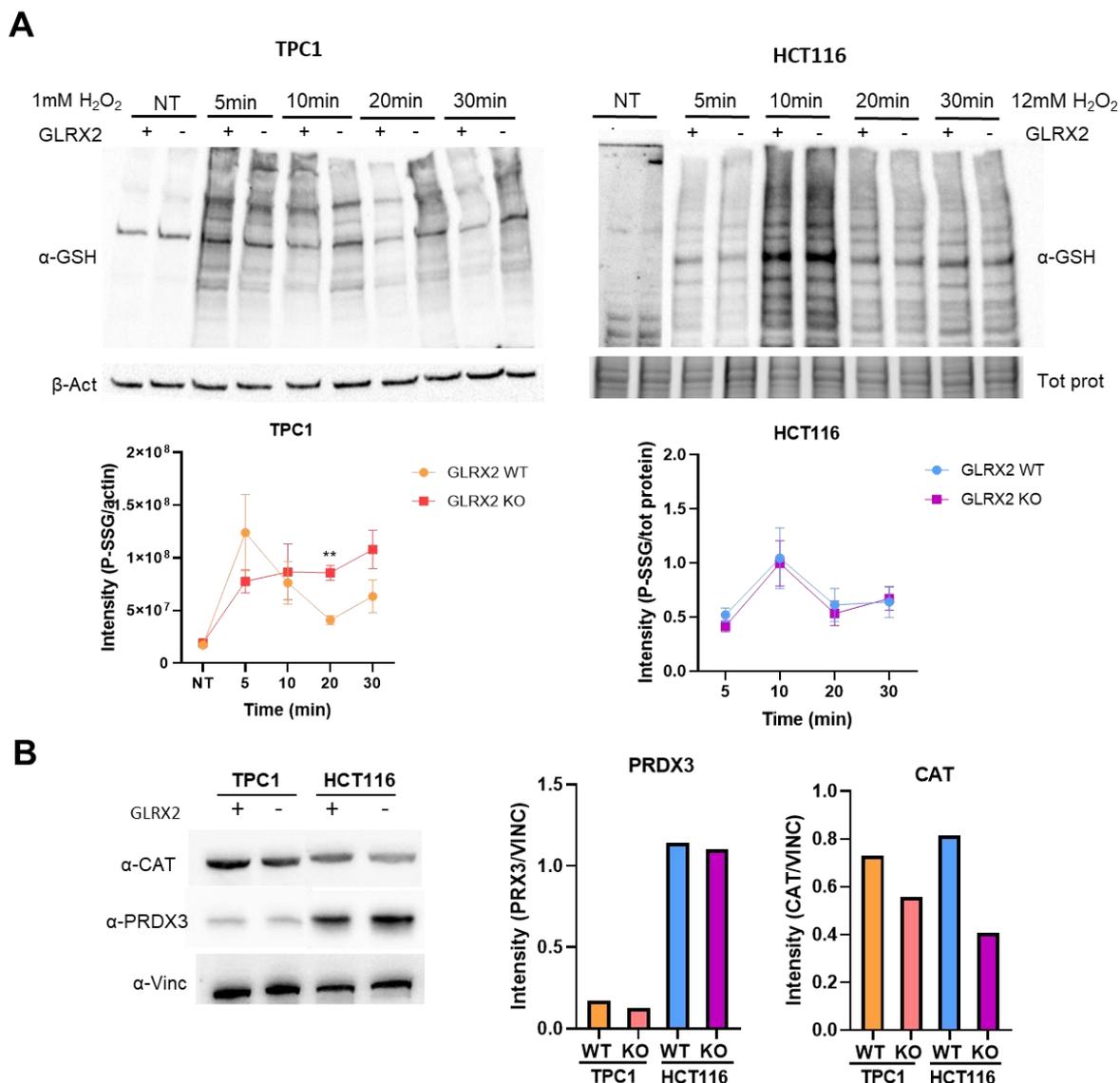


Figura 17. Andamento della glutationilazione nei modelli GLRX2 WT e KO in seguito a stress ossidativo. A) Western blot rappresentativo α -GSH per valutare l'andamento della glutationilazione su lisati totali TPC1 GLRX2 WT e KO (sx) e HCT116 GLRX2 WT e KO (dx) non trattate (NT) e trattate rispettivamente con 1mM e 12mM H₂O₂ per diversi time-point. In basso le densitometrie relative ai blot: Le intensità del α -GSH sono state normalizzate sul segnale della B-actina per le TPC1, e sulle proteine totali per le HCT116. N=3. Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***). **B)** Western blot α -CAT e α -PRDX3 su lisati totali dei pool GLRX2 WT e KO con le relative densitometrie calcolate con il software ImageJ. N.B: dato preliminare N=1.

Questa grande capacità di detossificare i ROS è stata dimostrata anche da esperimenti di sopravvivenza in cui le cellule sono state monitorate in tempo reale in un sistema di *live imaging*, in seguito ad un trattamento con concentrazioni crescenti di H₂O₂ per 30min. L'intento dell'esperimento è stato quello di valutare se in seguito ad uno stress acuto con 12mM H₂O₂, l'effetto del trattamento sulla linea cellulare fosse irreversibile, inducendo morte cellulare, o se le cellule fossero in grado di detossificare la H₂O₂ e quindi di sopravvivere allo stress ossidativo indotto. Nella linea HCT116 persino uno stress acuto dato da una

concentrazione di H_2O_2 pari a 12mM non ha impedito il *rescue* della linea in termini di proliferazione cellulare (Suppl.2). Nonostante non si osservino cambiamenti nella cinetica di deglutinationilazione, probabilmente a causa di una maggiore capacità del modello di detossificare l' H_2O_2 , il modello HCT116 resta comunque un valido mezzo per studiare i cambiamenti nella glutationilazione determinati dall'assenza di GLRX2, in quanto, gli esperimenti condotti precedentemente hanno evidenziato, già in assenza di stress, una ridotta capacità proliferativa e di invasione della linea HCT116 *GLRX2* KO rispetto alla controparte WT. Il ritardo osservato nella glutationilazione delle proteine nella linea TPC1 *GLRX2* KO, invece, potrebbe essere il riflesso di una ridotta capacità della linea di far fronte prontamente allo stress ossidativo; in esperimenti condotti dal gruppo di Wu su colture primarie di cellule epiteliali del cristallino (LEC) *GLRX2* KO, è stata infatti riscontrata una maggiore sensibilità allo stress ossidativo ed una ridotta funzionalità proteica legata ad uno stato stabilmente glutationilato del proteoma, recuperato solo in seguito alla reintroduzione di *GLRX2*. Lo stesso gruppo ha dimostrato in un altro lavoro che *GLRX2* stessa mostra attività perossidasi dipendente dal GSH e dalla tioredossina riduttasi (TR) come donatori di elettroni, e pertanto potrebbe contribuire nel detossificare i ROS. La persistenza della glutationilazione della linea KO osservata con tempi di trattamento più lunghi - laddove invece la linea WT sembrerebbe ripristinare quella di partenza – alimenta l'ipotesi che la stabilizzazione della modificazione possa avere effetti deleteri sulla funzionalità proteica. In uno studio recente, il gruppo di Mailloux ha fornito la prova che l'assenza di *GLRX2* in modelli murini KO provoca lo sviluppo dell'ipertrofia ventricolare sinistra e fibrosi localizzata nel tessuto cardiaco, condizione associata ad una maggiore dipendenza dalla glicolisi per soddisfare il fabbisogno energetico. Ciò è stato correlato dagli autori all'inibizione dell'attività del CI dovuta a glutationilazione insieme al dimezzamento della produzione di ATP mitocondriale⁷¹. Il dato ottenuto con la linea TPC1 *GLRX2* KO in seguito a stress ossidativo è risultato dunque incoraggiante dal momento che, laddove la glutationilazione osservata coinvolga proteine della catena respiratoria o del metabolismo mitocondriale, si potrebbe innescare una disfunzione bioenergetica importante, mimando un'ulteriore caratteristica distintiva dei tumori oncocitari.

Xenograft GLRX2 knock-out mostrano un fenotipo simil-oncocitario *in vivo*.

La sperimentazione *in vitro* presenta il limite di non riuscire a riprodurre le pressioni selettive alle quali le cellule sono sottoposte in un organismo e determinate dal microambiente che le circonda, rendendo i dati *in vitro* non sempre adeguatamente accurati nel predire ciò che si può osservare nel sistema *in vivo*. Ciò assume un ruolo centrale nello studio del cancro e dei meccanismi di *rewiring* metabolico attuati dalle cellule tumorali nelle varie fasi della progressione. Nelle prime fasi della tumorigenesi, infatti, le condizioni di ipossia tipiche dei tumori solidi in rapido accrescimento impongono un metabolismo fortemente glicolitico, selezionando le cellule in cui la glicolisi è più attiva. È in questa fase che si ipotizza che le mutazioni disassemblanti dell' mtDNA tipiche degli oncocitomi (e.g. mutazioni nelle subunità del CI), possano insorgere ed essere indirettamente selezionate, in quanto il loro effetto fenotipico porta spontaneamente ad un incremento della glicolisi. È noto, tuttavia, che per accrescersi ulteriormente e metastatizzare i tumori necessitano di una OXPHOS funzionante ed efficiente⁸⁷, verso la quale reindirizzano nuovamente il metabolismo. In questo stadio, la crisi energetica mitocondriale innescata dalla/e mutazione/i impedisce questo riadattamento metabolico del tumore e stimola dei meccanismi di biogenesi mitocondriale compensatoria determinando un aumento del numero di mitocondri (iperplasia). L'intensa replicazione del mtDNA può a sua volta favorire l'insorgenza e accumulo di mutazioni che, superata la soglia di manifestazione fenotipica, possono indurre un ulteriore danno alla funzionalità mitocondriale, confinando il tumore in uno stato di ridotta aggressività, come riscontrato negli oncocitomi. La nostra ipotesi per spiegare la trasformazione oncocitaria dei tumori dei pazienti è che le alterazioni indotte dall'assenza di GLRX2 possano mimare, grazie ad una glutationilazione persistente del proteoma mitocondriale, la disfunzione bioenergetica causata dalle mutazioni deleterie negli oncocitomi, promuovendo un metabolismo più glicolitico. Nella fase più ossidativa della tumorigenesi tale disfunzione potrebbe aver innescato gli eventi compensatori precedentemente discussi, permettendo l'accumulo di mutazioni del mtDNA (riscontrate anche nei tumori dei pazienti) in grado di minare ulteriormente la funzionalità mitocondriale contribuendo così allo sviluppo di un fenotipo tumorale benigno. Al fine di valutare l'effetto della mancanza di GLRX2 sul fenotipo tumorale *in vivo*, è stato condotto un esperimento pilota inoculando sottocute le linee *GLRX2* WT e KO di tiroide e di colon in topi nudi atimici Nu/Nu, un modello murino immunodeficiente. Nel corso dell'esperimento per ogni modello – tiroideo e di colon - sono stati inoculati equamente sia i singoli cloni WT e KO ottenuti dall'ingegnerizzazione con CRISPR-Cas9, sia i pool WT e KO. Nei 12 topi inoculati con le linee TPC1 non si è osservata una crescita tumorale *in vivo*, indipendentemente che

dall'inoculo di singoli cloni o pool di cloni. Dall'inoculo con le linee HCT116 invece, è stato ottenuto un solo *xenograft* (1/12) dall'inoculo del pool di cloni KO (Tab.5).

L'analisi ultrastrutturale dello *xenograft* al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) ha

Xenograft		Xenograft size (mm ³)	Metastasis
Pilot 1	HCT116 KO.1*	240	absent
Pilot 2	HCT116 WT.1	18	absent
	HCT116 WT.2	8	absent
	HCT116 KO.2*	506,25	absent
	HCT116 WT.3	115	absent
	HCT116 KO.3	370,5	absent
	HCT116 KO.4	1160	absent
Exp	HCT116 KO.5	989,6	absent
	HCT116 WT.3	36	Intestinal
	HCT116 KO.6	230	absent
	HCT116 KO.7	399	absent
	HCT116 KO.8	22,5	absent

Tabella 5. Tabella riassuntiva degli *xenograft* ottenuti nei diversi esperimenti, indicante la dimensione di ogni tumore e l'eventuale presenza di metastasi. *= *xenograft* che hanno presentato caratteristiche simil-oncocitarie; grigio= *xenograft* la cui analisi istologica è in corso.

rivelato che i mitocondri apparivano più elettrondensi, arrotondati, ingranditi e con creste lamelliformi, ricapitolando in parte le caratteristiche fenotipiche del tumore oncocitario (fig.18A a-b).

È stato quindi condotto un secondo esperimento pilota incrementando il numero di cellule tumorali inoculate al fine di aumentare la probabilità di *engraftment*. I pool *GLRX2* WT e KO ottenuti per entrambi i modelli sono stati inoculati in 12 topi, 3 per ogni gruppo sperimentale. Da questo secondo esperimento ancora una volta non si è osservata crescita tumorale delle linee tiroidee *in vivo*; con le linee HCT116 sono stati invece ottenuti *xenograft* *GLRX2* WT e KO le cui dimensioni sono riportate nella Tabella 5. L'analisi al TEM ha rivelato che uno degli *xenograft* KO presentava un fenotipo misto includendo sia mitocondri strutturalmente normali che mitocondri morfologicamente alterati, di forma arrotondata e meno elettrondensi (fig.18A. c-d), molto simili a quelli osservati nello *xenograft* del primo esperimento pilota, mentre i mitocondri dei tumori *GLRX2* WT analizzati apparivano normali (fig.18A. e-f). La colorazione

con ematossilina ed eosina del tessuto tumorale ha evidenziato la presenza di necrosi nei tumori WT, non riscontrata invece nei KO (fig.18B).

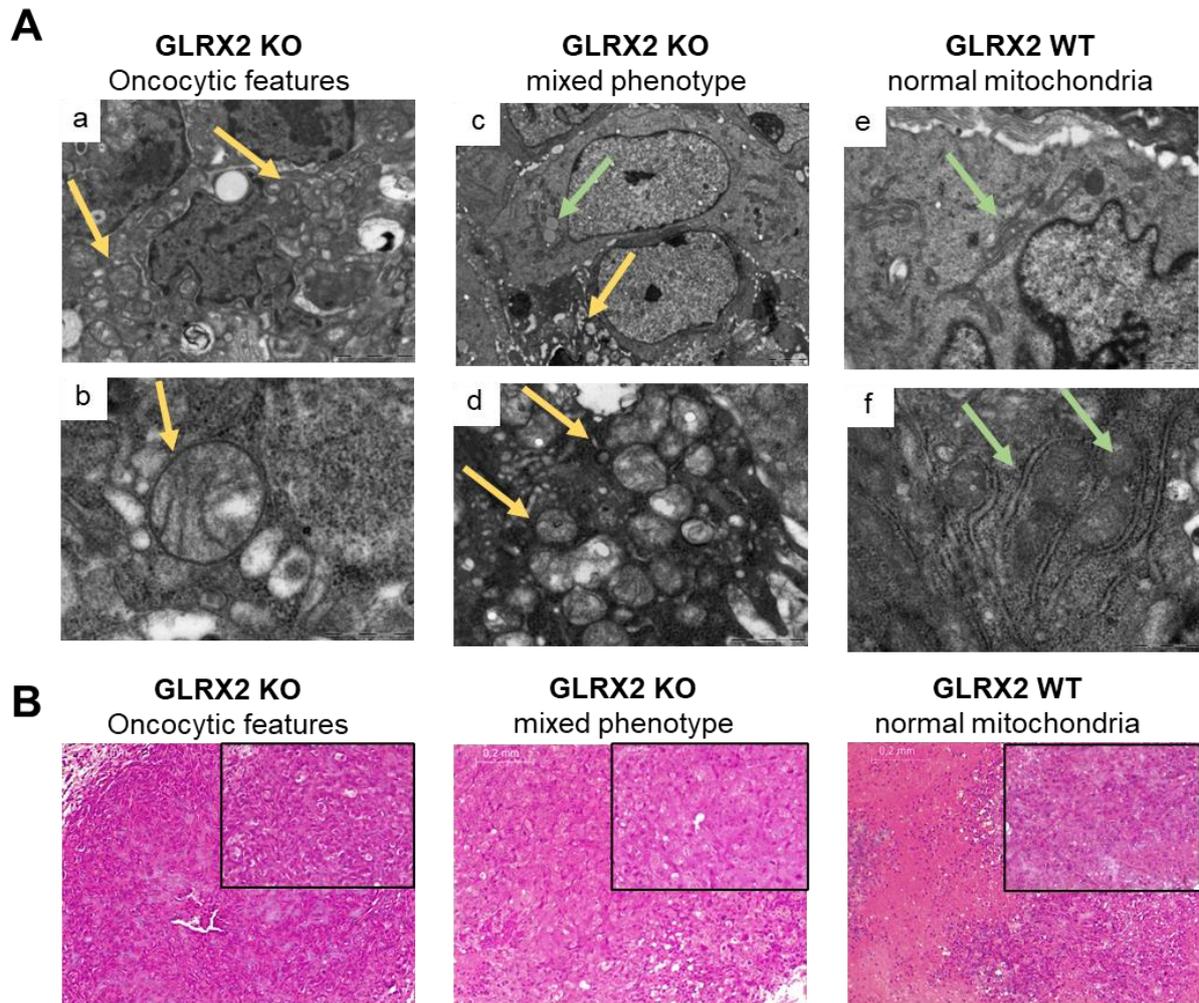


Figura 18. Caratterizzazione istologica degli xenograft GLRX2 WT e KO. A) Acquisizione al TEM degli xenograft: xenograft GLRX2 KO simil-oncocitario, i mitocondri appaiono arrotondati, ingranditi meno elettrondensi e con creste lamelliformi (a-b); xenograft GLRX2 KO con fenotipo misto, caratterizzato dalla compresenza di mitocondri strutturalmente normali e mitocondri alterati (c-d); xenograft GLRX2 WT, caratterizzato da mitocondri allungati e più elettrondensi (e-f). Le frecce verdi indicano mitocondri normali, le gialle mitocondri alterati; scale bars 2µm. B) H&E degli xenograft GLRX2 WT e KO, scale bars 0,2mm e 0,05mm.

Considerata la migliore resa del secondo esperimento pilota è stato effettuato un terzo esperimento inoculando esclusivamente le linee HCT116 GLRX2 WT e KO; da questi inoculi sono stati ottenuti ulteriori xenograft KO e un solo xenograft WT il cui volume (mm³) è indicato in tabella 5. Infine, dal momento che nei pazienti è stata osservata una correlazione inversa tra aggressività dei tumori e presenza di mutazioni mitocondriali è stata condotta un'analisi del mtDNA in NGS sugli xenograft ottenuti nei primi due pilot, al fine di valutare l'eventuale insorgenza di mutazioni nel mtDNA nel corso dell'esperimento *in vivo*: eccetto le varianti polimorfiche già presenti in entrambi i modelli, WT e KO, l'analisi non ha rilevato la presenza di varianti genetiche *de novo*. (Suppl. 3).

Nel complesso sono stati dunque ottenuti 4 *xenograft GLRX2* WT e 8 KO: dai dati preliminari sull'esperimento pilota è risultato che i due *xenograft* KO analizzati hanno mostrato caratteristiche simil-oncocitarie, a differenza dello *xenograft* WT, ma la caratterizzazione ultrastrutturale degli altri *xenograft* è ancora da completare per poter stabilire se vi è una correlazione significativa genotipo-fenotipo. Il mancato sviluppo di *xenograft* con le due linee TPC1, nonostante siano state provate più concentrazioni di cellule negli inoculi, ha rappresentato un risultato inatteso, dal momento che in letteratura sono stati precedentemente ottenuti *xenograft* dall'inoculo di questo modello tumorale⁸⁸. Una possibile ipotesi potrebbe risiedere negli effetti off-target (OTE) dovuti all'attività del sistema CRISPR-Cas9, riscontrati sia in cellule in coltura che in animali⁸⁹, dipendenti da molteplici fattori, tra cui il tipo di cellula ingegnerizzata⁹⁰. La creazione di pool cellulari a partire da singoli cloni con la modifica nel genotipo desiderata è sicuramente una strategia consigliata per "diluire" gli OTE; tuttavia, non si può escludere che vi possano essere delle alterazioni aggiuntive rilevabili solo con analisi *genome-wide*. Tra gli *xenograft* ottenuti dalla linea HCT116, i WT mostrano generalmente dimensioni ridotte rispetto ai KO; questa caratteristica li renderebbe classificabili come tumori meno aggressivi rispetto alla controparte KO che sembra proliferare in misura maggiore; è opportuno, tuttavia, considerare che uno dei topi inoculati con la linea *GLRX2* WT ha sviluppato una metastasi intestinale, e che l'analisi istologica degli *xenograft* ottenuti, ha rivelato la presenza di necrosi tissutale solamente nelle sezioni dei tumori WT, totalmente assente invece nei tumori KO esaminati. La necrosi generalmente viene riscontrata nelle zone centrali dei tumori solidi a causa di una vascolarizzazione inadeguata e degli stress metabolici che ne conseguono, come l'ipossia e la privazione di nutrienti⁹¹; inoltre, è spesso associata allo sviluppo di tumori aggressivi e ad una prognosi sfavorevole nell'uomo, dimostrato anche in recenti studi in cui è stato osservato che fattori secreti dalle cellule necrotiche sono in grado di stimolare la proliferazione e la migrazione cellulare⁹². Indubbiamente non si può escludere che disfunzioni determinate dall'alterazione della glutationilazione proteica a livello mitocondriale possano promuovere un metabolismo più glicolitico nelle prime fasi della proliferazione – il che spiegherebbe la maggiore grandezza riscontrata generalmente negli *xenograft* KO – tuttavia le alterazioni simil-oncocitarie osservate a livello ultrastrutturale in due dei tumori KO hanno alimentato l'ipotesi che nelle fasi più avanzate della progressione tumorale tali disfunzioni possano risultare deleterie ed essere sufficienti a contribuire alla manifestazione del fenotipo, ipotesi ulteriormente rafforzata dal non aver individuato varianti *de novo* nel mtDNA che potessero contribuire alla trasformazione oncocitaria. L'analisi degli ultimi *xenograft* ottenuti permetterà di confermare quanto osservato nell'esperimento pilota e di chiarire se ci sia una

correlazione significativa tra le alterazioni metaboliche causate dall'assenza di GLRX2 e la trasformazione oncocitaria. A partire dagli xenograft ottenuti, sono state poi allestite delle linee cellulari tumorali *ex vivo* GLRX2 WT e KO. Ciò ha consentito di ottenere un modello cellulare *in vitro* che avesse subito le pressioni selettive esercitate dal microambiente tumorale *in vivo* ed avesse mostrato i cambiamenti strutturali tipici dell'oncocitoma. Le linee *ex vivo* hanno costituito quindi un modello di indagine preliminare fondamentale per comprendere se l'assenza di GLRX2 possa davvero portare ad un deficit metabolico attraverso un'alterazione permanente della glutationilazione proteica negli *xenograft* HCT116 con fenotipo oncocitoide. Queste linee sono state quindi utilizzate, parallelamente alle linee di tiroide, per condurre i successivi esperimenti di caratterizzazione funzionale *in vitro*.

Il knock-out di *GLRX2* determina una glutathionilazione proteica differenziale a livello mitocondriale.

Con lo scopo di identificare quali proteine possano essere differenzialmente glutathionilate nel modello KO di *GLRX2*, con particolare focus sulle proteine coinvolte nel metabolismo mitocondriale, sono state condotte delle analisi di proteomica sulle linee TPC1 *GLRX2* WT e KO, sia in condizioni basali che in seguito a trattamento con 100uM H₂O₂ per 30min in modo tale da incrementare la glutathionilazione proteica inducendo uno stress ossidativo di tipo acuto. La scelta di condurre quest'indagine sulle linee tiroidee è stata dettata principalmente dalla maggiore suscettibilità del modello allo stress ossidativo, precedentemente evidenziato da un incremento della glutathionilazione delle proteine totali; la concentrazione di H₂O₂ è stata ridotta tenendo conto della maggiore sensibilità della tecnica nel rilevare questa modificazione post traduzionale, rispetto al classico western blot^{62,93}. Individuati dei potenziali target, la valutazione funzionale è stata successivamente estesa anche al modello di colon *ex vivo*. L'esperimento ha previsto l'arricchimento di proteine glutathionilate nei nostri campioni attraverso cromatografia per affinità, sfruttando una resina in grado di legare selettivamente le cisteine proteiche; ciò si è reso necessario ai fini della rilevazione, dal momento che le proteine glutathionilate costituiscono una percentuale inferiore delle proteine totali e con i normali protocolli di proteomica sarebbero difficili da individuare. In seguito all'arricchimento delle proteine glutathionilate nei lisati cellulari totali delle linee *GLRX2* WT e KO in condizioni basali sono state rilevate in tutto 3679 proteine. Tra queste solo tre proteine sono risultate differenzialmente glutathionilate tra le due linee: ICAM e ZNF852, più glutathionilate nella linea WT e CALCOCO2, più glutathionilata nella linea KO (fig.19A). ICAM è una glicoproteina della membrana cellulare, ZNF852 ha una funzione solo predetta nel favorire il legame al DNA di fattori di trascrizione e CALCOCO2 è un recettore implicato nell'immunità innata. Le tre proteine non sono funzionalmente legate tra loro e non vi sono evidenze scientifiche che descrivano il ruolo della glutathionilazione nel modularne l'attività; inoltre, la mancanza di una relazione di queste proteine con il metabolismo mitocondriale, nostro focus di studio, ci ha portato ad escluderle da ulteriori ricerche.

La resa pressoché nulla in termini di proteine differenzialmente glutathionilate potrebbe essere imputabile alla ridotta abbondanza di proteine mitocondriali all'interno dei campioni esaminati; infatti, nonostante le proteine mitocondriali siano sicuramente parte dei lisati cellulari totali, risultano meno rappresentate rispetto a quelle del comparto citosolico. Ciò implica ad esempio che la stessa proteina sia rilevata stocasticamente in un numero inferiore di replicati, non perché

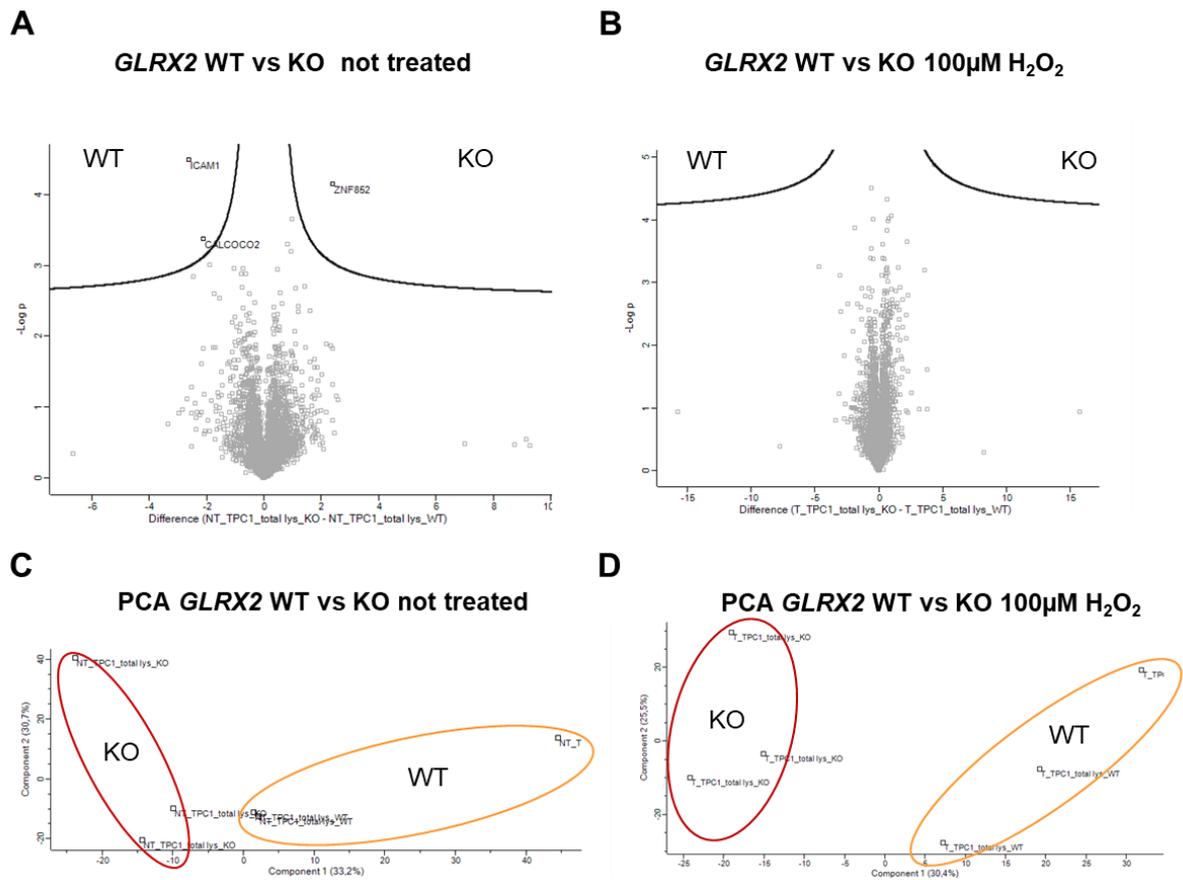


Figura 19. Nei lisati totali cellulari non si evidenzia una glutationilazione proteica differenziale tra la linea *GLRX2* WT e la KO. **A)** Volcano plot relativo alla glutationilazione dei lisati totali non trattati *GLRX2* KO vs WT; $N=3$ **B)** Volcano plot relativo alla glutationilazione dei lisati totali trattati con H₂O₂ 100μm *GLRX2* KO vs WT. $N=3$. Le curve delimitano la soglia di significatività; l'analisi statistica è stata eseguita attraverso il two sample t-test con il software Perseus. **C)** PCA dei replicati biologici dei campioni non trattati. **D)** PCA dei replicati biologici dei campioni trattati con H₂O₂ 100μm.

non sia glutationilata, ma perché lo spettrometro ha identificato proteine più rappresentate in termini di abbondanza all'interno del campione. Nel caso specifico, dal confronto con il database Human Mitocarta 3.0, le proteine mitocondriali all'interno dei nostri lisati totali in condizioni basali rappresentano solo il 10% delle rilevate totali. Essendo *GLRX2* compartimentalizzata nel nucleo e nel mitocondrio, è plausibile ritenere che la mancanza di glutationilazione differenziale osservata potrebbe essere effettivamente dovuta alla maggiore abbondanza di proteine citosoliche, regolate peraltro da altri enzimi antiossidanti (tioredossine, glutaredossina 1, ecc).

L'analisi delle proteine glutationilate in seguito al trattamento con H₂O₂ ha individuato 3801 proteine glutationilate totali ma anche in questo caso non si è osservata una differenza significativa in termini di glutationilazione proteica tra la linea *GLRX2* WT e la KO (fig.19B), con una percentuale di proteine mitocondriali individuata pari all'11%. In entrambi gli

esperimenti sui lisati totali nell'analisi PCA i campioni creano dei cluster omogenei in base al genotipo, individuando due distinti gruppi (fig. 19C-D).

L'assenza di glutationilazione differenziale tra i campioni WT e KO in seguito a stress ossidativo potrebbe essere indice di una intensa glutationilazione da parte di entrambe le linee. Pur avendo utilizzato una concentrazione di H₂O₂ non letale per il modello, con la quale, in seguito a trattamento per 30 minuti, è stato possibile riscontrare il rescue del fenotipo da stress in termini di proliferazione in *live cell imaging* (Suppl.4), lo stress indotto potrebbe essere stato sufficiente a glutationilare indistintamente sia il proteoma WT che quello KO. In aggiunta, anche in questo caso dalla proteomica totale non è stato possibile ottenere un arricchimento soddisfacente di proteine mitocondriali glutationilate, probabilmente, come precedentemente accennato, a causa della maggiore abbondanza di proteine citosoliche all'interno dei campioni. Considerata la peculiare localizzazione della proteina nel nucleo e nel mitocondrio e dal momento che il focus delle nostre ricerche è trovare dei target coinvolti nel metabolismo mitocondriale – essendo il fenotipo oncocitario solitamente caratterizzato da deficit bioenergetico – abbiamo dunque arricchito la frazione mitocondriale nei nostri campioni prima di condurre l'*enrichment* delle proteine glutationilate. L'estrazione di mitocondri condotta per l'esperimento, ha permesso di incrementare la rilevazione di proteine mitocondriali all'interno di ogni campione al 15%. In seguito all'analisi spettrometrica, solo i campioni in cui è stato rilevato un numero di peptidi superiore a 3000 sono stati considerati per le analisi successive, escludendo quindi due campioni, rispettivamente un campione WT in condizioni basali ed un campione WT trattato, a causa del ridotto numero di proteine rilevate (fig. 20).

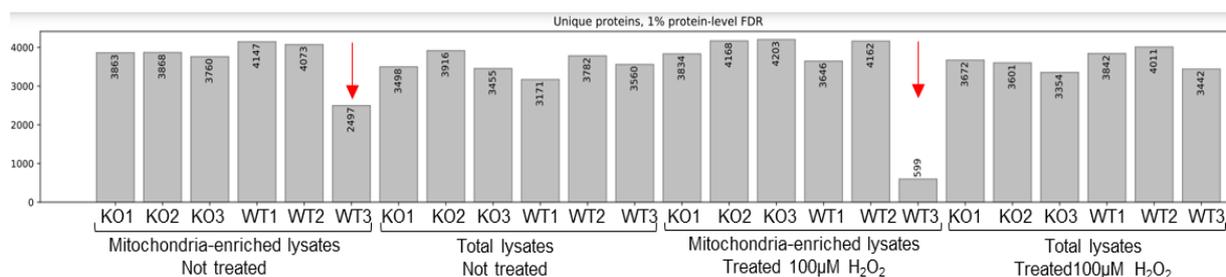


Figura 20. Numero di proteine uniche rilevate dallo spettrometro in ogni campione. Le frecce rosse indicano i campioni esclusi dall'analisi a causa del numero ridotto di proteine individuate dallo spettrometro.

Dall'*enrichment* delle proteine glutationilate dei campioni arricchiti di mitocondri in condizioni basali sono state ottenute 3816 proteine, delle quali 767 differenzialmente glutationilate tra la linea WT e la KO. Complessivamente, nella linea KO sono risultate 438 proteine significativamente più glutationilate, mentre nella linea WT 329 (fig.21A).

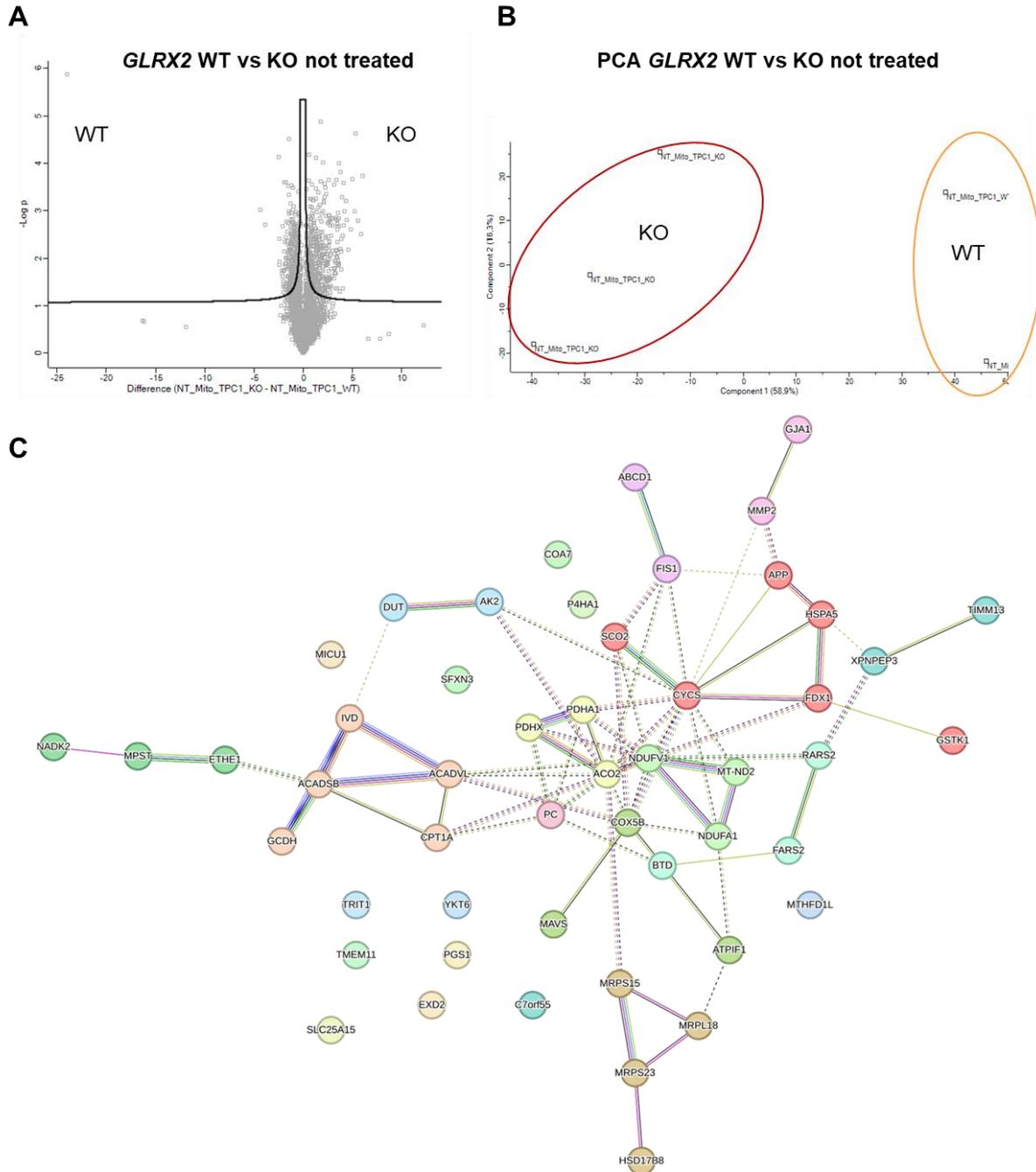


Figura 21. Valutazione della glutationilazione differenziale delle proteine mitocondriali. A) Volcano plot relativo alla glutationilazione dei lisati ottenuti dalla frazione mitocondriale, GLRX2 KO vs WT non trattati: N=3. Le curve delimitano la soglia di significatività; l'analisi statistica è stata eseguita attraverso il two sample t-test con il software Perseus B) PCA dei replicati biologici dei campioni mitocondriali non trattati. C) Analisi dei cluster delle proteine mitocondriali significativamente più glutationilate nei campioni KO mediante il software STRING. ; ponte rosso: fusione; ponte verde: vicinanza fisica; ponte blu: co-occorre; ponte viola: prove sperimentali; ponte giallo: interazione estratta da letteratura; ponte azzurro: riportata in database; ponte nero: coespressione

Considerato il gran numero di proteine individuate è stata successivamente condotta un'analisi sfruttando il tool online Enrichr per individuare in quali pathway molecolari le proteine significativamente glutationilate potessero essere coinvolte, essendoci anche proteine non a localizzazione mitocondriale: l'analisi ha rivelato che nella linea WT le proteine rilevate sono principalmente coinvolte nella mitosi e nella riparazione del DNA, mentre nella KO le proteine riscontrate sono implicate in molteplici pathway, tra cui la fosforilazione ossidativa e il metabolismo degli acidi grassi (Suppl.5).

Dal momento che il nostro focus è incentrato sulle proteine mitocondriali - per le possibili alterazioni metaboliche che potrebbero manifestarsi - ed avendo riscontrato la fosforilazione ossidativa come uno dei pathway a livello mitocondriale più coinvolti dalla glutationilazione nel modello KO, è stato condotto un filtraggio delle proteine significativamente glutationilate con localizzazione strettamente mitocondriale. Dal filtraggio condotto grazie al database online Gene Ontology sono risultate 51 proteine, inserite successivamente nel software STRING per valutare se formassero dei network. Dall'analisi è stato ottenuto il network rappresentato in figura 21C: i nodi rappresentano le 51 proteine individuate ed i ponti di collegamento indicano la presenza di interazioni sia funzionali che fisiche tra i nodi. Al centro del network si possono osservare diverse proteine coinvolte nel ciclo di Krebs come PDHA e PDHX - subunità del complesso della piruvato deidrogenasi - e ACO2, catalizzatore dell'isomerizzazione del citrato a isocitrato (2° step ciclo di Krebs) insieme a varie subunità dei complessi respiratori mitocondriali tra cui NDUFV1, NDUFA1 e MT-ND2 (CI) e COX5B (CIV), nonché il CYCS, il cui ruolo è quello di trasferire elettroni dal Citocromo b (CYB) al CIV e SCO2, fattore di assemblaggio dello stesso CIV. Parallelamente a queste sono state individuate anche altre proteine coinvolte ad esempio nei processi di traduzione mitocondriale (MRPL18, MRPS15 e MRPS23) e nella beta-ossidazione degli acidi grassi (ACADVL, ACADBS, IVD e GCDH) (fig. 21C).

In seguito al trattamento con H₂O₂ invece, anche nella frazione cellulare arricchita di mitocondri non sono state individuate proteine differenzialmente glutationilate tra le due linee oltre la soglia di significatività (fig.22A).

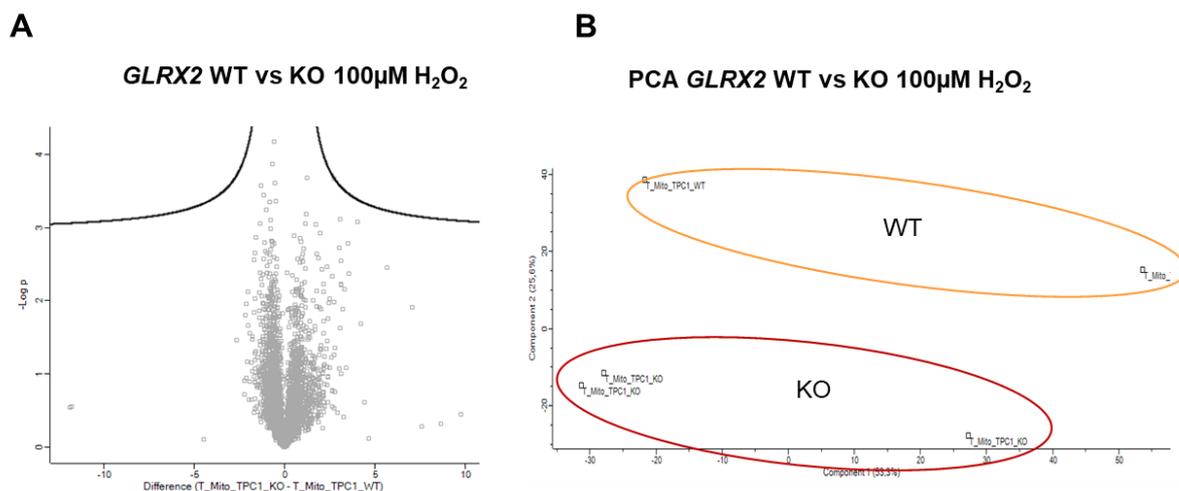


Figura 22. Lo stress ossidativo non determina glutationilazione differenziale tra linea GLRX2 WT e KO. A) Volcano plot relativo alla glutationilazione dei lisati ottenuti dalla frazione mitocondriale, GLRX2 KO vs WT trattati con H_2O_2 100 μ m. N=3. Le curve delimitano la soglia di significatività; l'analisi statistica è stata eseguita attraverso il two sample t-test con il software Perseus **B)** Principal component analysis dei replicati biologici dei campioni mitocondriali trattati con H_2O_2 100 μ m.

Anche in questo caso probabilmente il trattamento potrebbe aver determinato una forte glutationilazione in entrambe le linee indistintamente.

Nel complesso, quest'ultima analisi ha permesso di confermare l'ipotesi che la deplezione di GLRX2 possa alterare i livelli basali di glutationilazione di proteine implicate nel metabolismo mitocondriale in questo modello. L'analisi ha consentito infatti di individuare proteine che fanno parte sia del ciclo di Krebs che della OXPHOS la cui eventuale inibizione mediata dalla glutationilazione potrebbe replicare le disfunzioni mitocondriali spesso osservate in associazione al fenotipo oncocitario. Uno dei target individuati è il complesso della piruvato deidrogenasi (PDHc), associato alla membrana mitocondriale interna e deputato alla decarbossilazione riduttiva del piruvato ad Acetyl CoA formando nel processo anche NADH; entrambi i metaboliti rivestono un ruolo importantissimo nel metabolismo alimentando sia il ciclo di Krebs che la OXPHOS⁹⁴. Questo grande complesso multienzimatico del peso di 9,5 MDa è costituito da 4 differenti componenti presenti in molteplici copie (E1, E2 ed E3 ed E3BP). Nella linea KO sono risultate glutationilate sia la subunità E1 (PDHA1) che la E2E3BP (PDHX) costituente, insieme alla E2, il core del complesso. È stato precedentemente documentato da Mailloux ed il suo gruppo di ricerca che il PDHc è effettivamente un target di glutationilazione trattando il complesso isolato in due distinti esperimenti sia con diamide, un forte agente ossidante, che con GSSG; la valutazione dell'effetto della glutationilazione del PDHc riscontrata in entrambe le condizioni, ha rivelato una forte riduzione nella quantità di NADH e Acetyl-CoA prodotti dalla normale attività dell'enzima, bloccando il flusso di metaboliti verso il ciclo di Krebs e la ETC⁸². Anche l'Aconitasi è nota in letteratura per essere target di glutationilazione; in uno studio condotto su sinaptosomi intatti estratti da cavie e

sottoposti a basse dosi di H_2O_2 ($<50\mu M$) è stato osservato un blocco del sito attivo mediante legame con GSH e una conseguente inattivazione dell'enzima⁹⁵. In un altro studio è stato inoltre visto che la glutationilazione del sito attivo è inversamente proporzionale alla concentrazione di citrato. Gli autori suggeriscono quindi che una ridotta disponibilità del metabolita induca la glutationilazione dei residui di cisteina del sito attivo, per proteggere l'enzima dalla disattivazione irreversibile mediata dai ROS⁸¹; ciò potrebbe riflettere anche quanto accaduto nel nostro modello, in cui la ridotta disponibilità di citrato dettata a monte da una diminuzione dell'Acetyl CoA in ingresso nel ciclo di Krebs potrebbe aver indotto la glutationilazione dell'enzima.

Guardando invece alle proteine coinvolte nell'OXPPOS individuate nella linea KO, il CI è sicuramente il target più studiato nella glutationilazione proteica nei mitocondri. La glutationilazione del CI è regolata da GLRX2 e varia in risposta allo stato del pool GSH/GSSG in quanto all'ossidazione del pool di GSH corrisponde un'inibizione dell'enzima mediata dalla glutationilazione, laddove la riduzione del pool ha l'effetto opposto⁷². L'inibizione temporanea del CI da parte della glutationilazione è fondamentale per limitare la produzione di ROS da parte della ETC⁸². Tuttavia, è stato visto che una modificazione prolungata a causa della perdita di GLRX2 limita gravemente la produzione di ATP e induce stress ossidativo, contribuendo allo sviluppo di malattie cardiache e cataratta in topo⁹⁶. Anche la glutationilazione del CIV modula negativamente la sua attività, come dimostrato in uno studio su un modello murino *GLRX2* KO in cui è stata osservata una riduzione di circa il 50% dell'attività del complesso⁹⁶. L'effetto inibitorio globale esercitato sulla catena respiratoria, quindi, si sommerebbe agli squilibri già potenzialmente indotti nel ciclo di Krebs arricchendo il quadro di un deficit metabolico importante. In aggiunta a ciò, anche glutationilazione del comparto proteico deputato al metabolismo degli acidi grassi osservata nel modello KO potrebbe contribuire al danno bioenergetico già potenzialmente indotto dalla compromissione delle altre proteine elencate. In uno studio condotto su un modello murino con deplezione di GLRX2 mitocondriale è stato riscontrato un aumento del peso anche sotto un regime alimentare standard, un incremento della concentrazione di lipidi nel sangue, nonché l'acquisizione di un fenotipo simile alla steatosi epatica associata a disfunzione metabolica (MAFLD) ed una ridotta capacità di deposito del glicogeno⁹⁷. L'eventuale inibizione della β -ossidazione nei nostri modelli (attraverso la glutationilazione di ACADVL, ACADBS, IVD e GCDH), inoltre, potrebbe determinare una riduzione della quantità di Acetyl CoA prodotto a partire dagli acidi grassi - che avrebbe potuto rifornire ad esempio il ciclo di Krebs rallentato dalla glutationilazione del PDHc - nonché una riduzione degli equivalenti riducenti dati dalla formazione di FADH2 e

NADH da poter indirizzare verso la catena respiratoria. La glutationilazione del PDHc e dei complessi della catena respiratoria, se confermata anche nel modello coloretale, potrebbe inoltre suggerire uno shift verso un metabolismo più Warburg nelle cellule GLRX2 KO, preferendo la glicolisi alla fosforilazione ossidativa. Ciò potrebbe giustificare la maggiore crescita degli *xenograft* KO osservata nelle prime fasi della progressione tumorale, favoriti da un metabolismo più glicolitico, e potrebbe fornire una spiegazione per la manifestazione del fenotipo oncocitario osservato, avvenuta presumibilmente in seguito ad un *rewiring* metabolico indirizzato verso la fosforilazione ossidativa e alla compromissione di quest'ultima. Nel complesso i dati ottenuti con l'analisi del proteoma glutationilato hanno individuato nella linea KO una serie di target coinvolti nel metabolismo mitocondriale, permettendoci di confermare la prima parte della nostra ipotesi, avendo l'assenza di GLRX2 effettivamente determinato un'alterazione nella glutationilazione proteica di proteine coinvolte nel metabolismo. Per verificare se questa glutationilazione riscontrata sia in grado di determinare una disfunzione bioenergetica nel modello KO, costituendo l'innescò della trasformazione oncocitaria osservata nei pazienti e in parte degli *xenograft*, sono quindi stati allestiti degli esperimenti funzionali *in vitro*.

Il complesso della piruvatodeidrogenasi (PDHc) è glutationilato nelle cellule GLRX2 KO in seguito a stress ossidativo.

Individuati i target di glutationilazione con l'analisi di proteomica sul modello tiroideo, è stato condotto un esperimento per confermare il risultato ottenuto in entrambi i modelli, valutando quindi se i campioni KO presentassero una glutationilazione più accentuata delle proteine individuate, con particolare focus sulla ETC. Dalle quattro linee è stata arricchita la frazione mitocondriale sia in condizioni basali che in seguito a trattamento per 5min e 30min con 1 mM H₂O₂ per le TPC1 e 12 mM H₂O₂ per le HCT116 *ex vivo*. La scelta di introdurre nuovamente il trattamento è stata dettata dalla migliore rilevazione di questa modifica post-traduzionale in western blot in seguito a stress, osservata nei primi esperimenti di caratterizzazione. È stato quindi condotto un Western blot in condizioni native utilizzando l'anticorpo α -GSH parallelamente ad altri anticorpi diretti contro le varie subunità della catena respiratoria. La glutationilazione dei complessi della ETC riscontrata in proteomica non è stata confermata in nessuno dei nostri modelli KO con la tecnica utilizzata; è stato tuttavia riscontrato, in entrambi i modelli trattati per 30min con H₂O₂, un forte segnale di glutationilazione in corrispondenza di una banda ad alto peso molecolare, riconosciuta dall'anticorpo α -E2E3bp (E2E3 *binding*

protein) diretto contro uno degli elementi costituenti il PDHc precedentemente individuato come target di glutationilazione nell'esperimento di proteomica (PDHX) (fig. 23A-B).

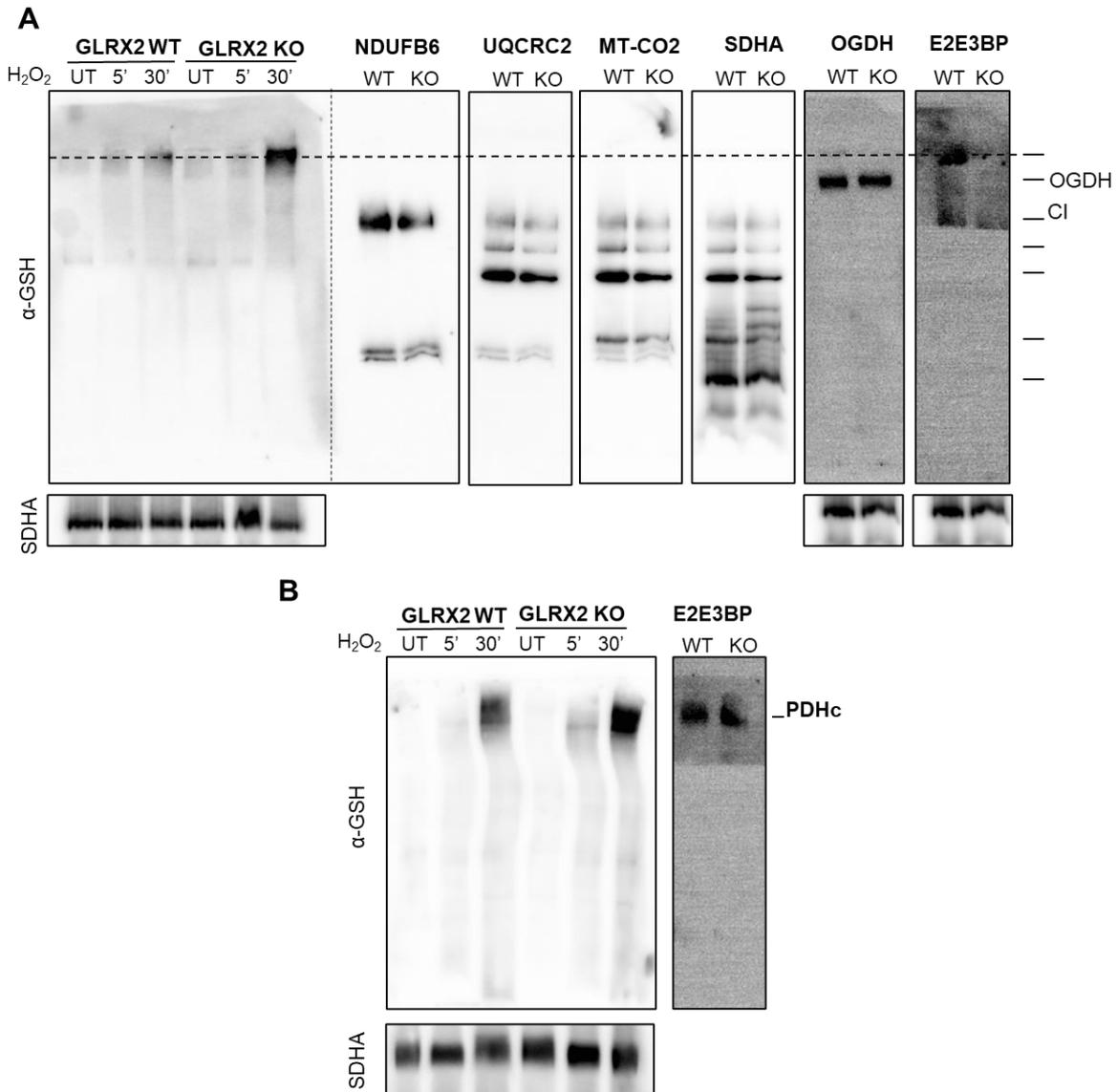


Figura 23. Il complesso della piruvato deidrogenasi è fortemente glutationilato in seguito a stress ossidativo.
A) Blue-native page delle frazioni mitocondriali delle linee TPC1 GLRX2 WT e KO. Membrana incubata con α -GSH, accanto porzione di membrana incubata con anticorpi che riconoscono varie subunità dei complessi della catena respiratoria insieme a α -OGDH e α -E2E3BP. α -SDHA impiegato come controllo di caricamento; N=3.
B) Blue-native page delle frazioni mitocondriali delle linee HCT116 ex vivo GLRX2 WT e KO: membrana incubata con α -GSH; accanto porzione di membrana incubata con anticorpo α -E2E3BP. α -SDHA impiegato come controllo di caricamento; N=3.

Nel contesto dei nostri modelli GLRX2 KO, la mancata deglutationilazione del PDHc, qualora risultasse nell'inibizione della sua attività, determinerebbe un rallentamento nel ciclo di Krebs e più a valle nella ETC. Per verificare una potenziale riduzione dell'attività della ETC, è stata eseguita la misurazione della respirazione cellulare nei modelli TPC1 e HCT116 ex vivo GLRX2 WT e KO. Questa viene misurata in termini di tasso di consumo dell'ossigeno molecolare

(Oxygen consumption rate = OCR), attraverso l'uso dello strumento *Seahorse* (fig. 24); il

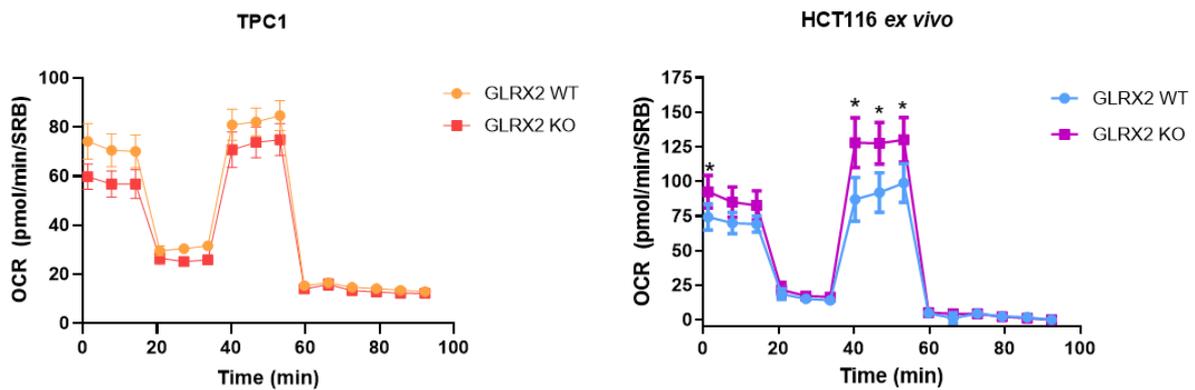


Figura 24. Profili del tasso di consumo dell'ossigeno (OCR) nelle linee TPC1 (sx) e HCT116 ex vivo (dx) seguendo il protocollo Mitostress del Seahorse. Dati espressi come media dei replicati per ogni tempo e normalizzati sull'assorbanza (SRB); N=3. Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

risultato dell'analisi non ha rivelato differenze significative nei profili OCR delle linee TPC1 WT e KO, sebbene nella linea KO si osservi una respirazione tendenzialmente più bassa rispetto alla linea WT. Nelle linee *ex vivo* si osserva invece un incremento significativo della respirazione basale e della massima capacità respiratoria nella linea KO rispetto alla WT. Per determinare se nei nostri modelli KO vi sia una disfunzione energetica innescata dalla glutationilazione del PDHc, in particolar modo in seguito a stress, è stata valutata la sintesi di ATP CI-dipendente con due diversi approcci (fig. 25A): il primo consiste nell'alimentare il ciclo di Krebs fornendo come substrato il piruvato, promuovendo la formazione di Acetyl CoA e NADH mediata dal PDHc, cui seguono tutte le reazioni del ciclo di Krebs e della ETC a valle necessarie per la sintesi di ATP; il secondo consiste nel fornire come substrato il glutammato, il quale viene convertito ad α -chetoglutarato, permettendo di alimentare direttamente il ciclo di Krebs, senza dover passare attraverso l'attività del PDHc. Nel modello tiroideo la sintesi di ATP misurata con il primo approccio è risultata ridotta nella linea *GLRX2* KO rispetto alla WT già in condizioni basali; in seguito al trattamento con 1mM H_2O_2 è stata osservata un'ulteriore riduzione significativa in entrambe le linee, particolarmente rilevante nella linea KO (fig. 25B). Nel modello di colon si è osservata una riduzione significativa della sintesi di ATP alimentata da piruvato sia nella linea *GLRX2* WT che nella KO, ma solo in seguito a trattamento con 12mM H_2O_2 (fig. 25C). Ripetendo il saggio in entrambi i modelli fornendo come substrato il

glutammato, la riduzione precedentemente riscontrata nella sintesi di ATP scompare, indipendentemente dal genotipo e dal trattamento (fig. 25D-E).

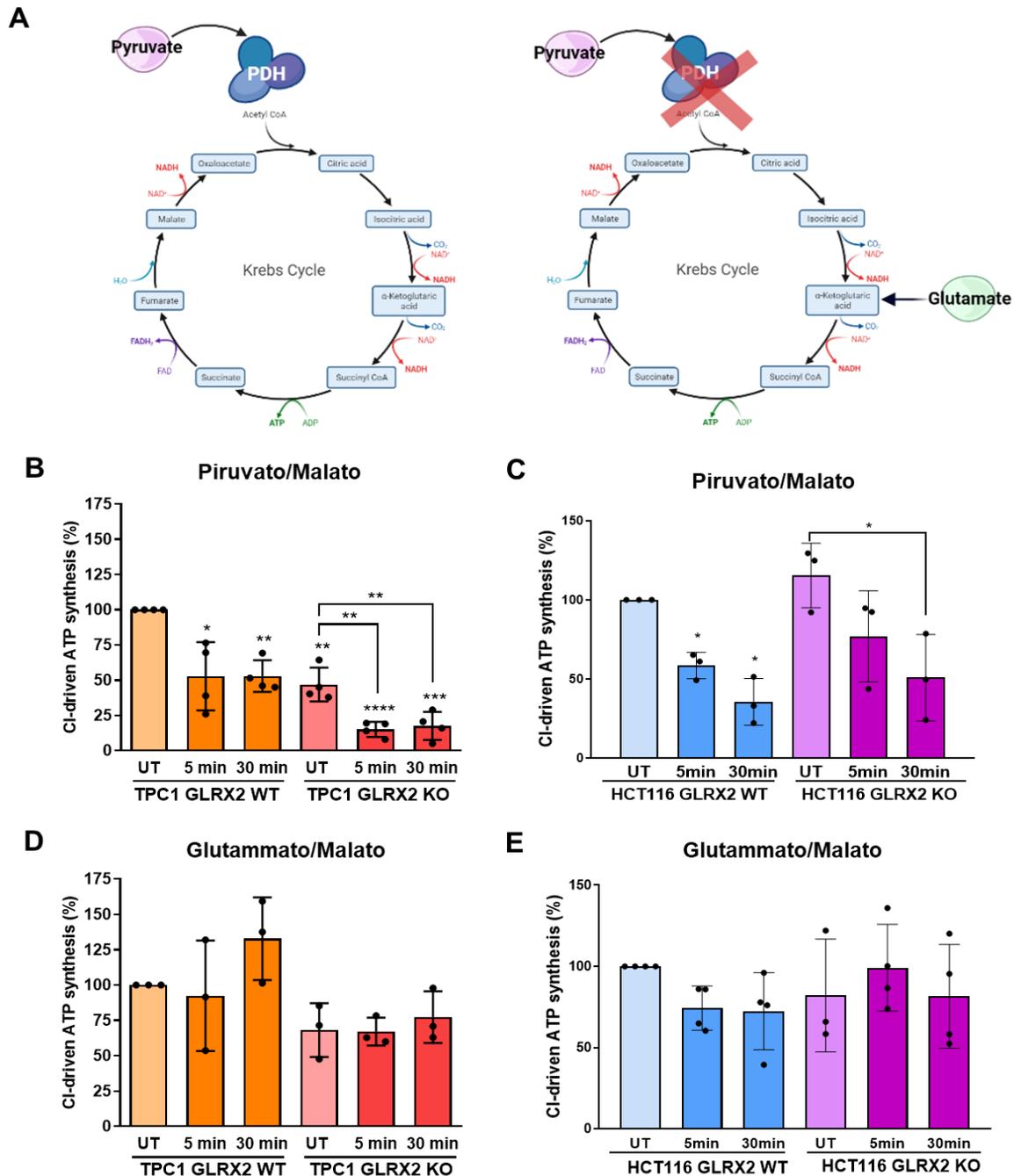


Figura 25. La glutationilazione del PDHc determina una riduzione della sintesi di ATP dipendente dal piruvato. **A)** Rappresentazione schematica dei due approcci impiegati per alimentare il ciclo di Krebs in dipendenza o meno dall'attività del PDHc. Sinistra: il piruvato viene trasformato in Acetyl CoA dal PDHc, in caso di disfunzione del complesso il ciclo di Krebs è rallentato dalla mancata formazione del metabolita. Destra: il glutammato somministrato viene trasformato in α -chetoglutarato alimentando il ciclo di Krebs più a valle e aggirando l'attività del PDHc. **B)** Sintesi di ATP CI-dipendente in seguito alla somministrazione di piruvato nelle TPC1 GLRX2 WT e KO non trattate e trattate con 1mM H₂O₂. N=4 **C)** Sintesi di ATP CI-dipendente in seguito alla somministrazione di piruvato nelle HCT116 ex vivo GLRX2 WT e KO non trattate e trattate con 12mM H₂O₂. N=3. **D)** Sintesi di ATP CI-dipendente in seguito alla somministrazione di glutammato nelle TPC1 GLRX2 WT e KO non trattate e trattate con 1mM H₂O₂. N=3. **E)** Sintesi di ATP CI-dipendente in seguito alla somministrazione di glutammato nelle HCT116 ex vivo GLRX2 WT e KO non trattate e trattate con 12mM H₂O₂. N=3. Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, p<0.05 (*); p<0.01 (**); p<0.001(***).

Dal momento che l'utilizzo del glutammato ha il solo scopo di aggirare l'attività del PDHc, il mancato effetto sulla sintesi di ATP, in particolare in seguito al trattamento, ci ha permesso di concludere che la riduzione della sintesi osservata somministrando piruvato non fosse in realtà imputabile ad una glutationilazione del CI o di altri complessi della catena respiratoria, bensì ad una disfunzione più a monte, che potrebbe coinvolgere proprio il PDHc.

Complessivamente i risultati ottenuti dal western blot sulle frazioni arricchite di mitocondri hanno confermato parte di quanto osservato nell'analisi di proteomica, avendo rilevato la glutationilazione nel PDHc - anche se solo in seguito a stress ossidativo - e hanno permesso di estendere quanto osservato nel modello tiroideo anche a quello di colon. La proteomica è ritenuta, al momento, la migliore tecnica di rilevazione della modifica post-traduzionale. Un potenziale approccio per migliorare la visualizzazione della glutationilazione in WB sia in condizioni basali che in seguito a stress potrebbe prevedere l'immunoprecipitazione del PDHc e degli altri target di interesse individuati con la proteomica per poi valutarne solo in seguito la glutationilazione.

Il ridotto tasso di sintesi di ATP a partire da piruvato osservato nelle TPC1 KO non trattate, suggerisce la presenza di una disfunzione probabilmente causata da un'alterazione della glutationilazione del PDHc, già in condizioni basali. L'induzione dello stress ossidativo ha poi esercitato un impatto deleterio sia nelle cellule WT che nelle KO, riducendo in entrambi i casi l'ATP prodotta in seguito a glutationilazione del PDHc; nella linea KO, tuttavia, l'effetto dello stress è risultato particolarmente accentuato, probabilmente perché sommatosi ad un deficit già presente in condizioni normali, determinando quindi il calo di ATP drammatico osservato. La valutazione del tasso di consumo dell'ossigeno nel modello di tiroide non ha evidenziato significative differenze tra la linea WT e la KO, il che potrebbe suggerire che la glutationilazione non inibisca i complessi della ETC in condizioni basali nel modello; tuttavia l'aver riscontrato con l'analisi di proteomica che il CI ed il CIV sono target di glutationilazione nella linea KO e osservando la tendenza generale di riduzione della respirazione nel profilo OCR, si potrebbe ipotizzare che una disfunzione anche nella ETC sia già presente ma che possa manifestarsi più severamente in una condizione di stress ossidativo.

Anche nel modello di carcinoma coloretale è stata osservata una inibizione dell'attività del PDHc mediata da glutationilazione, dimostrata dalla riduzione della sintesi di ATP alimentata da piruvato in seguito a stress. A differenza di quanto visto nel modello tiroideo però, il tasso di sintesi di ATP nella linea di colon *GLRX2* KO in condizioni basali non è dimezzato rispetto a quello della linea WT; in aggiunta a ciò, guardando i profili di OCR di entrambe le linee è stata riscontrata una respirazione massimale (indicante la massima capacità di lavoro dei

complessi nel consumare ossigeno e pompare protoni nello spazio intermembrana) significativamente più alta nel KO. Tale discrepanza potrebbe essere giustificata da un aumento della massa mitocondriale nella linea KO. Un aumento della biogenesi mitocondriale è stato già riportato in studi sui tumori oncocitari in risposta ad un deficit energetico determinato da mutazioni mitocondriali⁵, ed è stato proposto come uno dei possibili meccanismi responsabili dell'accumulo dei mitocondri nei tumori oncocitari, innescato dall'esigenza di sopperire ad un difetto metabolico. La riduzione del tasso di produzione di ATP dovuto alla glutationilazione del PDHc potrebbe rappresentare l'innescò per l'attuazione della stessa strategia di compensazione. In un esperimento precedentemente effettuato di valutazione della morfologia mitocondriale in immunofluorescenza condotto sulle linee TPC1 è stato riscontrato nella linea KO un aumento significativo del rapporto area del reticolo/nuclei, indicativo di un aumento della quantità di mitocondri per cellula (fig. 26); ciò potrebbe anche spiegare perché, pur essendoci una potenziale alterazione dell'attività dei complessi predetta dagli esperimenti di proteomica, la respirazione (OCR) della linea KO non sia significativamente più bassa rispetto alla WT.

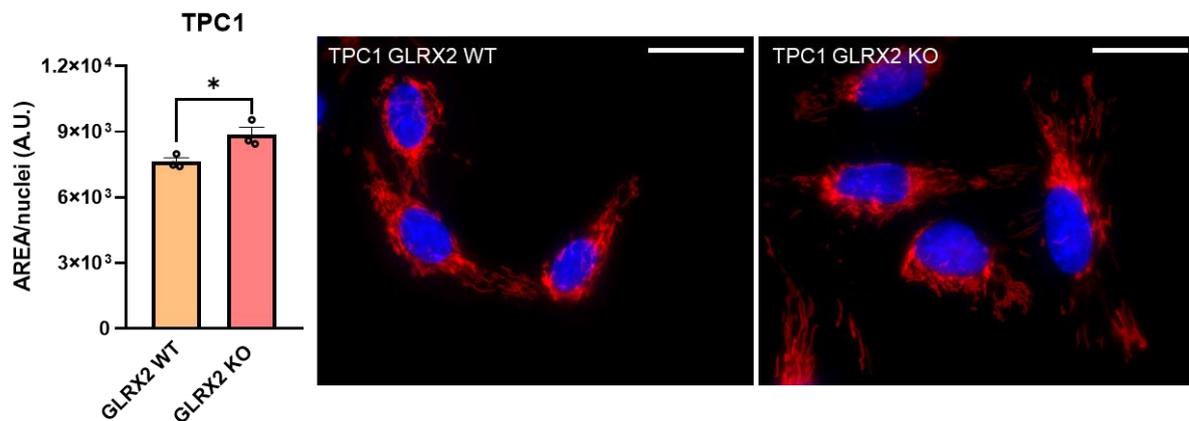


Figura 26. Nella linea *GLRX2 KO* si osserva un incremento della massa mitocondriale. Le cellule sono state incubate con la sonda fluorescente Mitotracker Red per la visualizzazione del reticolo mitocondriale e con Hoechst (in blu) per marcare i nuclei. Le analisi sono state effettuate con il software Image J Scale normalizzando l'area del reticolo sul numero di cellule (nuclei); $N=3$. Scale bar $10\mu\text{m}$. Per l'analisi statistica è stato usato l'unpaired T-test, $p<0.05$ (*); $p<0.01$ (**); $p<0.001$ (***)

Un incremento della massa mitocondriale come quello osservato nella linea tiroidea KO potrebbe essere stato ulteriormente promosso nella linea coloretale dal microambiente *in vivo*, dove il difetto metabolico dato dalla glutationilazione potrebbe essere stato accentuato da una richiesta energetica più elevata e da un ambiente naturalmente più pro-ossidante. La quantificazione ed analisi morfologica del reticolo mitocondriale anche nelle linee di colon *ex vivo*, parallelamente alla valutazione dell'espressione delle proteine implicate nella biogenesi mitocondriale in entrambi i modelli aiuteranno a chiarire questo aspetto.

La glutationilazione proteica è una modificazione post traduzionale particolarmente favorita dal microambiente mitocondriale, in cui la concentrazione di GSH oscilla tra 1 e 5mM mentre quella di GSSG si attesta intorno allo 0,01mM; ciò, unito alla grande quantità di tioli proteici esposti nella matrice⁹⁸ evidenzia come il pool di glutatione rappresenti il principale buffer redox mitocondriale. In questo contesto la deglutationilazione proteica mediata da GLRX2, rappresenta un tassello fondamentale dell'interazione tra il pool GSH/GSSG e i tioli proteici mitocondriali sia per l'impatto che esercita sulla regolazione delle proteine target, sia per il contributo fornito al mantenimento di un pool ridotto⁴⁶. Il ruolo centrale rivestito dalla proteina è stato anche osservato in uno studio condotto su topi *GLRX2* KO in cui è stato valutato se la sua mancanza fosse bilanciata da una sovra espressione compensatoria di altri enzimi redox in grado di regolare i tioli proteici, sia nel compartimento mitocondriale che in quello citosolico; dalle analisi condotte è emerso che sia l'espressione che l'attività enzimatica delle proteine redox indagate nello studio era paragonabile a quella dei topi di controllo in entrambi i compartimenti cellulari, suggerendo che pertanto non fossero attivati meccanismi di compensazione redox ed evidenziando la peculiare funzione di GLRX2 nella fisiologia cellulare⁹⁷. Dal momento che la glutationilazione reversibile è in grado di modulare una serie di proteine e cascate di segnalazione che svolgono un ruolo importante nello sviluppo, nella progressione e nella metastasi del tumore, potrebbe rappresentare un bersaglio interessante per la progettazione di farmaci. Una delle ragioni principali del fallimento del trattamento del cancro e di recidiva nei pazienti è la resistenza acquisita o intrinseca alle terapie antitumorali. Un fattore responsabile della resistenza ai farmaci è la sovraespressione di enzimi antiossidanti, tra cui quelli preposti alla sintesi di GSH ed al suo utilizzo. Recenti studi sullo sviluppo di farmaci antitumorali che mirano al metabolismo del GSH hanno dimostrato che, promuovendo l'ossidazione dei tioli a livello locale, l'ambiente tumorale può essere reso tossico per le cellule maligne⁹⁹. Un approccio farmacologico promettente prevede la sintesi di profarmaci che vengono attivati solo nel tessuto tumorale, minimizzando la tossicità nei tessuti circostanti, come ad esempio il NOV-002, costituito da un GSSG stabilizzato farmacologicamente, impiegato per promuovere la glutationilazione proteica¹⁰⁰. NOV-002 è stato testato in combinazione con carboplatino/paclitaxel e ha mostrato risultati promettenti negli studi clinici di fase I e II su carcinoma polmonare non a piccole cellule, pur non riuscendo ad aumentare l'aspettativa di vita in pazienti in stadio avanzato in uno studio di fase III^{100,101}. L'aumento stesso del GSSG è stato proposto come possibile strategia anticancro in quanto il suo accumulo attiverebbe meccanismi di morte cellulare¹⁰². Infine, un ulteriore approccio impiegato consiste nel ridurre i livelli di GSH diminuendo la disponibilità dei suoi precursori, come dimostrato

dall'inibizione farmacologica dell'antiporto glutammato/cistina, il cui effetto si manifesta riducendo la quantità di cistina e di conseguenza di GSH¹⁰³. In generale, bersagliare il GSH e la glutathionilazione potrebbe rappresentare dunque un'ottima strategia terapeutica combinata, offrendo nuove prospettive per lo sviluppo di farmaci in grado di ostacolare la progressione tumorale.

Conclusioni

La ricerca del determinante genetico responsabile della trasformazione oncocitaria dei tumori della famiglia affetta da HPT-JT ha permesso di individuare e studiare *GLRX2* come gene candidato in grado di modulare il fenotipo tumorale. Il *knock-out* della proteina nei nostri modelli ha determinato un'alterazione della glutationilazione proteica a livello mitocondriale, in particolar modo del PDHc, determinando un significativo deficit bioenergetico. In aggiunta a ciò, la glutationilazione riscontrata in altri target metabolici quali l'ACN, il CI ed il CIV suggerisce che vi possano essere ulteriori disfunzioni più a valle e che questo quadro possa essere accentuato in una condizione di elevata richiesta energetica come quella che si potrebbe avere *in vivo*. L'impatto che le disfunzioni correlate all'assenza di *GLRX2* possono esercitare sul metabolismo potrebbe pertanto mimare quanto succede negli oncocitomi, in cui mutazioni disassemblanti determinano una disfunzione energetica tale da impedire al tumore di adattarsi ai continui cambiamenti metabolici necessari al suo accrescimento. In accordo con la nostra ipotesi, la glutationilazione persistente del PDHc – parallelamente a quella riscontrata anche negli altri target- potrebbe determinare un rallentamento nella bioenergetica mitocondriale, inducendo una segnalazione retrograda al nucleo volta a stimolare una biogenesi mitocondriale compensatoria. L'intensa attività di replicazione dell'mtDNA in sinergia con il ridotto utilizzo dell'OXPPOS, non farebbe altro che promuovere la spontanea insorgenza e selezione di mutazioni nell'mtDNA, che accumulandosi apporterebbero ulteriori difetti alla funzionalità mitocondriale in un meccanismo a cortocircuito e risultando quindi nella trasformazione oncocitaria (fig.27).

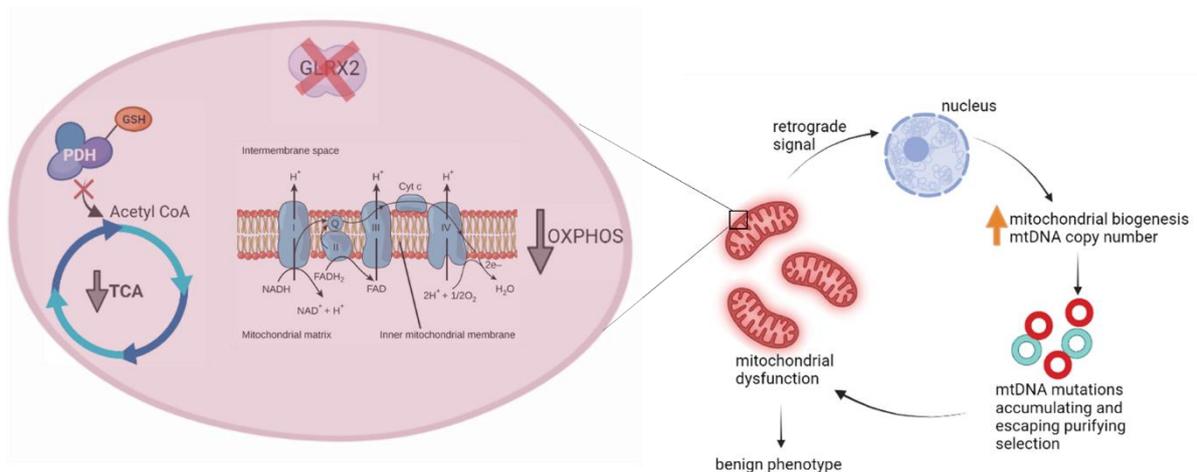


Figura 27. Meccanismo proposto per spiegare la relazione tra l'assenza di *GLRX2* e l'acquisizione del fenotipo oncocitario osservato nei tumori dei pazienti HPT-JT.

Questo lavoro offre dunque uno spunto di riflessione sull'importanza della ricerca di geni modificatori del fenotipo tumorale, per individuare nuovi possibili target da includere nella terapia combinata, in grado di promuovere il rallentamento della progressione tumorale consentendo di allargare la finestra temporale d'intervento.

Referenze

1. Itagaki H, Yamamoto T, Hiroi A, et al. Synchronous and bilateral oncocytic carcinoma of the breast: A case report and review of the literature. *Oncol Lett.* 2017;13(3):1714-1718. doi:10.3892/ol.2017.5610
2. Burrah R, Kini U, Correa M, Srirangapatna S. Pulmonary oncocytoma: a rare case. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2006;14(6):e113-114. doi:10.1177/021849230601400628
3. Kajiwara H, Kumaki N, Hirabayashi K, et al. A case of oncocytic carcinoma of the endometrium. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;279(5):733-738. doi:10.1007/s00404-008-0783-4
4. Gasparre G, Romeo G, Rugolo M, Porcelli AM. Learning from oncocytic tumors: Why choose inefficient mitochondria? *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2011;1807(6):633-642. doi:10.1016/j.bbabi.2010.08.006
5. Savagner F, Franc B, Guyetant S, Rodien P, Reynier P, Malthiery Y. Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):4920-4925. doi:10.1210/jcem.86.10.7894
6. Gasparre G, Porcelli AM, Bonora E, et al. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(21):9001-9006. doi:10.1073/pnas.0703056104
7. Gasparre G, Hervouet E, de Laplanche E, et al. Clonal expansion of mutated mitochondrial DNA is associated with tumor formation and complex I deficiency in the benign renal oncocytoma. *Hum Mol Genet.* 2008;17(7):986-995. doi:10.1093/hmg/ddm371
8. Mayr JA, Meierhofer D, Zimmermann F, et al. Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocytoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(8):2270-2275. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4131
9. Costa-Guda J, Tokura T, Roth SI, Arnold A. Mitochondrial DNA mutations in oxyphilic and chief cell parathyroid adenomas. *BMC Endocr Disord.* 2007;7(1):8. doi:10.1186/1472-6823-7-8
10. Porcelli AM, Ghelli A, Ceccarelli C, et al. The genetic and metabolic signature of oncocytic transformation implicates HIF1alpha destabilization. *Hum Mol Genet.* 2010;19(6):1019-1032. doi:10.1093/hmg/ddp566
11. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):103-123. doi:10.1016/s0005-2728(98)00161-3
12. Gilkerson R, Bravo L, Garcia I, et al. The Mitochondrial Nucleoid: Integrating Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5):a011080. doi:10.1101/cshperspect.a011080
13. Chan SSL, Copeland WC. DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: Understanding the consequence of POLG mutations. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2009;1787(5):312-319. doi:10.1016/j.bbabi.2008.10.007

14. Partridge MA, Huang SXL, Kibriya MG, Ahsan H, Davidson MM, Hei TK. Environmental mutagens induced transversions but not transitions in regulatory region of mitochondrial DNA. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(5):301-304. doi:10.1080/15287390802526381
15. Gasparre G, Kurelac I, Capristo M, et al. A Mutation Threshold Distinguishes the Antitumorigenic Effects of the Mitochondrial Gene MTND1, an Oncojanus Function. *Cancer Res*. 2011;71(19):6220-6229. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1042
16. Evangelisti C, de Biase D, Kurelac I, et al. A mutation screening of oncogenes, tumor suppressor gene TP53 and nuclear encoded mitochondrial complex I genes in oncocytic thyroid tumors. *BMC Cancer*. 2015;15(1):157. doi:10.1186/s12885-015-1122-3
17. De Luise M, Girolimetti G, Okere B, Porcelli AM, Kurelac I, Gasparre G. Molecular and metabolic features of oncocytomas: Seeking the blueprints of indolent cancers. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2017;1858(8):591-601. doi:10.1016/j.bbabi.2017.01.009
18. Nunes SC. Tumor Microenvironment – Selective Pressures Boosting Cancer Progression. In: Serpa J, ed. *Tumor Microenvironment: The Main Driver of Metabolic Adaptation*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2020:35-49. doi:10.1007/978-3-030-34025-4_2
19. Pereira L, Soares P, Máximo V, Samuels DC. Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncocytic phenotype: pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors. *BMC Cancer*. 2012;12:53. doi:10.1186/1471-2407-12-53
20. An inherited mitochondrial DNA disruptive mutation shifts to homoplasmy in oncocytic tumor cells - PubMed. Accessed October 11, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19086058/>
21. Katoh, R, Harach HR, Williams ED. Solitary, multiple, and familial oxyphil tumours of the thyroid gland. *J Pathol*. 1998;186(3):292-299. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<292::AID-PATH190>3.0.CO;2-Y
22. Beckner ME, Heffess CS, Oertel JE. Oxyphilic papillary thyroid carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 1995;103(3):280-287. doi:10.1093/ajcp/103.3.280
23. Nagamachi Y, Nakamura T, Yamada T. Hürthle cell adenoma of the thyroid in identical twins with 13 year follow-up. *Jpn J Surg*. 1973;3(4):212-217. doi:10.1007/BF02468775
24. Canzian F, Amati P, Harach HR, et al. A Gene Predisposing to Familial Thyroid Tumors with Cell Oxyphilia Maps to Chromosome 19p13.2. *Am J Hum Genet*. 1998;63(6):1743-1748. doi:10.1086/302164
25. Bevan S, Pal T, Greenberg CR, et al. A Comprehensive Analysis of MNG1, TCO1, fPTC, PTEN, TSHR, and TRKA in Familial Nonmedullary Thyroid Cancer: Confirmation of Linkage to TCO1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3701-3704. doi:10.1210/jcem.86.8.7725

26. McKay JD, Thompson D, Lesueur F, et al. Evidence for interaction between the TCO and NMTC1 loci in familial non-medullary thyroid cancer. *J Med Genet.* 2004;41(6):407-412. doi:10.1136/jmg.2003.017350
27. Bonora E, Evangelisti C, Bonichon F, Tallini G, Romeo G. Novel germline variants identified in the inner mitochondrial membrane transporter TIMM44 and their role in predisposition to oncocytic thyroid carcinomas. *Br J Cancer.* 2006;95(11):1529-1536. doi:10.1038/sj.bjc.6603455
28. Máximo V, Botelho T, Capela J, et al. Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death, is linked to mitochondrion-rich (Hürthle cell) tumours of the thyroid. *Br J Cancer.* 2005;92(10):1892-1898. doi:10.1038/sj.bjc.6602547
29. Harach HR, Soubeyran I, Brown A, Bonneau D, Longy M. Thyroid pathologic findings in patients with Cowden disease. *Ann Diagn Pathol.* 1999;3(6):331-340. doi:10.1016/S1092-9134(99)80011-2
30. Toro JR, Glenn G, Duray P, et al. Birt-Hogg-Dubé Syndrome: A Novel Marker of Kidney Neoplasia. *Arch Dermatol.* 1999;135(10):1195-1202. doi:10.1001/archderm.135.10.1195
31. Pradella LM, Lang M, Kurelac I, et al. Where Birt-Hogg-Dubé meets Cowden Syndrome: mirrored genetic defects in two cases of syndromic oncocytic tumours. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(10):1169-1172. doi:10.1038/ejhg.2013.8
32. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature.* 2007;450(7170):736-740. doi:10.1038/nature06322
33. Kürschner G, Zhang Q, Clima R, et al. Renal oncocyoma characterized by the defective complex I of the respiratory chain boosts the synthesis of the ROS scavenger glutathione. *Oncotarget.* 2017;8(62):105882-105904. doi:10.18632/oncotarget.22413
34. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* 1988;263(33):17205-17208.
35. Marí M, de Gregorio E, de Dios C, et al. Mitochondrial Glutathione: Recent Insights and Role in Disease. *Antioxidants.* 2020;9(10):909. doi:10.3390/antiox9100909
36. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules.* 2020;10(10):1429. doi:10.3390/biom10101429
37. Zhang J, Ye ZW, Singh S, Townsend DM, Tew KD. An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2018;120:204-216. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.038
38. Kong H, Chandel NS. Regulation of redox balance in cancer and T cells. *J Biol Chem.* 2018;293(20):7499-7507. doi:10.1074/jbc.TM117.000257

39. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12):931-947. doi:10.1038/nrd4002
40. Silva MM, Rocha CRR, Kinker GS, Pelegrini AL, Menck CFM. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):17639. doi:10.1038/s41598-019-54065-6
41. Velu CS, Niture SK, Doneanu CE, Pattabiraman N, Srivenugopal KS. Human p53 is Inhibited by Glutathionylation of Cysteines Present in the Proximal DNA-Binding Domain During Oxidative Stress. *Biochemistry.* 2007;46(26):7765-7780. doi:10.1021/bi700425y
42. Jeon D, Park HJ, Kim HS. Protein S-glutathionylation induced by hypoxia increases hypoxia-inducible factor-1 α in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495(1):212-216. doi:10.1016/j.bbrc.2017.11.018
43. Lillig CH, Berndt C, Vergnolle O, et al. Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(23):8168-8173. doi:10.1073/pnas.0500735102
44. Lillig CH, Lönn ME, Enoksson M, Fernandes AP, Holmgren A. Short interfering RNA-mediated silencing of glutaredoxin 2 increases the sensitivity of HeLa cells toward doxorubicin and phenylarsine oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(36):13227-13232. doi:10.1073/pnas.0401896101
45. Zhang H, Du Y, Zhang X, Lu J, Holmgren A. Glutaredoxin 2 Reduces Both Thioredoxin 2 and Thioredoxin 1 and Protects Cells from Apoptosis Induced by Auranofin and 4-Hydroxynonenal. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(5):669-681. doi:10.1089/ars.2013.5499
46. Mailloux RJ, McBride SL, Harper ME. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(12):592-602. doi:10.1016/j.tibs.2013.09.001
47. Rodrigo JP, Hernandez-Prera JC, Randolph GW, et al. Parathyroid cancer: An update. *Cancer Treat Rev.* 2020;86:102012. doi:10.1016/j.ctrv.2020.102012
48. Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, et al. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat Genet.* 2002;32(4):676-680. doi:10.1038/ng1048
49. Bricaire L, Odou MF, Cardot-Bauters C, et al. Frequent large germline HRPT2 deletions in a French National cohort of patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E403-408. doi:10.1210/jc.2012-2789
50. Betz JL, Chang M, Washburn TM, Porter SE, Mueller CL, Jaehning JA. Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol Genet Genomics MGG.* 2002;268(2):272-285. doi:10.1007/s00438-002-0752-8
51. Yang YJ, Han JW, Youn HD, Cho EJ. The tumor suppressor, parafibromin, mediates histone H3 K9 methylation for cyclin D1 repression. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(2):382-390. doi:10.1093/nar/gkp991

52. Newey PJ, Bowl MR, Cranston T, Thakker RV. Cell division cycle protein 73 homolog (CDC73) mutations in the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome (HPT-JT) and parathyroid tumors. *Hum Mutat.* 2010;31(3):295-307. doi:10.1002/humu.21188
53. Bradley KJ, Hobbs MR, Buley ID, et al. Uterine tumours are a phenotypic manifestation of the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *J Intern Med.* 2005;257(1):18-26. doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01421.x
54. Dinnen JS, Greenwood RH, Jones JH, Walker DA, Williams ED. Parathyroid carcinoma in familial hyperparathyroidism. *J Clin Pathol.* 1977;30(10):966-975.
55. Teh BT, Farnebo F, Kristoffersson U, et al. Autosomal dominant primary hyperparathyroidism and jaw tumor syndrome associated with renal hamartomas and cystic kidney disease: linkage to 1q21-q32 and loss of the wild type allele in renal hamartomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(12):4204-4211. doi:10.1210/jcem.81.12.8954016
56. Teh BT, Farnebo F, Twigg S, et al. Familial isolated hyperparathyroidism maps to the hyperparathyroidism-jaw tumor locus in 1q21-q32 in a subset of families. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):2114-2120. doi:10.1210/jcem.83.6.4896
57. De Luise M, Iommarini L, Marchio L, et al. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutation Load Inversely Correlates with Malignant Features in Familial Oncocytic Parathyroid Tumors Associated with Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome. *Cells.* 2021;10(11):2920. doi:10.3390/cells10112920
58. Iommarini L, Kurelac I, Capristo M, et al. Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Hum Mol Genet.* 2014;23(6):1453-1466. doi:10.1093/hmg/ddt533
59. Pippucci T, Licchetta L, Baldassari S, et al. Contribution of ultrarare variants in mTOR pathway genes to sporadic focal epilepsies. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(3):475-485. doi:10.1002/acn3.722
60. Ambrosini-Spaltro A, Salvi F, Betts CM, et al. Oncocytic modifications in rectal adenocarcinomas after radio and chemotherapy. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2006;448(4):442-448. doi:10.1007/s00428-005-0137-6
61. Calabrese C, Simone D, Diroma MA, et al. MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing. *Bioinformatics.* 2014;30(21):3115-3117. doi:10.1093/bioinformatics/btu483
62. Su D, Gaffrey MJ, Guo J, et al. Proteomic Identification and Quantification of S-glutathionylation in Mouse Macrophages Using Resin-Assisted Enrichment and Isobaric Labeling. *Free Radic Biol Med.* 2014;67:460-470. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.004
63. Yang H, Robinson PN, Wang K. Phenolyzer: phenotype-based prioritization of candidate genes for human diseases. *Nat Methods.* 2015;12(9):841-843. doi:10.1038/nmeth.3484
64. Liu W. SEPT4 is regulated by the Notch signaling pathway. *Mol Biol Rep.* 2012;39(4):4401-4409. doi:10.1007/s11033-011-1228-x

65. García-Fernández M, Kissel H, Brown S, et al. Sept4/ARTS is required for stem cell apoptosis and tumor suppression. *Genes Dev.* 2010;24(20):2282-2293. doi:10.1101/gad.1970110
66. Elhasid R, Sahar D, Merling A, et al. Mitochondrial pro-apoptotic ARTS protein is lost in the majority of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene.* 2004;23(32):5468-5475. doi:10.1038/sj.onc.1207725
67. Yu MJ, Zhao N, Shen H, Wang H. Long Noncoding RNA MRPL39 Inhibits Gastric Cancer Proliferation and Progression by Directly Targeting miR-130. *Genet Test Mol Biomark.* 2018;22(11):656-663. doi:10.1089/gtmb.2018.0151
68. Gasparre G, Bonora E, Tallini G, Romeo G. Molecular features of thyroid oncocyctic tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;321(1):67-76. doi:10.1016/j.mce.2010.02.022
69. Karunakaran S, Saeed U, Ramakrishnan S, Koumar RC, Ravindranath V. Constitutive expression and functional characterization of mitochondrial glutaredoxin (Grx2) in mouse and human brain. *Brain Res.* 2007;1185:8-17. doi:10.1016/j.brainres.2007.09.019
70. Mailloux RJ, Willmore WG. S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:68. doi:10.3389/fcell.2014.00068
71. Mailloux RJ, Xuan JY, McBride S, et al. Glutaredoxin-2 is required to control oxidative phosphorylation in cardiac muscle by mediating deglutathionylation reactions. *J Biol Chem.* 2014;289(21):14812-14828. doi:10.1074/jbc.M114.550574
72. Beer SM, Taylor ER, Brown SE, et al. Glutaredoxin 2 Catalyzes the Reversible Oxidation and Glutathionylation of Mitochondrial Membrane Thiol Proteins: IMPLICATIONS FOR MITOCHONDRIAL REDOX REGULATION AND ANTIOXIDANT DEFENSE*. *J Biol Chem.* 2004;279(46):47939-47951. doi:10.1074/jbc.M408011200
73. Markovic J, García-Gimenez JL, Gimeno A, Viña J, Pallardó FV. Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radic Res.* 2010;44(7):721-733. doi:10.3109/10715762.2010.485989
74. Agarwal SK, Schröck E, Kester MB, et al. Comparative genomic hybridization analysis of human parathyroid tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998;106(1):30-36. doi:10.1016/s0165-4608(98)00049-1
75. Kytölä S, Farnebo F, Obara T, et al. Patterns of Chromosomal Imbalances in Parathyroid Carcinomas. *Am J Pathol.* 2000;157(2):579-586.
76. Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet.* 2017;136(9):1093-1111. doi:10.1007/s00439-017-1809-4
77. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990;265(14):7709-7712.
78. Sengupta R, Coppo L, Mishra P, Holmgren A. Glutathione-glutaredoxin is an efficient electron donor system for mammalian p53R2-R1-dependent ribonucleotide reductase. *J Biol Chem.* 2019;294(34):12708-12716. doi:10.1074/jbc.RA119.008752

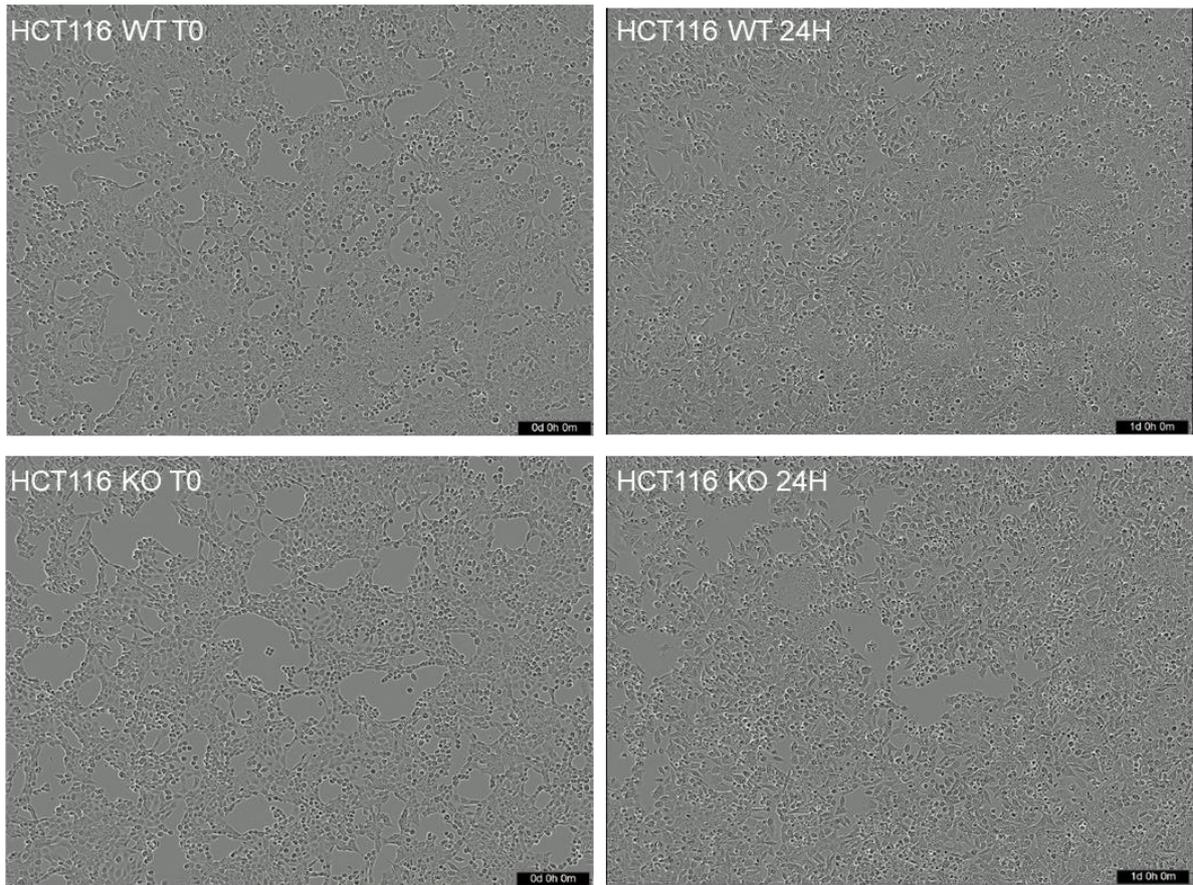
79. Wu H, Lin L, Giblin F, Ho YS, Lou MF. Glutaredoxin 2 knockout increases sensitivity to oxidative stress in mouse lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(11):2108-2117. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.011
80. Garcia J, Han D, Sancheti H, Yap LP, Kaplowitz N, Cadenas E. Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J Biol Chem.* 2010;285(51):39646-39654. doi:10.1074/jbc.M110.164160
81. Han D, Canali R, Garcia J, Aguilera R, Gallaher TK, Cadenas E. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry.* 2005;44(36):11986-11996. doi:10.1021/bi0509393
82. O'Brien M, Chalker J, Slade L, Gardiner D, Mailloux RJ. Protein S-glutathionylation alters superoxide/hydrogen peroxide emission from pyruvate dehydrogenase complex. *Free Radic Biol Med.* 2017;106:302-314. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.046
83. McLain AL, Cormier PJ, Kinter M, Szweda LI. Glutathionylation of α -ketoglutarate dehydrogenase: the chemical nature and relative susceptibility of the cofactor lipoic acid to modification. *Free Radic Biol Med.* 2013;61:161-169. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.020
84. Chen YR, Chen CL, Pfeiffer DR, Zweier JL. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J Biol Chem.* 2007;282(45):32640-32654. doi:10.1074/jbc.M702294200
85. Amante G, Mei Goh Y, Andrews H. A case report of metastatic renal oncocytoma. *New Horiz Clin Case Rep.* 2017;2:25-26. doi:10.1016/j.nhccr.2017.10.014
86. Dalle-Donne I, Giustarini D, Rossi R, Colombo R, Milzani A. Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(1):23-32. doi:10.1016/s0891-5849(02)01182-6
87. Vatrinet R, Iommarini L, Kurelac I, De Luise M, Gasparre G, Porcelli AM. Targeting respiratory complex I to prevent the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;63:41-45. doi:10.1016/j.biocel.2015.01.017
88. Ye J, Qi L, Chen K, et al. Metformin induces TPC-1 cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress-associated pathways in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2019;55(1):331-339. doi:10.3892/ijo.2019.4820
89. Kimberland ML, Hou W, Alfonso-Pecchio A, et al. Strategies for controlling CRISPR/Cas9 off-target effects and biological variations in mammalian genome editing experiments. *J Biotechnol.* 2018;284:91-101. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.08.007
90. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2015;4:e264. doi:10.1038/mtna.2015.37
91. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):437-447. doi:10.1038/nrc1367

92. Karsch-Bluman A, Feiglin A, Arbib E, et al. Tissue necrosis and its role in cancer progression. *Oncogene*. 2019;38(11):1920-1935. doi:10.1038/s41388-018-0555-y
93. Gao XH, Bedhomme M, Veyel D, Zaffagnini M, Lemaire SD. Methods for Analysis of Protein Glutathionylation and their Application to Photosynthetic Organisms. *Mol Plant*. 2009;2(2):218-235. doi:10.1093/mp/ssn072
94. Škerlová J, Berndtsson J, Nolte H, Ott M, Stenmark P. Structure of the native pyruvate dehydrogenase complex reveals the mechanism of substrate insertion. *Nat Commun*. 2021;12:5277. doi:10.1038/s41467-021-25570-y
95. Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs Cycle Enzymes by Hydrogen Peroxide: A Key Role of α -Ketoglutarate Dehydrogenase in Limiting NADH Production under Oxidative Stress. *J Neurosci*. 2000;20(24):8972-8979. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-24-08972.2000
96. Wu H, Yu Y, David L, Ho YS, Lou MF. Glutaredoxin 2 (Grx2) gene deletion induces early onset of age-dependent cataracts in mice. *J Biol Chem*. 2014;289(52):36125-36139. doi:10.1074/jbc.M114.620047
97. Scalcon V, Folda A, Lupu MG, et al. Mitochondrial depletion of glutaredoxin 2 induces metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in mice. *Redox Biol*. 2022;51:102277. doi:10.1016/j.redox.2022.102277
98. Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*. 2008;5(6):553-559. doi:10.1038/nmeth.1212
99. Giles GI. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Curr Pharm Des*. 2006;12(34):4427-4443. doi:10.2174/138161206779010549
100. Gumireddy K, Li A, Cao L, et al. NOV-002, A Glutathione Disulfide Mimetic, Suppresses Tumor Cell Invasion and Metastasis. *J Carcinog Mutagen*. 2013;2013:S7-002. doi:10.4172/2157-2518.S7-002
101. Fidias P, Ciuleanu TA, Gladkov O, et al. A randomized, open-label, phase III trial of NOV-002 in combination with paclitaxel (P) and carboplatin (C) versus paclitaxel and carboplatin alone for the treatment of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2010;28(18_suppl):LBA7007-LBA7007. doi:10.1200/jco.2010.28.18_suppl.lba7007
102. Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo MR. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients*. 2019;11(8):1926. doi:10.3390/nu11081926
103. Lee YS, Lee DH, Jeong SY, et al. Ferroptosis-inducing agents enhance TRAIL-induced apoptosis through upregulation of death receptor 5. *J Cell Biochem*. 2019;120(1):928-939. doi:10.1002/jcb.27456

Materiali supplementari

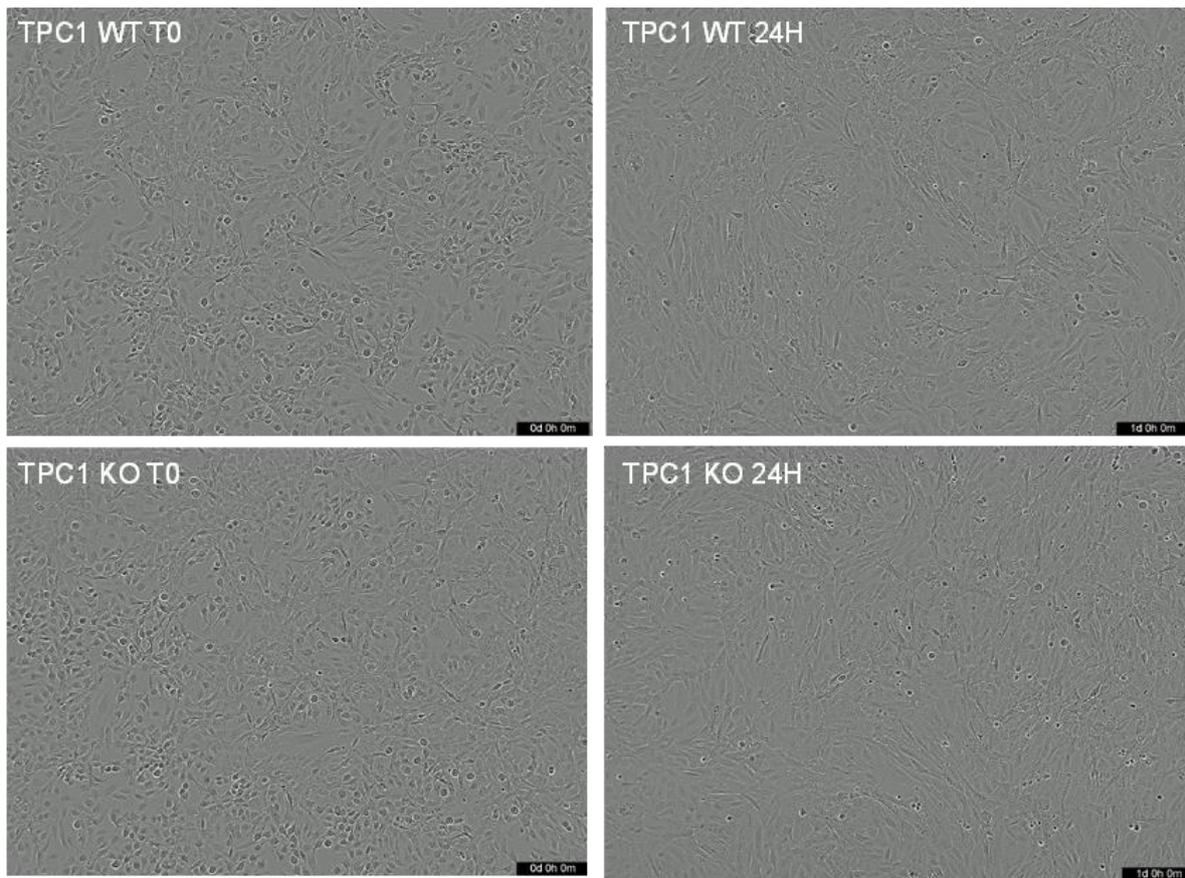
	SYMBOL	Chr	POS	REF	ALT	AA change	loleuin_positid	Consequence	SIFT	PolyPhen	CADD	M-CAP	loP100way_verte	I.2	II.4	II.6
1	ANKRD17	4	74026911	G	T	D/E	119	missense_variant	tolerated((benign(0.3		23,8	T	10,003	0/1	0/1	0/0
2	FLOT2	17	27208886	C	T	R/H	287	missense_variant	tolerated((benign(0.0		23,1	D	1,032	0/1	0/1	0/1
3	CSRP3	11	19204234	C	A	V/L	190	missense_variant	tolerated((benign(0		19,91	T	1,298	0/1	0/1	0/1
4	CDH23	10	73562715	A	C	S/R	275	missense_variant	tolerated((possibly_d		23,4	D	8,82	0/1	0/1	0/0
5	RECQL4	8	1,46E+08	G	A	P/S	143	missense_variant	tolerated((benign(0.331			T	0,402	0/1	0/1	0/0
6	PTPRF	1	44075125	C	T	S/F	1301	missense_variant	deleteriou; possibly_d		26,4	D	4,544	0/1	0/1	0/0
7	MYO1F	19	8592237	C	T	R/Q	820	missense_variant	tolerated((benign(0.0		21,9	T	0,7	0/1	0/1	0/1
8	METTL2B	7	1,28E+08	G	A	G/S	58	missense_variant	deleteriou; probably_c		24,7	D	9,643	0/1	0/1	0/1
9	NDST1	5	1,5E+08	C	T	R/C	346	missense_variant	deleteriou; probably_c		33	D	3,979	0/1	0/1	0/1
10	LRFN2	6	40400659	A	T	I/N	65	missense_variant	deleteriou; benign(0.1		24,1	T	6,385	0/1	0/1	0/1
11	SLC30A8	8	1,18E+08	A	C	N/H	11	missense_variant	deleteriou; benign(0.326			D	2,91	0/1	0/1	0/1
12	NUP188	9	1,32E+08	C	T	A/V	3	missense_variant	deleteriou; benign(0.001			D	2,03	0/1	0/1	0/0
13	NPAS4	11	66192583	C	T	S/L	741	missense_variant	deleteriou; probably_c		26,8	T	4,425	0/1	0/1	0/0
14	OR51G2	11	4936877	A	C	L/R	6	missense_variant	tolerated((benign(0		15,15	T	1,192	0/1	0/1	0/1
15	MRPL39	21	26969717	G	A	R/C	190	missense_variant	tolerated((benign(0.0		22,2	T	1,23	0/1	0/1	0/1
16	HOXA4	7	27170340	A	T	S/T	5	missense_variant	deleteriou; probably_c		26,4	D	8,027	0/1	0/1	0/0
17	RBM33	7	1,56E+08	C	T	P/S	920	missense_variant	tolerated((benign(0.0		15,76	T	1,747	0/1	0/1	0/0
18	DOK6	18	67425097	TAC	T	Y/X	282	frameshift_variant			35			0/1	0/1	0/0
19	TMEM74B	20	1161586	C	T	R/H	226	missense_variant	deleteriou; probably_c		27,4	T	4,223	0/1	0/1	0/1
20	TNFRSF13B	17	16855788	C	G	Q/H	57	missense_variant	tolerated((benign(0.0		17,91	D	0,737	0/1	0/1	0/1
21	RP11-343C2	16	69368758	C	T	G/E	6	missense_variant	deleteriou; probably_c		28,2	D	7,519	0/1	0/1	0/1
22	DST	6	56490044	T	C	M/V	42	missense_variant	tolerated((probably_c		26,4	D	5,155	0/1	0/1	0/1
23	TENM4	11	78380306	T	C	N/D	826	missense_variant	deleteriou; benign(0.3		26,1	D	6,271	0/1	0/1	0/0
24	ARFGF2	20	47630400	G	A	S/N	1361	missense_variant	tolerated((benign(0.0		22,7	T	2,421	0/1	0/1	0/1
25	DENN5B	12	31579352	T	C	M/V	740	missense_variant	tolerated((benign(0.0		18,44	T	5,747	0/1	0/1	0/1
26	SGCD	5	1,56E+08	G	T	G/V	99	missense_variant	deleteriou; probably_c		32	D	6,859	0/1	0/1	0/1
27	ST6GALNAC	1	76779638	G	A	R/Q	56	missense_variant	deleteriou; benign(0.0		19,72	T	1,808	0/1	0/1	0/1
28	HMOX1	22	35792111	G	A	G/S	46	missense_variant	tolerated((possibly_d		23,1	T	4,398	0/1	0/1	0/0
29	ASCL1	12	1,03E+08	C	CGCA	A/AQ	50	inframe_insertion			22			0/1	0/1	./.
30	PSPH	7	56087291	AC	A			splice_donor_variant			23,7			0/1	0/1	0/0
31	XRCC1	19	44051065	C	T	G/R	391	missense_variant	tolerated((benign(0.1		16,7	T	3,544	0/1	0/1	0/0
32	SLC11A1	2	2,19E+08	G	A	G/S	109	missense_variant	deleteriou; possibly_d		25,3	T	7,875	0/1	0/1	0/1
33	C2orf54	2	2,42E+08	C	T	R/Q	18	missense_variant	tolerated((probably_c		22,6	T	2,087	0/1	0/1	0/1
34	RP11-302B1	12	49297506	TA	T	V/X	190	frameshift_variant						0/1	0/1	0/0
35	GPR98	5	89947469	C	A	A/D	702	missense_variant	deleteriou; possibly_d		27,3	D	7,71	0/1	0/1	0/1
36	TFAP4	16	4310179	G	A	S/F	245	missense_variant	deleteriou; benign(0.1		24,6	D	9,151	0/1	0/1	0/1
37	OR10H5	19	15905097	G	A	R/H	80	missense_variant	deleteriou; benign(0.0		19,54	T	0,125	0/1	0/1	0/1
38	RELN	7	1,03E+08	C	T	R/Q	1787	missense_variant	tolerated((probably_c		26	T	4,414	0/1	0/1	0/1
39	CDAN1	15	43023185	G	A	R/W	649	missense_variant	deleteriou; probably_c		29,7	D	5,798	0/1	0/1	0/1
40	SLC25A39	17	42399803	C	T	R/H	95	missense_variant	tolerated((benign(0.0		15,49	D	1,531	0/1	0/1	0/1
41	LMAN1	18	57020489	C	T	R/H	195	missense_variant	deleteriou; probably_c		28	D	7,422	0/1	0/1	0/1
42	TMC3	15	81627314	G	A	R/*	737	stop_gained			41		2,246	0/1	0/1	0/1
43	ATP8B3	19	1788975	A	G	L/P	1007	missense_variant	deleteriou; probably_c		29	D	9,196	0/1	0/1	0/1
44	ANKRD44	2	1,98E+08	C	A	A/S	159	missense_variant	deleteriou; benign(0.1		26,6		4,815	0/1	0/1	0/0
45	SEPT4	17	56598154	G	A	P/S	296	missense_variant	tolerated((benign(0.0		18,16	T	0,902	0/1	0/1	0/1
46	RAD54B	8	95419688	G	A	R/C	254	missense_variant	deleteriou; probably_damaging(0.9		32	D	9,584	0/1	0/1	0/1
47	DDX25	11	1,26E+08	G	A	R/Q	388	missense_variant	deleteriou; probably_c		32	D	9,503	0/1	0/1	0/1
48	TMIE	3	46747350	G	A	R/H	55	missense_variant	deleteriou; probably_c		32	D	6,554	0/1	0/1	0/1
49	RNF183	9	1,16E+08	G	A	P/L	130	missense_variant	tolerated((benign(0.003			T	-0,646	0/1	0/1	0/0
50	PABPC1	8	1,02E+08	T	A	Y/F	376	missense_variant	tolerated((benign(0.005				8,008	0/1	0/1	0/1
51	SLN	11	1,08E+08	C	T	R/Q	6	missense_variant	tolerated((benign(0.0		17,91	T	0,311	0/1	0/1	0/0
52	CCNE2	8	95895032	A	G	I/T	307	missense_variant	tolerated((benign(0.007			T	0,868	0/1	0/1	0/1
53	NPFFR1	10	72015117	G	T	Q/K	297	missense_variant	tolerated((benign(0.0		21,6	D	1,209	0/1	0/1	0/0
54	ERLEC1	2	54028714	G	A	V/I	236	missense_variant	tolerated((benign(0.1		23,2	D	10,003	0/1	0/1	0/1
55	DENN6B	22	50750624	C	T	E/K	568	missense_variant	tolerated((benign(0.0		15,66	D	-0,025	0/1	0/1	0/0
56	TNKS2	10	93605561	C	T	T/M	741	missense_variant	tolerated((probably_c		26,1	D	6,118	0/1	0/1	0/0
57	LCE4A	1	1,53E+08	G	T	C/F	40	missense_variant	tolerated((possibly_d		17,78	T	1,057	0/1	0/1	0/1
58	CCT5	5	10264788	A	G	I/V	469	missense_variant	tolerated((benign(0.0		22,2	T	4,955	0/1	0/1	0/0
59	IGDCC3	15	65623780	C	T	G/S	319	missense_variant	deleteriou; probably_c		28,8	D	6,111	0/1	0/1	0/0
60	ARID5A	2	97217935	C	T	T/M	489	missense_variant	deleteriou; possibly_d		22,4	D	2,459	0/1	0/1	0/1
61	KRT24	17	38859816	G	A	R/*	44	stop_gained			35		-0,102	0/1	0/1	0/1
62	ROCK1	18	18603595	C	T	A/T	420	missense_variant	tolerated((benign(0		22	T	1,295	0/1	0/1	0/0
63	TNRC6C	17	76094588	C	G	P/A	1527	missense_variant	tolerated((benign(0.2		22	T	3,404	0/1	0/1	0/1
64	CHPF	2	2,2E+08	C	T	G/R	135	missense_variant	deleteriou; probably_c		31		4,861	0/1	0/1	0/1
65	FIG4	6	1,1E+08	C	T	T/M	13	missense_variant	deleteriou; probably_c		25	D	5,817	0/1	0/1	0/1
66	CNN2	19	1037670	A	G	K/R	223	missense_variant	tolerated((probably_c		25	D	8,69	0/1	0/1	0/1
67	CNN2	19	1037679	C	T	T/I	226	missense_variant	tolerated((benign(0.0		22,7	D	2,727	0/1	0/1	0/1
68	CNN2	19	1037681	G	A	D/N	227	missense_variant	tolerated((benign(0.0		22,6	T	4,122	0/1	0/1	0/1
69	PHKG1	7	56148952	T	C	Y/C	266	missense_variant	tolerated((benign(0.0		23,2	T	4,89	0/1	0/1	0/1
70	JAKMIP2	5	1,47E+08	T	C	Y/C	437	missense_variant	deleteriou; benign(0.2		24,4	T	4,786	0/1	0/1	0/1
71	ABCA4	1	94522354	C	T	D/N	729	missense_variant	tolerated((benign(0.0		15,83	D	-0,035	0/1	0/1	0/1
72	GPATCH1	19	33610010	CGT	C	V/X	837	frameshift_variant			35			0/1	0/1	0/1
73	TYW1B	7	72281106	T	C	D/G	128	missense_variant	deleteriou; benign(0.0		22,2	T	7,019	0/1	0/1	0/1
74	ERBB3	12	56490986	T	C	L/P	52	missense_variant	deleteriou; probably_c		29,2	D	8,014	0/1	0/1	0/0
75	DNAH1	3	52420212	G	C	V/L	2888	missense_variant	deleteriou; probably_c		24,7	D	9,444	0/1	0/1	0/1
76	KRTAP4-11	17	39274426	T	A	S/C	48	missense_variant	deleteriou; benign(0.0		17,03	T	-1,179	0/1	0/1	0/0
77	RNF217	6	1,25E+08	A	G	Q/R	86	missense_variant	tolerated((benign(0.0		15,4	D	-0,782	0/1	0/1	0/1
78	MUC16	19	9028347	G	A	R/C	12149	missense_variant	deleteriou; probably_c		18,62	T	0,899	0/1	0/1	0/1
79	KCNJ16	17	68129030	C	T	R/C	268	missense_variant	deleteriou; probably_c		25,4	D	0,717	0/1	0/1	0/1
80	ZNF300	5	1,5E+08	C	T	S/N	108	missense_variant	tolerated((benign(0.0		16,25	T	-0,35	0/1	0/1	0/1
81	COG8	16	69368758	C	T	G/E	360	missense_variant	deleteriou; probably_c		28,2	D	7,519	0/1	0/1	0/1

Suppl. 1 Tabella delle varianti condivise tra i soggetti I.2, II.4 e II.6 individuate mediante WES.



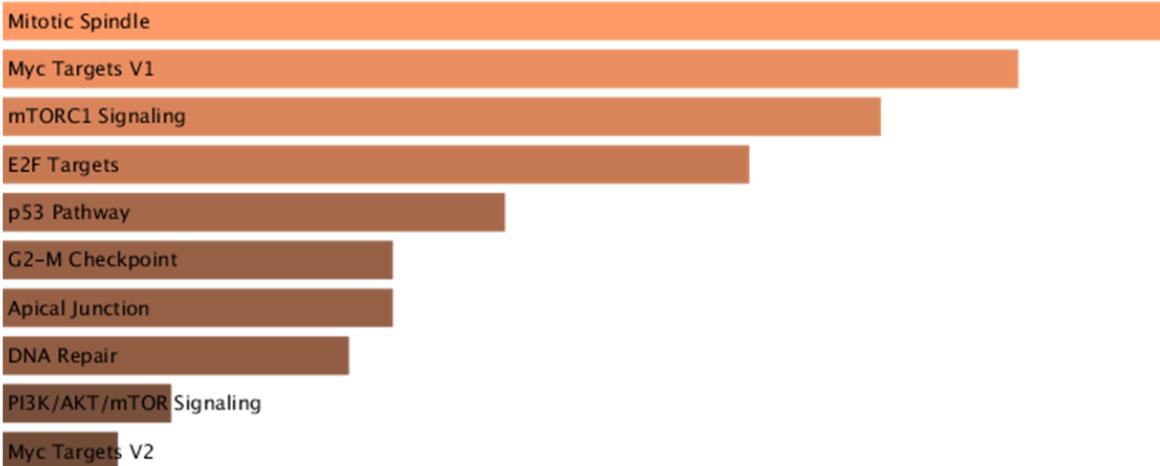
Suppl. 2. Le linee HCT116 GLRX2 WT e KO in seguito a trattamento per 30min con H_2O_2 12mM (T0) e 24 ore dopo il cambio terreno. Sebbene le cellule KO in seguito al trattamento mostrino un fenotipo di stress più accentuato, con entrambe le linee avviene il rescue a distanza di un giorno.

POS	REF	ALT	HCT116 Glrx2 pool WT		Xenograft WT3		HF XenoWT3/ HF Pool WT (%)
			HF		HF		
73	G	A		1	0,999		99,9
146	C	T		1	1		100
152	C	T		0,999	1		100
195	C	T		1	0,999		99,9
247	A	G		1	1		100
310	T	C		0,019	0,010		52,6
574	A	C		0,025	0,011		44,0
769	A	G		1	1		100
825	A	T		0,999	1		100
1018	A	G		1	1		100
2706	G	A		1	0,999		99,9
2758	A	G		1	0,999		99,9
2885	C	T		1	1		100
3010	G	A		1	1		100
3594	T	C		0,999	1		100
3796	A	G		1	1		100
4104	G	A		1	1		100
4312	T	C		1	1		100
5969	C	T		0,999	0,999		100
7028	T	C		0,999	1		100
7146	G	A		0,999	1		100
7256	T	C		1	1		100
7521	A	G		1	0,998		99,8
8348	A	G		1	1		100
8468	T	C		1	1		100
8655	T	C		0,999	1		100
8701	G	A		0,999	1		100
9540	C	T		0,999	1		100
10398	G	A		1	1		100
10664	T	C		1	0,999		99,9
10688	A	G		1	1		100
10810	C	T		1	1		100
10873	C	T		1	0,999		99,9
10915	C	T		1	0,999		99,9
11719	A	G		1	1		100
11914	A	G		0,999	1		100
12705	T	C		1	0,999		99,9
13057	A	C		0,037	0,017		45,9
13105	G	A		1	1		100
13276	G	A		1	1		100
13506	T	C		1	1		100
13650	T	C		0,999	1		100
13681	A	C		0,027	0,02		74
14766	T	C		1	0,998		99,8
16129	A	G		0,999	1		100
16183	A	C		0,617	0,568		92
16187	T	C		0,998	0,998		100
16223	T	C		0,999	1		100
16230	G	A		0,999	1		100
16278	T	C		1	1		100
16311	C	T		0,999	1		100
16356	T	C		0,999	0,999		100
16362	T	C		1	0,999		99,9

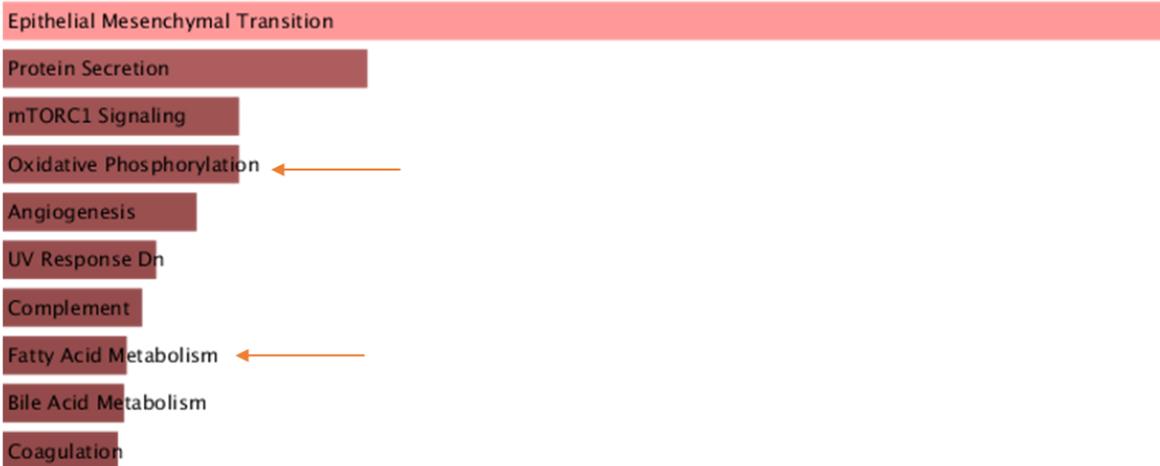


Suppl. 4. Immagini delle linee TPC1 GLRX2 WT e KO in seguito a trattamento per 30min con H_2O_2 100 μ M (T0) e 24 ore dopo il cambio terreno. La linea KO in seguito al trattamento mostra un fenotipo di stress più diffuso rispetto alla WT; con entrambe le linee avviene il rescue in termini di proliferazione a distanza di un giorno.

TPC1 GLRX2 WT



TPC1 GLRX2 KO



Suppl. 5. Individuazione dei pathway molecolari in cui le proteine significativamente più glutationilate sono coinvolte. Le proteine degli estratti cellulari arricchiti in mitocondri (condizioni basali) oltre la curva di significatività sono state divise in base al genotipo: il barplot superiore mostra i pathway in cui sono coinvolte le proteine significativamente più glutationilate nella linea WT, il barplot inferiore mostra la stessa analisi ma relativa alla linea KO. Grafici ottenuti con il tool online Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)